

UNESP – UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
INSTITUTO DE QUÍMICA - CAMPUS ARARAQUARA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

Estudo de processos redox enzimáticos confinados em eletrodos pelo concomitante monitoramento da variação de massa e da corrente: O caso da penicilinase como modelo.

WELDER FRANZINI AMARAL CALLERA

Dissertação de Mestrado

2013



WELDER FRANZINI AMARAL CALLERA

Estudo de processos redox enzimáticos confinados em eletrodos pelo monitoramento da variação de massa e da corrente: O caso da penicilinase como modelo.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, do Instituto de Química, da UNESP – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, como parte dos requisitos para obtenção do Título de Mestre em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Roberto Bueno.

Araraquara

2013

WELDER FRANZINI AMARAL CALLERA

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

Araraquara, 30 de agosto de 2013.

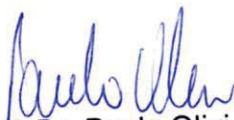
BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Paulo Roberto Bueno (Orientador)
Instituto de Química – UNESP, Araraquara



Prof. Dr. Ronaldo Censi Faria
Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia – UFSCar, São Carlos



Prof. Dr. Paulo Olivi
Faculdade de Filosofia Ciências e Letras - USP, Ribeirão Preto

DADOS CURRICULARES

Dados pessoais

Nome Welder Franzini Amaral Callera

Nome em citações bibliográficas CALLERA, W. F. A.

Sexo Masculino

Filiação Antonio Carlos Amaral Callera e Maria Célia Franzini Callera

Nascimento 18/06/1982 - Araraquara/SP - Brasil

Endereço profissional Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho,
Instituto de Química de Araraquara
R. Prof. Francisco Degni, nº 55
Quitandinha - Araraquara
14800-900, SP - Brasil

URL da home page: www.iq.unesp.br

Endereço eletrônico

E-mail para contato: weldercallera@hotmail.com

Formação acadêmica/titulação

2005 - 2010 Graduação em Farmácia.

Universidade Estadual de Londrina, UEL, Londrina, Brasil

Título: Utilização de ensaio imunoenzimático de captura para determinação do nível de gp43, na urina de camundongos, experimentalmente, infectados com *Paracoccidioides brasiliensis*

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Eiko Nakagawa Itano

Atuação profissional

1. Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho - UNESP

Vínculo institucional

2011 - Atual Vínculo: Bolsista, Enquadramento funcional: Mestrando,
Regime: Dedicação exclusiva

2. Universidade Estadual de Londrina - UEL

Vínculo institucional

2006 - 2010 Vínculo: Colaborador, Enquadramento funcional:
Estagiário, Carga horária: 20, Regime: Dedicação
exclusiva

Atividades

2006 - 2010 Estágio, Centro de Ciências Biológicas
Estágio:
Laboratório de Imunologia - PAT

04/2006 - 02/2007 Extensão Universitária, Centro de Ciências
Biológicas
Especificação:
*Diagnóstico da Paracoccidioidomicose por Ensaio
Imunoenzimático*

Produção

Produção bibliográfica

Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo expandido)

1. **CALLERA, W. F. A.**, ITANO, E. N., MASSUDA, T. Y. C.

Utilização de anticorpos monoclonais a gp380 e análise de gp 380 solúvel na paracoccidiodomicose experimental em urina de camundongos. *In*: XVII EAIC - Encontro anual de iniciação científica - PIBIC/CNPq, 2008, Foz do Iguaçu - PR.

Encontro Anual de Iniciação Científica - XVII EAIC - PIBIC/CNPq, 2008.

Áreas do conhecimento : *Imunologia, Imunologia Aplicada*

Referências adicionais : *Brasil/Português. Meio de divulgação: Meio magnético*

Apresentação de trabalho e palestra

1. **CALLERA, W. F. A., RIECHI, S.C., GUIMARÃES, P.M., ANDRADE, L.A., VOGLER, I.H., SIMAO, A.N.C.**

Estudo de prevalência de marcadores sorológicos para doenças infecto-contagiosas em doadores do banco de sangue do Hospital Universitário de Londrina, 2010. (Congresso, Apresentação de Trabalho)

Áreas do conhecimento : *Farmácia, Hematologia, Imunologia*

Referências adicionais : *Brasil/Português. Meio de divulgação: Vários; Cidade: Londrina; Evento: 2º Congresso Sul Brasileiro de Análises Clínicas; Inst.promotora/ financiadora: Sociedade Brasileira de Análises Clínicas*

Produção técnica

Trabalhos técnicos

1. **CALLERA, W. F. A.**

Programa de educação pelo trabalho para a saúde - PET - Saúde - Portaria Interministerial MS/MEC nº1802/2008, 2009

Referências adicionais: *Brasil/Português. Meio de divulgação: Meio digital*

Eventos

Participação em eventos

1. Apresentação de Pôster / Painel no(a) **2º Congresso Sul Brasileiro de Análises Clínicas**, 2010. (Congresso)

Estudo de prevalência de marcadores sorológicos para doenças infecto-contagiosas em doadores do Banco de Sangue do Hospital Universitário de Londrina.

2. Apresentação (Outras Formas) no(a) **I Fórum de Farmácia**, 2007. (Outra)
Adequações no currículo vigente.

3. Apresentação de Pôster / Painel no(a) **I Workshop de tópicos atuais em Imunologia do curso de Farmácia**, 2006. (Outra)
Imunologia do transplante.

4. Apresentação de Pôster / Painel no(a) **VIII Jornada de Farmácia e Análises Clínicas de Londrina e II Encontro de Farmácia Industrial**, 2005. (Outra)
Atuação dos Estudantes de Farmácia da UEL junto aos agentes comunitários na campanha da Tuberculose em uma Unidade Básica de Saúde no município de Londrina.

Organização de evento

1. **CALLERA, W. F. A.**

2º Congresso Sul Brasileiro de Análises Clínicas, 2010. (Congresso, Organização de evento)

Referências adicionais: Brasil/Português. Meio de divulgação: Vários

“Sou um só, mas ainda assim sou um. Não posso fazer tudo, mas posso fazer alguma coisa. Por não poder fazer tudo, não me recusarei a fazer o pouco que posso. O que eu faço é uma gota no meio de um oceano, mas sem ela o oceano será menor.”

(Max Gehring)

A Deus por, simplesmente, tudo;

*Aos meus pais Antonio Carlos Amaral
Callera e Maria Célia Franzini Callera;*

*E meu irmão Welber Franzini Amaral
Callera,*

*Que desde sempre acreditaram, me
guiaram e me incentivaram,*

*Serviram-me de amor e companheirismo
pelo trajeto percorrido,*

Principalmente, nos momentos difíceis...,

Muitíssimo obrigado!

*A todos familiares e amigos que me
incentivaram e apoiaram...*

AGRADECIMENTOS

Quero expressar minha gratidão e apreço por todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para que este trabalho se tornasse uma realidade. Pois o final de mais esta etapa é um momento em que a realização pessoal e o crescimento profissional superam qualquer obstáculo que tenha aparecido durante a sua execução.

Ao meu orientador e amigo, Prof. Dr. Paulo Roberto Bueno, que mesmo sem me conhecer, acreditou e apostou na minha capacidade, não mediu esforços em colaborar, sugerir e apoiar minhas decisões.

Aos professores Dr. Eduardo Maffud Cilli e Dr^a Maria Del Pilar Taboada Sotomayor, pelas sugestões e colaborações.

Aos professores do Departamento por tudo que me ensinaram e pela amizade.

Aos meus amigos e companheiros de laboratório: Willian Ribeiro, Adriano dos Santos, Juliana Figueiredo, Fernanda Cesar, Flávio Bedatty, Márcio Góes, Denise Martins, Juliana Cecchetto, Tiago Benites, Fernanda Carvalho, Eucarlos Lima Martins, Márcio Santos e Carla Riccardi, pelas discussões e contribuições geradas.

À Rose Portasio, pela sua prontidão em nos auxiliar.

A todos os funcionários do Instituto de Química, da UNESP, campus Araraquara – SP.

Aos professores do programa de pós-graduação em Biotecnologia.

Às funcionárias da seção de pós-graduação e ao pessoal da biblioteca por sempre estarem receptivos e prontos a auxiliar.

A todos meus familiares e amigos, meus sinceros agradecimentos, por me aturarem, pelos desabafos, pelas alegrias e tristezas compartilhadas, e principalmente, por fazerem parte da minha vida.

Ao CNPq pela bolsa concedida... Muito obrigado!

Resumo

RESUMO

Este trabalho está centrado no desenvolvimento, caracterização e utilização de uma superfície composta por monocamada auto-organizada (*self assembled monolayer* – SAM) de L-cisteína, funcionalizada com a enzima metalo- β -lactamase (M β L). A função designada a este sensor foi de detecção da velocidade da cinética enzimática, em tempo real, da reação da penicilinase com seu substrato, um antibiótico β -lactâmico, por técnica piezelétrica, microbalança a cristal de quartzo (QCM), e por técnicas eletroquímicas. As curvas de progresso foram obtidas pela variação da frequência no cristal de quartzo, demonstrando a cinética em tempo real. Não foram obtidas curvas com perfil hiperbólico, como esperado pelo modelo de Michaelis-Menten, por ambas as técnicas devido às baixas concentrações de substrato utilizadas nas análises. Foram obtidos gráficos com padrões lineares e a partir deles foi possível calcular a constante de Michaelis-Menten (K_m). A K_m obtida a partir da técnica eletroquímica mostrou-se mais próxima ao valor fornecido pelo fabricante da enzima. No entanto, pela técnica piezelétrica a K_m foi maior, refletindo em perda de sensibilidade da enzima pelo substrato.

Palavras-chave: Enzima. Biossensor. Cinética enzimática. Eletroquímica. Piezelétrica.

Abstract

ABSTRACT

The aim of this study was to develop, characterize, and apply the functionalized transducer immobilized with metallo- β -lactamase (M β L) enzyme using appropriate procedures based on L-cysteine self-assembling monolayer-SAM. The enzymatic activity of MBL under β -lactam antibiotic was measured, on real time, by piezoelectric quartz crystal microbalance (QCM) and electrochemical techniques. The progress curves were obtained by varying the frequency of quartz crystal. The hyperbolic pattern corresponding to the pattern set on the model of the Michaelis-Menten was not obtained due to low concentration of substrate. On the other side, linear graphic was obtained and the K_m was calculated. The K_m obtained from electrochemical analyses showed a value similar to manufacturer's instructions of fabricant, and the K_m obtained by QCM showed higher, reflecting the lost of sensibility.

Keywords: Enzyme. Biosensor. Enzymatic kinetic. Electrochemistry. Piezoelectric.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Gráficos: (a) de “Michaelis-Menten”. (b) duplo recíproco ou “Lineweaver-Burk”.	29
Figura 2 - Diagrama de um biossensor.	33
Figura 3 - Curvas de progresso.	34
Figura 4 - Voltamograma cíclico de limpeza eletroquímica.	43
Figura 5 - Configuração do dispositivo e seu funcionamento.	45
Figura 6 - AUTOLAB® (PGSTAT302N, METROHM®).	46
Figura 7 - Eletrodos de trabalho.	47
Figura 8 - Esquema de um potenciostato/galvanostato ligado à uma célula eletroquímica de 3 eletrodos.	48
Figura 9 - EQCM-D E4 Auto (Q-Sense®).	51
Figura 10 - Cristais de quartzo recoberto por ouro.	51
Figura 11 - Voltametrias cíclicas com solução de ferri/ferro, mostrando o bloqueio da superfície de ouro.	57
Figura 12 - Voltametria cíclica que garante a não degradação do substrato.	59
Figura 13 - Voltametria cíclica com diferentes concentrações do CoCl_2 .	61
Figura 14 - VC e EIE, realizadas com e sem cofator.	62
Figura 15 – Possível mecanismo de ação de β -lactamases sobre a penicilina.	63
Figura 16 – Mecanismo proposto para a ação do CoCl_2 como mediador de elétrons no biossensor.	64
Figura 17 - Perfil cronoamperométrico obtido por adições sucessivas de 20, 40, 60, 80, 100, 120, 140 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de antibiótico β -lactâmico.	66
Figura 18 - Gráfico de “Michaelis-Menten”.	67
Figura 19 - Gráfico do duplo recíproco ou “Lineweaver-Burk” para os valores obtidos na Figura 18.	68
Figura 21 - Gráfico piezelétrico para diversas concentrações de analito.	69
Figura 22 – Gráficos das reações enzimáticas para diferentes concentrações de substrato.	70
Figura 23 - Gráfico das médias de variação de frequência pela concentração de Penicilina G.	72

Figura 24 - Gráfico do duplo recíproco ou “Lineweaver-Burk” para dados obtidos da Figura 23.	73
Figura 25 - Gráficos de “Michaelis-Menten” e “Lineweaver-Burk”, respectivamente.	74

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Classificação das enzimas.	26
Tabela 2 - Valores de K_m para algumas enzimas.	31
Tabela 3 - Exemplos de elementos inorgânicos que servem como cofatores.	60

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

M β L – Metalo- β -lactamase.

SAM – Monocamada auto-organizada (*self assembled monolayer*).

EQCM – Microbalança eletroquímica a cristal de quartzo.

PND – Política de desenvolvimento produtivo.

US\$ - Dólar americano.

K_m – Constante de Michaelis-Menten.

KDa – Kilodalton.

E – Enzima.

S – Substrato.

ES – Complexo enzima-substrato.

P – Produto.

v_m – Velocidade máxima.

k_c – Constante de velocidade catalítica.

$[E]_t$ – Concentração enzimática total.

Δq – Variação de carga.

Δt – Variação de tempo.

ΔP – Variação de produto.

Δf – Variação de frequência.

ΔD – Variação de dissipação.

Δm – Variação de massa.

min – Minutos.

h – Hora.

s – Segundos.

Hz – Hertz.

f – Frequência.

g – Gramas.

cm – Centímetro.

μ_q – Módulo de cisalhamento de cristal de quartzo.

ρ_q – Densidade de quartzo.

EDC – Etilo (dimetilaminopropil) carbodiimida.

NHS – *N*-hidroxi-succinimida.

PBS – Solução tampão fosfato.

UV – Ultra violeta.

C – Celsius.

F_r - Fator de rugosidade.

L – Litros.

VC – Voltametria cíclica.

EIE – Espectroscopia de impedância eletroquímica.

Δi – Variação de corrente.

A – Ampère.

QCM – Microbalança de cristal de quartzo.

n – Nano.

μ - Micro.

m – Mili.

n.º - Número.

j – Densidade de corrente.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	24
1.1	Enzimas	24
1.2	β-lactamases	27
1.3	Cinética enzimática	28
1.4	Biossensores	31
1.5	Microbalança eletroquímica a cristal de quartzo (EQCM)	36
1.6	Monocamada auto-organizada (SAM)	38
2	OBJETIVOS	40
3	MATERIAIS E MÉTODOS	42
3.1	Reagentes e soluções	42
3.2	Preparo do eletrodo de trabalho	42
3.3	Desenvolvimento do sensor	44
3.4	Medidas eletroquímicas	45
3.4.1	Voltametria cíclica (VC)	47
3.4.2	Espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE)	49
3.4.3	Cronoamperometria	50
3.5	Medidas piezelétricas	50
3.6	Otimização das condições	52
3.6.1	pH	53
3.6.2	Temperatura	53
3.6.3	Concentração da enzima	54
3.6.4	Concentração do substrato	54

4	RESULTADOS E DISCUSSÕES	56
4.1	Qualificando o biossensor	56
4.2	Especificidade da penicilina G pela enzima	58
4.3	Efeito do cofator e do mediador de elétrons	59
4.4	Medidas cronoamperométricas	65
4.5	Perfil piezelétrico	69
5	CONCLUSÃO	77
5.1	Biossensor	77
5.2	Técnica eletroquímica	77
5.3	Técnica piezelétrica	78
5.4	Considerações finais	78
	REFERÊNCIAS	81

Introdução

1 INTRODUÇÃO

A Biotecnologia compreende a ciência que utiliza organismos vivos ou partes deles para desenvolvimento de ensaios, identificação de materiais biológicos, produção de compostos químicos, de combustíveis e de alimentos.¹

Torna-se cada vez mais comum a utilização de microrganismos em aplicações industriais, como no processamento e produção de produtos químicos, soluções tecnológicas sustentáveis de proteção ambiental e produção de energia, fermentações, aplicações médicas e farmacêuticas.²

A participação na economia brasileira e global é crescente, tendo-se como perspectiva o envolvimento da biotecnologia com pelos menos um terço da produção industrial nas próximas duas décadas, sendo que a indústria de produtos voltados à saúde detém 80% da tecnologia desenvolvida, enquanto a agrícola 10% e a química 3,5%. Todos estes fatores motivam muitos projetos de pesquisa e programas de pesquisa e desenvolvimento, processos industriais em geral e cursos de capacitação técnica na área biotecnológica.^{1; 2}

Esta área de conhecimento apresenta característica multidisciplinar, pois tem como base a biologia molecular, engenharia, bioinformática, genética, agronomia e outras, sendo estratégica no âmbito de desenvolvimento econômico de diversos países, dentre eles o Brasil, o qual possui a Política de Desenvolvimento Produtivo – PND, lançada em 2008 pelo governo federal, junto com o Decreto n.º 6.041/2007 para que as condições de inovação nesta área sejam adequadas à legislação vigente.³

1.1 Enzimas

As enzimas são proteínas com extraordinária função catalítica e especificidade, aumentando a velocidade em 10^6 a 10^{12} vezes, quando comparadas às reações correspondentes não catalisadas.^{1;2}

Elas ocupam um papel de destaque dentro do contexto biotecnológico, pois são catalisadores muito utilizados na indústria (alimentícia, farmacêutica, têxtil, papel e celulose, químico-farmacêutica), em métodos analíticos (químicos e de diagnóstico), em medicamentos e como alvos naturais de fármacos inibidores específicos (por exemplo, o omeprazol, fármaco usado como inibidor da enzima que catalisa a saída do ácido clorídrico das células acinares).^{1;2;3;4}

A importância econômica das enzimas pode ser atribuída à movimentação financeira observada neste mercado, no Brasil, nos anos de 1983, 1995 e 2005, onde se gerou montantes da ordem de US\$ 400 milhões, US\$ 1 bilhão e US\$ 2 bilhões, respectivamente.⁴

Por exemplo, a indústria biotecnológica produz proteases para serem adicionadas aos detergentes com a função de retirar sangue e molho das roupas, em restaurantes são usadas para amaciar carnes, na cervejaria para eliminar a turvação da cerveja, as lipases são adicionadas a detergentes líquidos para a degradação de graxa, entre outras.⁵

Com a descoberta do grande número de enzimas houve a necessidade da sistematização da nomenclatura, a qual foi feita pela União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular (IUBMB), a qual divide as enzimas em seis classes (Tabela 1), de acordo com a reação que catalisam, atribuindo dois nomes e um número de quatro dígitos que identificam as classes, subclasses e sub-subclasses, respectivamente.⁵

Tabela 1 - Classificação das enzimas.

Classe da enzima	Tipo de reação catalisada
Oxidoredutases	Reações de oxidação-redução
Transferases	Transferência de grupos funcionais
Hidrolases	Reações de hidrólise
Liases	Remoção de grupos para formação de ligação dupla ou adicionam H ₂ O, NH ₃ , CO ₂
Isomerases	Isomerização
Ligases	Formação de ligações entre duas moléculas

Fonte: Elaborado pelo autor.

A maior parte das enzimas necessita de cofatores metálicos e coenzimas para que exerçam sua função catalítica, sendo os metais de transição (entre eles, Zn⁺², Fe⁺² e Cu⁺²) os mais envolvidos na catálise, pois apresentam dois ou mais, estados de oxidação, por exemplo, o citocromo P₄₅₀, uma enzima microsomal que degrada substâncias tóxicas, necessita da oxidação reversível do Fe⁺² em Fe⁺³ para exercer sua função. Já as coenzimas são substâncias orgânicas pequenas, derivadas de vitaminas. A enzima passa a ser cataliticamente ativa quando ligada ao seu cofator, sendo referida como holoenzima, antes é apoenzima (inativa).⁵

O sítio ativo da enzima é a região onde parte do substrato liga-se, não covalentemente (interação hidrofóbica, força de van der Waals, pontes de hidrogênio e interações eletrostáticas) para que ocorra a catálise. Dois modelos são propostos para que esta interação específica aconteça: o modelo chave-fechadura, proposto por Fischer em 1890, o qual diz que enzimas têm fendas fixas que permitem a inserção de compostos com certa configuração; e o modelo de encaixe induzido, proposto por Koshland em 1958, o qual diz que o sítio ativo da enzima está pré-formado e que uma interação inicial com o substrato gera uma mudança conformacional na enzima.⁵

1.2 β -lactamases

Relatadas desde os anos 40, as β -lactamases ou penicilinasas são enzimas redox, ou seja, catalisam reações que envolvem transferência de elétrons, responsáveis pela hidrólise da ligação amida do anel β -lactâmico do antibiótico, fazendo com que este perca sua função de inibir a síntese da parede celular bacteriana.^{6;7}

Segundo a classificação de Ambler, as penicilinasas são divididas em quatro classes de acordo com a sua estrutura primária e podem também ser classificadas dentro de dois grupos com base no seu mecanismo catalítico, isto é, serina- β -lactamases (classes A, C e D) e metalo- β -lactamases (classe B).⁶

As metalo- β -lactamases (M β L) utilizam íons bivalentes, comumente zinco (Zn^{+2}) ou cobalto (Co^{+2}), como cofator para sua atividade catalítica. São, atualmente, uma das classes que mais merece destaque, devido à sua capacidade de hidrolisar todos os antimicrobianos β -lactâmicos, incluindo os carbapenems, sendo estes utilizados no tratamento de infecções causadas por bactérias gram-negativas multirresistentes.⁶

A penicilinase de *Bacillus cereus* é uma β -lactamase de classe B (classificação de Ambler) dependente de íon bivalente metálico, neste caso o Zn^{2+} , para que exerça sua atividade catalítica, possuindo um K_m de 60 μM e um peso molecular de 28 KDa.^{6;7}

As β -lactamases podem ser divididas em enzimas cromossomo-mediadas e naquelas codificadas por genes transferíveis via plasmídeo, moléculas circulares de DNA (ácido desoxirribonucléico) capazes de se replicar independente do DNA cromossômico e com velocidade superior, sendo encontrado em bactérias (podendo ser transmitido de uma a outra) e em algumas células eucariotas, cujos determinantes genéticos estão vinculados a íntegrans, sendo que muitas destas últimas estão sendo descobertas e parecem se disseminar rapidamente devido ao seu potencial de transferência inter e intra-espécies.^{8;9}

As áreas com maiores relatos destas bactérias produtoras de β -lactamases são Ásia, Europa e América Latina, segundo o SENTRY *Antimicrobial Surveillance*

Program, indicando um aumento mundial significativo nas taxas de ocorrência de MBL's.¹⁰

1.3 Cinética enzimática

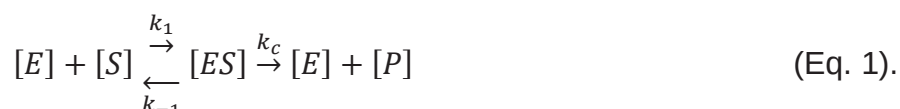
Estudos cinéticos são ferramentas poderosas na investigação dos mecanismos de reações enzimáticas, permitindo inferir detalhes importantes dos processos que acontecem antes da etapa determinante da velocidade, ou seja, no momento da formação do complexo enzima-substrato.¹¹

O modelo mais simples para uma reação enzimática é o de “Michaelis-Menten”, o qual define as enzimas como saturáveis em relação à quantidade de substrato, apresentando um perfil hiperbólico, quando plotados os valores de velocidades iniciais em função de uma dada concentração de substrato, sendo este padrão de caracterização muito usado nos estudos cinéticos tanto de enzimas naturais quanto de compostos bioinorgânicos, que mimetizam funções enzimáticas, bem como em outros casos de catálise homogênea.¹¹

Os estudos sistemáticos do efeito da concentração inicial do substrato sobre a atividade enzimática começaram a se realizar no final do séc. XIX.

Introduziu-se o conceito do complexo enzima-substrato, como sendo intermediário do processo de catálise enzimática, propondo-se então, que a reação ocorre em duas etapas.¹²

Este mecanismo foi inicialmente proposto por Michaelis e Menten e atualmente é conhecido com mecanismo de “Michaelis-Menten”, sendo

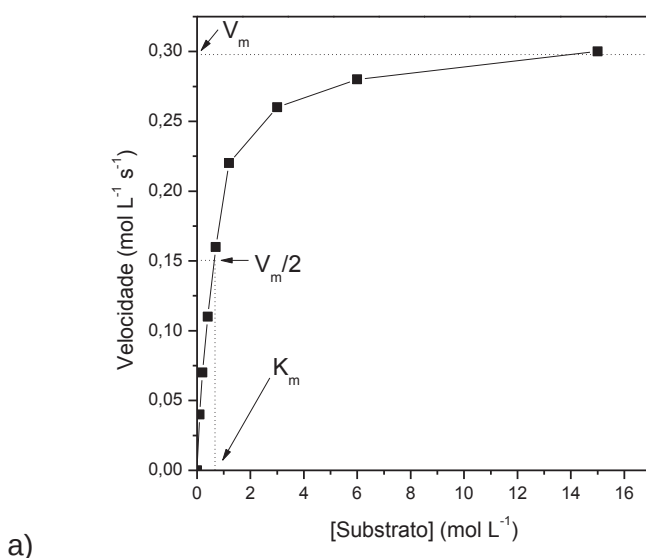


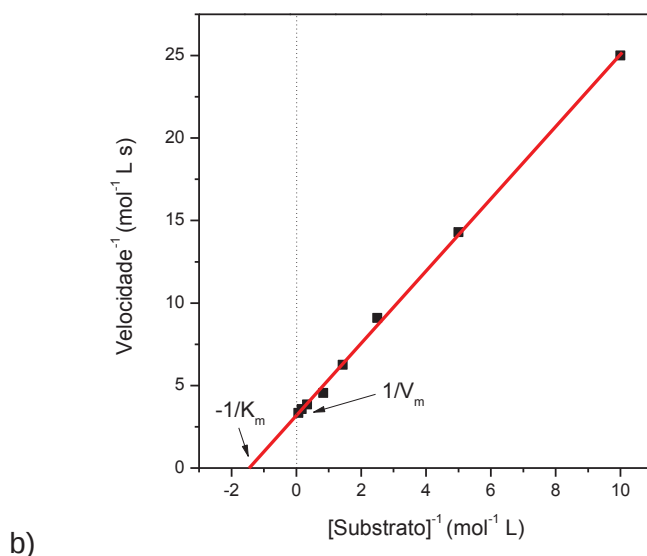
Segundo este modelo reacional, a enzima (*E*) que participa da reação se liga reversivelmente ao substrato (*S*), podendo formar ou não o produto (*P*). Ao final da reação, (*E*) é recuperada, voltando a ter a estrutura química e conformacional do princípio.¹²

A primeira etapa, $(E) + (S)$ se refere à formação complexo (ES) , que atinge o equilíbrio de forma muito rápida em comparação com a etapa em que (ES) se transforma em (E) e (P) , sendo esta considerada a etapa lenta e limitante da reação.^{11;12}

Com os resultados obtidos da segunda etapa pôde-se determinar a velocidade instantânea, ou seja, $v = k_c[ES]$, onde k_c é a constante de velocidade catalítica, o qual representa a quantidade de moléculas de substrato convertidos em produto por segundo por molécula de enzima, em outras palavras, indica o número máximo de moléculas convertidas em produto por segundo por cada sítio ativo. Portanto, $v_m = k_c[E]_t$ e $v_m/2 = K_m$, em que v_m é a velocidade máxima e K_m é a constante de equilíbrio de Michaelis-Menten, para uma dada concentração de substrato. A cinética de primeira ordem é dependente da $[S]$, ou seja, o aumento da velocidade da reação depende diretamente do aumento da $[S]$, enquanto que tende a uma cinética de ordem zero, independente do aumento da $[S]$.^{5;12}

Figura 1 - Gráficos: (a) de “Michaelis-Menten”. (b) duplo recíproco ou “Lineweaver-Burk”.





Fonte: Elaborado pelo autor.

Devido ao fato de que o gráfico de velocidades iniciais por concentração de substrato não ser linear, como visto na Figura 1 (a), a não ser em baixas concentrações de substrato, havia certa dificuldade, historicamente, em se obter v_m e K_m . Isto levou a busca de um método para linearização da equação, o qual foi proposto por Lineweaver e Burk, sendo então conhecido como gráfico de valores inversos da equação o de “Michaelis-Menten”. Por este método, vê-se que a intercessão da reta com o eixo da ordenada é igual a $1/v_m$ e que a sua interseção com o eixo da abcissa é $-1/K_m$.^{11;12}

O K_m é expresso como a concentração do substrato, em mol L⁻¹, referente a metade da velocidade máxima, onde valores baixos de K_m relacionam-se com alta afinidade da enzima pelo substrato, ou seja, são necessárias baixas concentrações de substrato para que se atinja a máxima eficiência catalítica. Na tabela 2, têm-se os valores de K_m para algumas enzimas.¹²

Tabela 2 - Valores de K_m para algumas enzimas.

Enzima	Substrato	K_m ($\mu\text{mol L}^{-1}$)
Anidrase-carbônica	CO_2	8000
Arginina-tRNA-sintetase	Arginina	3
	tRNA	0,4
	ATP	300
Penicilinase	Penicilina	60
Quimiotripsina	Acetil-1-triptofanamida	5000
Piruvato-carboxilase	Piruvato	400
	HCO_3^-	1000
	ATP	60

Fonte: Elaborado pelo autor.

1.4 Biossensores

Biossensores são dispositivos eletrônicos capazes de gerar um sinal apropriado e proporcional à concentração de substrato consumido e/ou a concentração de produto formado em uma reação bioquímica. Sendo eles classificados de acordo com o sinal gerado no transdutor, os quais podem ser: potenciométrico, amperométrico, condutimétrico, óptico, piezelétrico ou térmico.^{13;14}

Os biossensores eletroquímicos usam componentes biológicos como parte do sensor, fazendo com que estes reajam fornecendo sinais analíticos ao sistema.¹⁵

O material biológico é o responsável pela seletividade e formação de produtos detectáveis por meio de sinal gerado, tendo como exemplo: o sinal potenciométrico (onde se mede uma diferença de potencial), amperométrico (no qual se mede uma diferença de cargas), condutimétrico (observa-se mudanças na condutância entre eletrodos) e impedância (medindo-se mudanças na condutância de eletrodos).¹⁵

Os biossensores ópticos baseiam-se na determinação das mudanças de absorção entre os reagentes e produtos da reação, ou na medida da saída de luz por um processo luminescente, sendo que o uso de reações colorimétricas são os

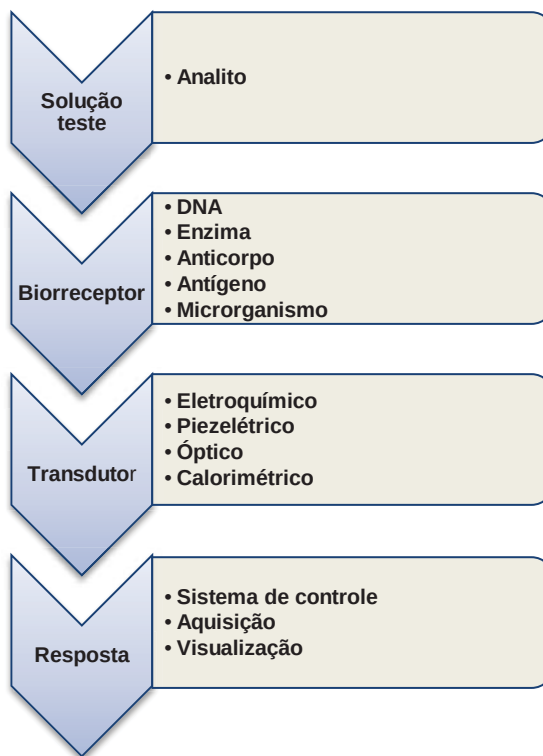
meios mais comuns, pois a reação entre uma enzima oxirredutora e um cromógeno com o analito geram mudança de cor, variando a absorbância da solução a ser analisada.¹⁶

Os biossensores piezelétricos são formados por cristais de quartzo que ficam em ressonância na microbalança, ou seja, a partir da variação de frequência gerada devido a variação de massa na superfície do cristal consequente da reação do reagente biológico com seu analito, pode-se tirar conclusões sobre o que está ocorrendo no meio, o qual será melhor discutido a frente.¹⁷

Os biossensores térmicos levam em consideração que muitas reações ocorrem exotermicamente, ou seja, desprendem energia na forma de calor, desta forma mede-se a temperatura antes da entrada da solução em contato com a enzima ou outro reagente e relaciona-se com a variação obtida com a reação.¹⁸

Resumidamente, os biossensores são dispositivos analíticos, podendo ou não utilizar de marcadores, que integram uma biocamada, um transdutor elétrico, elementos de condicionamento e processamento do sinal elétrico, ou seja, por meio da imobilização e suporte de enzimas sobre substratos metálicos se torna possível a construção de dispositivos que utilizam de reações biológicas para gerar um sinal físico de possível mensuração. Devido a sensibilidade e seletividade das enzimas agregadas a tais superfícies têm-se um instrumento vantajoso e altamente preciso para caracterização de reações enzimáticas.^{19;20}

Figura 2 - Diagrama de um biossensor.



Fonte: Elaborado pelo autor.

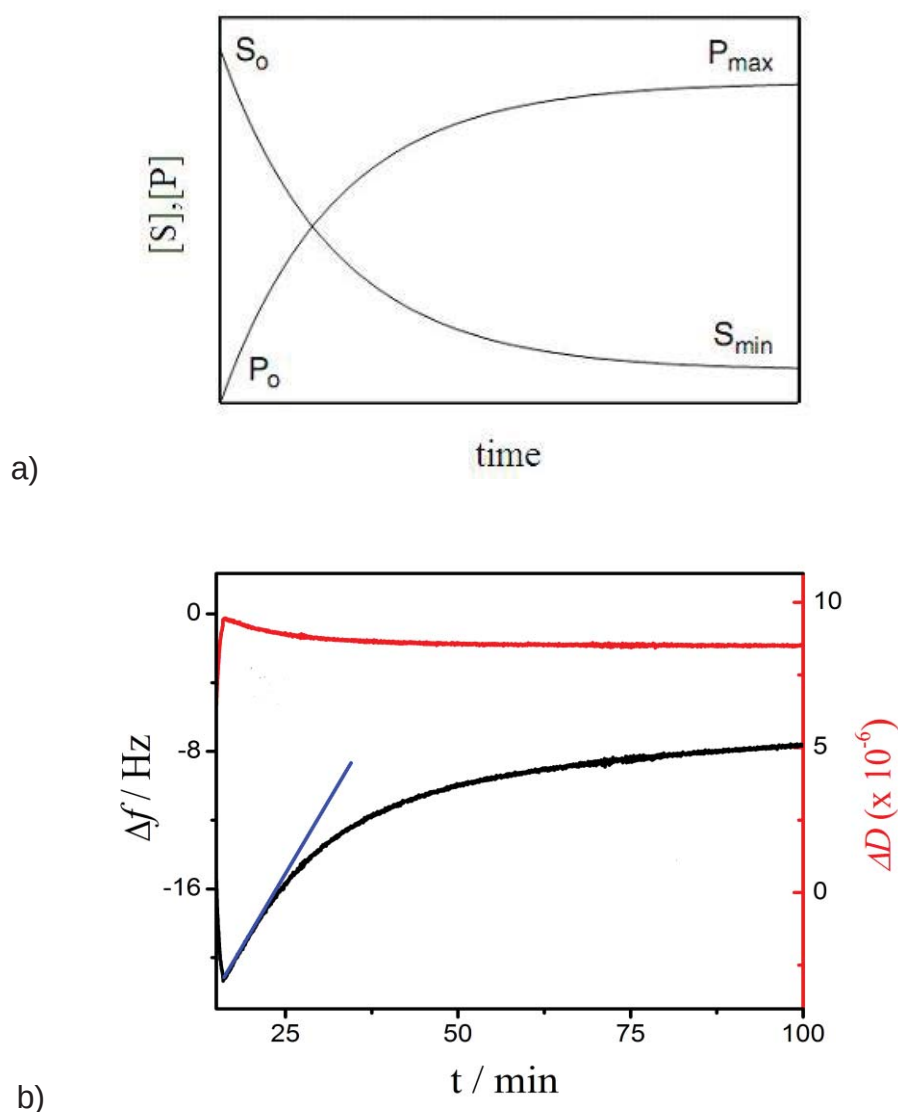
Um exemplo da aplicação pode ser visto em biossensores eletroquímicos, os quais são, normalmente, baseados na catálise enzimática de uma reação que produz ou consome elétrons (tais enzimas são, justamente chamadas, enzimas redox).^{19;20}

Com isto, obteve-se uma velocidade baseada na variação de carga pela variação do tempo o que é definido como corrente elétrica ($i = \Delta q / \Delta t$), na qual mediu-se o fluxo de cargas elétricas geradas pela enzima redox durante a reação com seu substrato.^{18;19;20;21}

A Figura 3 demonstrou como a curva progresso é observada na técnica piezelétrica. Em (a) têm-se as variações de concentração de S e P em função do tempo, sendo S_0 e P_0 , concentrações iniciais e S_{min} e P_{max} , concentrações finais. Enquanto em (b) têm-se a curva de progresso, na qual se observou o instante antes da reação enzimática até a hidrólise do substrato, onde Δf e ΔD , são, respectivamente, variação de frequência e variação de dissipação, ou seja, as medidas obtidas piezeletricamente, em tempo real, face ao tempo. A região

tangenciada em azul, do início até em torno de 25 min, refere-se a parte linear da reação, na qual a E está se ligando ao substrato formando ES , na tentativa equilibrar a reação, porém sendo sensível a baixas variações de S , tendendo a reação no sentido de formação do P . Enquanto não há saturação enzimática a reação é sensível à baixas variações de substrato, em seguida a mesma passa a depender da concentração de ES .²⁰

Figura 3 - Curvas de progresso.



Fonte: BUENO, et al. (2010).²⁰

Na Figura 3 (a) observou-se que a formação do produto atinge um valor máximo face ao tempo, o qual limitou-se pelo consumo do substrato, enquanto que em (b) a variação de frequência (Hz) mostrou que há produto sendo formado, pois há um aumento na frequência vibracional do cristal face ao tempo indicando que massa está se desligando da superfície metálica, possivelmente, pela formação do produto. A reta tangente à hipérbole refere-se à velocidade inicial da reação.

Uma estratégia importante para suportar enzimas sobre substratos metálicos é por meio da formação de monocamada auto-organizada (SAM), conferindo interessantes características físico-químicas às superfícies, permitindo o fácil ancoramento do biorreceptor por reações dos grupos funcionais da SAM com aqueles presentes na estrutura biológica.²¹

Este trabalho utilizou desta abordagem por meio do uso de um aminoácido, que contém um grupamento tiol (SH) em uma de suas extremidades, especificamente a L-cisteína, de fórmula química $C_3H_7NO_2S$, ou seja, de cadeia carbônica curta o que requer um tempo maior, aproximadamente 12 h, para organização e formação do filme sobre a superfície de Au, o qual é posteriormente funcionalizado para ancorar a penicilinase.^{19;20;21}

Os biossensores são ferramentas analíticas muito pesquisadas e utilizadas atualmente, pois suas características são vantajosas face aos métodos convencionais laboratoriais, ou seja, menor tempo de análise (minutos a horas), possibilidade de miniaturização, portabilidade, menor custo operacional, de projeto e ao consumidor final.²²

Para o desenvolvimento de uma determinada aplicação necessita de profissionais de diversas áreas, desde as Engenharias, passando pela Química e Física, até os profissionais da Saúde e áreas Biológicas. É um campo de pesquisa com grandes perspectivas, principalmente em questões de saúde pública, tornando os métodos de análise mais rápidos e precisos, como no diagnóstico de vírus e bactérias, como a Dengue, o HIV (vírus da imunodeficiência adquirida), entre outros.²²

1.5 Microbalança eletroquímica a cristal de quartzo (EQCM)

A EQCM associa a transdução eletroquímica a piezelétrica, por meio da mensuração tanto do fluxo de carga quanto da variação concomitante de massa, através da interface eletrodo funcionalizado/solução. Isto permite o entendimento de processos moleculares com uma abordagem físico-química mais completa dos fenômenos envolvidos.²⁰

O princípio piezelétrico permite o monitoramento da variação de massa. É baseado na capacidade que certos materiais possuem de gerar um campo elétrico quando submetidos a deformações ou pressões externas, ou seja, por este fenômeno é possível aplicar um campo elétrico sobre o material piezelétrico gerando uma deformação. Quando a perturbação elétrica tem características oscilatória (com amplitude e frequência adequadas), o material oscilará mecanicamente em uma forma ressonante, tornando possível associar a frequência vibracional do material (tipicamente um cristal de quartzo) com a massa depositada ao mesmo tempo.²⁰

A configuração desenvolvida para o sensor enzimático deste projeto possibilita obter medidas de variação de massa e transferência de elétrons, concomitantemente, por se tratar de um dispositivo criado com uma enzima redox e ambos os sistemas estarem acoplados, i.e. piezelétrica e eletroquímica. Portanto, quando ocorre a interação enzima-substrato a frequência vibracional do cristal diminui, relacionando-se a um aumento de massa acoplada à superfície do eletrodo e quando ocorre a passagem de elétrons da enzima para o substrato, sendo esta mensurada eletroquimicamente, ocorrendo a formação do produto, no caso a abertura do anel β -lactâmico e uma consequente perda de massa no cristal^{5;9;10;20;21;23}

A proporcionalidade linear entre a variação da frequência de oscilação com a variação de massa depositada sobre a superfície de um cristal de quartzo proposta por G. Sauerbrey, em 1959, é um dos princípios fundamentais envolvidos na técnica de EQCM.^{20;21;23}

Na relação obtida por Sauerbrey, o filme é tratado como uma extensão da espessura do cristal de quartzo e desta forma a equação de Sauerbrey só se aplica

quantitativamente a sistemas que obedecem às seguintes condições: a massa depositada deve ser rígida e distribuída uniformemente com um $\Delta f/f$ menor que 2%. A equação foi desenvolvida para oscilação no ar e só se aplica quantitativamente a massas rígidas acopladas ao cristal.^{21;23}

Entretanto, as medidas podem ser realizadas na forma líquida observando-se que uma variação de frequência corresponderá a uma variação de massa, mas a intercambialidade entre essas duas variáveis é qualitativa, nos casos em que $\Delta f/f$ maior que 2%.^{20;21;23}

A equação de Sauerbrey é dada por

$$\Delta f = \frac{-2f_0^2}{A\sqrt{\rho_q\mu_q}}\Delta m \quad (\text{Eq. 2})$$

em que f_0 é a frequência de ressonância (em Hz), Δf a variação de frequência (Hz), Δm a variação de massa (em g), A a área ativa do cristal piezelétrico (em cm²), ρ_q a densidade do quartzo (2,648 g cm⁻³) e μ_q o módulo de cisalhamento do cristal de quartzo para o corte AT (2,947x10¹¹ g cm⁻¹ s⁻²).

Considerando que as reações catalisadas por enzimas sejam saturáveis, a velocidade de catálise não indica uma resposta linear face ao aumento de substrato, definindo a curva de progresso da reação, ou seja, a reação tem um aumento de velocidade até atingir uma velocidade máxima relacionada à saturação da enzima, devido ao fato das reações bioquímicas ocorrerem em velocidade compatível às necessidades do organismo. Desta forma, torna-se possível a observação da catálise enzimática, em tempo real, quando satura-se a enzima acoplada no reator e mede a variação de frequência equivalente a formação do produto e/ou consumo de substrato.^{4;5;20;21;22;23}

1.6 Monocamada auto-organizada (SAM)

Nuzzo & Allara²⁴ descobriram, em 1983, que filmes de alcanotóis se formavam espontaneamente na superfície de ouro, cobre, prata e outros metais. Estes filmes foram chamados de monocamadas auto-organizadas e possibilitaram a modificação de uma superfície para que esta seja responsiva a uma reação química ou biológica de interesse.²⁵

O ouro passou a ser o mais utilizado na formação das SAM devido a sua resistência a oxidação e apresentar menos defeitos do que a prata e o cobre. As propriedades da monocamada são dependentes da rugosidade e estado químico da superfície metálica.²⁵

Apesar da facilidade da montagem destas monocamadas faz-se necessário um pré-tratamento da superfície para que os testes sejam fiáveis e reproduzíveis, o qual será discutido adiante.²⁵

Um dos parâmetros mais importantes em eletrocatalise é o controle da superfície do eletrodo, pois ele determina a atividade eletrocatalítica. A corrente gerada na transferência de carga na interface eletrodo-superfície eletroativa é diretamente proporcional à área real.²⁶

Objetivos

2 OBJETIVOS

O objetivo principal deste trabalho foi o de desenvolver um biossensor de penicilina e com ele realizar estudos para demonstrar a cinética enzimática, em tempo real.

Para objetivos específicos o trabalho experimental foi desenvolvido com dois tipos de abordagem, por técnica eletroquímica e piezoelétrica.

Na técnica eletroquímica: buscou-se obter valores para K_m a partir da variação de corrente elétrica em função do tempo, para isto, utilizou-se da cronoamperometria.

Ainda nesta fase, também foram usadas a voltametria cíclica (VC) e espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE) para caracterização do sensor desenvolvido.

Na técnica piezoelétrica: a partir da relação existente entre a variação de frequência vibracional do cristal de quartzo relacionada, inversamente, à deposição de material sobre a superfície metálica, observou-se a funcionalização do eletrodo e a reação enzimática .

Materiais e Métodos

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Reagentes e soluções

Utilizou-se da enzima penicilinase de *Bacillus cereus*, L-cisteína, etilo (dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC), *N* -hidroxi-succinimida (NHS), cloreto de cobalto, ácido sulfúrico, ferricianeto de potássio, ferrocianeto de potássio tri-hidratado e nitrato de potássio sendo todos comercializados pela Sigma-Aldrich®, tampão PBS pH 7,4, suspensões de alumina de 1 µm, 0,3 µm e 0,05 µm.

Desenvolveram-se as soluções necessárias para o desenvolvimento das atividades, sendo estas preparadas com reagentes de grau analítico e água deionizada obtida com resistividade $\geq 18 \text{ M}\Omega \text{ cm}$ a 25°C de um sistema Milli-Q Millipore® Simplicity UV.

Para obtenção do pH das soluções foi utilizado pHmetro multiprocessado da QUIMIS®.

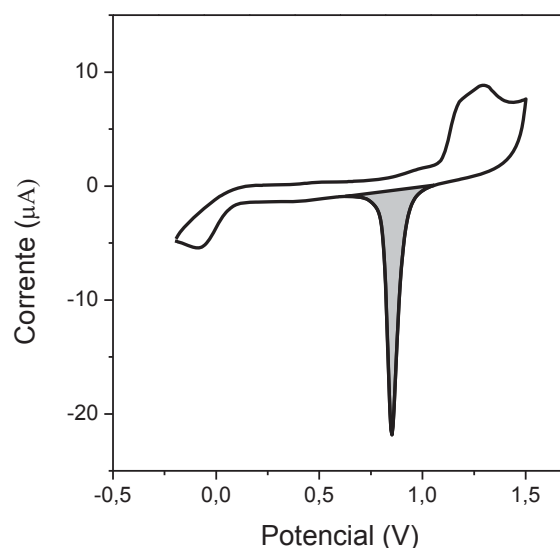
3.2 Preparo do eletrodo de trabalho

O eletrodo de ouro (Au) antes de ser funcionalizado necessita de um pré-tratamento, sendo que o protocolo utilizado consiste de uma limpeza em solução piranha 3:1 ($\text{H}_2\text{SO}_4:\text{H}_2\text{O}_2$) à 80°C, por 1 min, dessorção química com 1 mmol L⁻¹ de NaOH (preparado em água deionizada MilliQ®), em voltametria cíclica (VC), -0,5 V a -1,7 V *versus* calomelano KCl saturado, com velocidade de varredura de 0,1 V s⁻¹, 25 ciclos.

O eletrodo foi polido mecanicamente com pasta de alumina de diferentes granulometrias (1 µm, 0,3 µm, 0,05 µm, respectivamente nesta ordem) e posteriormente tratado eletroquimicamente, também chamado de limpeza eletroquímica. Este tratamento consiste em realizar VC em solução de ácido

sulfúrico (H_2SO_4) $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, com varredura de $-0,2 \text{ V}$ a $1,5 \text{ V}$ *versus* calomelano KCl saturado, 25 ciclos a uma velocidade de varredura de $0,1 \text{ V s}^{-1}$ e se obtêm um gráfico com o perfil indicado na Figura 4. Neste trabalho utilizou-se um intervalo de fator de rugosidade (F_r) entre 1 e 1,3 para que a área ativa (A_{ativa}) esteja o mais próximo da área geométrica.^{25;26}

Figura 4 - Voltamograma cíclico de limpeza eletroquímica.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Neste trabalho utilizou-se $400 \text{ } \mu\text{C cm}^{-2}$ como sendo a constante do ouro. Obtido a 100 mV s^{-1} com calomelano KCl saturado.

Esta VC foi utilizada integralização do pico da corrente catódica, destacado na Figura 4, para obtenção da área ativa do eletrodo, sendo de conhecimento que esta área é proporcional a quantidade total de carga, pode-se dividi-la pela constante de $400 \text{ } \mu\text{C cm}^{-2}$, resultando na área ativa de $0,0395 \text{ cm}^2$. A relação área ativa pela área geométrica nos remete ao fator de rugosidade, que no caso é de 1,25.^{25;26}

3.3 Desenvolvimento do sensor

Optou-se por estudar a cinética de forma separada, por isto foi utilizado o eletrodo de Au e cristais de quartzo. Entretanto, a técnica desenvolvida aplicou-se aos dois métodos, começando com a adsorção de um filme de aminoácido, a partir de uma solução de L-cisteína (10 mmol L^{-1}) em tampão fosfato-salino $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (PBS) com pH 7,4, onde serão imersos o eletrodo (medidas eletroquímicas) ou o cristal de quartzo (medidas piezelétricas) por 12 h. Posteriormente foi feita uma lavagem com PBS em abundância e em seguida água deionizada. O eletrodo foi seco com gás nitrogênio (N_2).

Em um segundo momento, adicionou-se uma solução de EDC (10 mmol L^{-1}) e NHS (20 mmol L^{-1}) preparado em água deionizada por 2 h para ativar a monocamada.

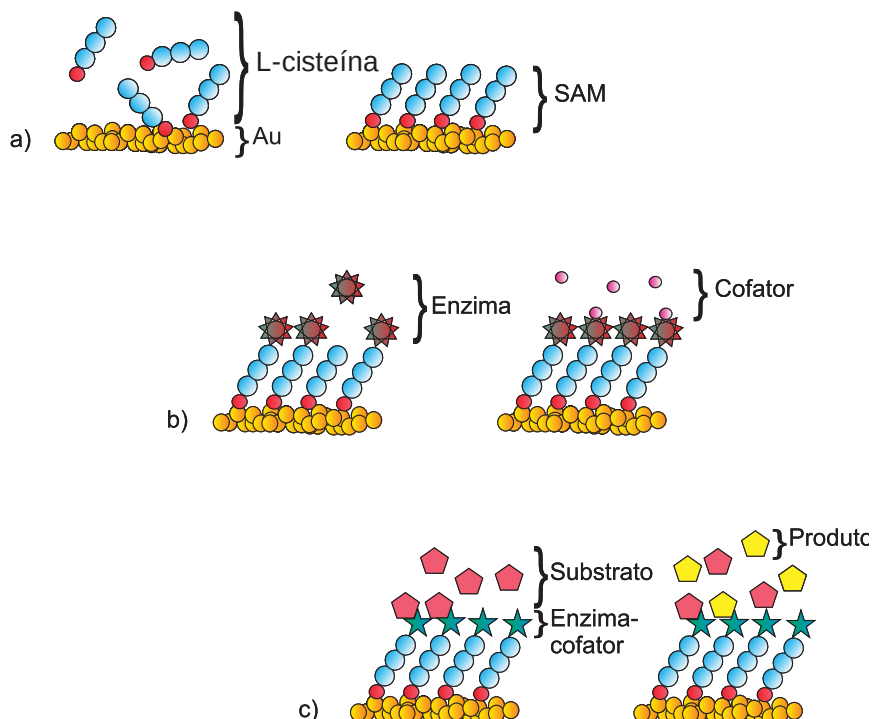
Adsorveu-se o mediador de elétrons, solução de cloreto de cobalto (1 mmol L^{-1}) em PBS, o qual foi mantido por 2 h, para que este fizesse parte do dispositivo.

Por último foi adicionado a enzima penicilinase numa concentração de $0,15 \text{ mg mL}^{-1}$, por 2 h.

Em todas as etapas, o eletrodo e o cristal, foram lavados e secos como na primeira vez.

Cada processo de acoplamento foi avaliado por voltametria cíclica com o analito para garantir que a reação não ocorresse de outra forma que não fosse pela atividade enzimática. A Figura 5 apresenta, de forma esquematizada, a formação do sensor enzimático e seu funcionamento.

Figura 5 - Configuração do dispositivo e seu funcionamento.



Fonte: Elaborado pelo autor.

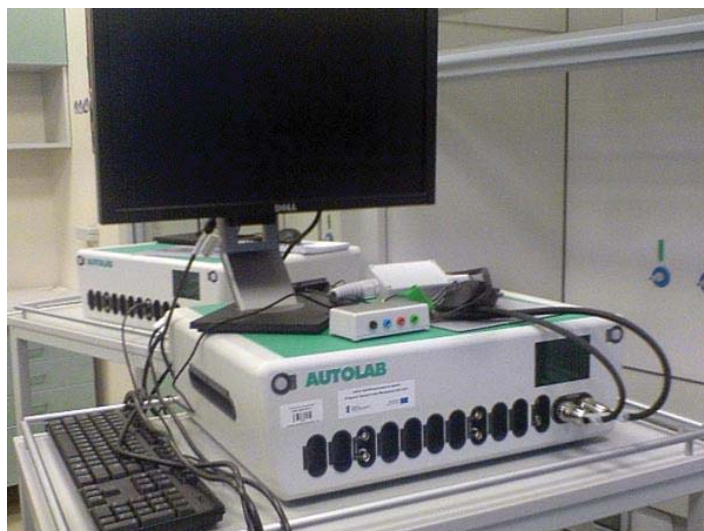
Na Figura 5 (a) observou-se a adsorção (enxofre liga-se ao ouro) e organização dos aminoácidos sobre a superfície metálica (formação da monocamada de L-cisteína (SAM)); em (b) a ligação das enzimas na SAM e sua ativação pelo cofator, mudando a conformação do sítio ativo; e em (c) enzima-cofator reagindo com substrato formando produto.

3.4 Medidas eletroquímicas

As medidas foram obtidas por um potenciostato/galvanostato da AUTOLAB® (PGSTAT302N, METROHM®) acoplado a um computador para análise e aquisição de dados, Figura 6. A reação ocorre em uma cela eletroquímica de 3 eletrodos, respectivamente, um de trabalho, que no caso é o biossensor de penicilinase, o

calomela em KCl saturado, como eletrodo referência e um eletrodo auxiliar de platina (Pt), como contra eletrodo.

Figura 6 - AUTOLAB® (PGSTAT302N, METROHM®).



Fonte: Elaborado pelo autor.

No caso utilizou-se da voltametria cíclica (VC) e espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE) para caracterizar o funcionamento do dispositivo e cronoamperometria para quantificar o analito, penicilina G, que foi degradado.

O biossensor de penicilinase foi construído sobre a superfície de ouro no formato de disco, como os da Figura 7.

Figura 7 - Eletrodos de trabalho.



Fonte: Metrhom Autolab B. V. Disponível em:
<http://www.ecochemie.nl/Products/Echem/Accessories/Metal_WE.html>. Acesso
em: 4 jul. 2013.

Da esquerda para direita: eletrodo vazio, de prata, de ouro, de platina e de carbono vítreo.

3.4.1 Voltametria cíclica (VC)

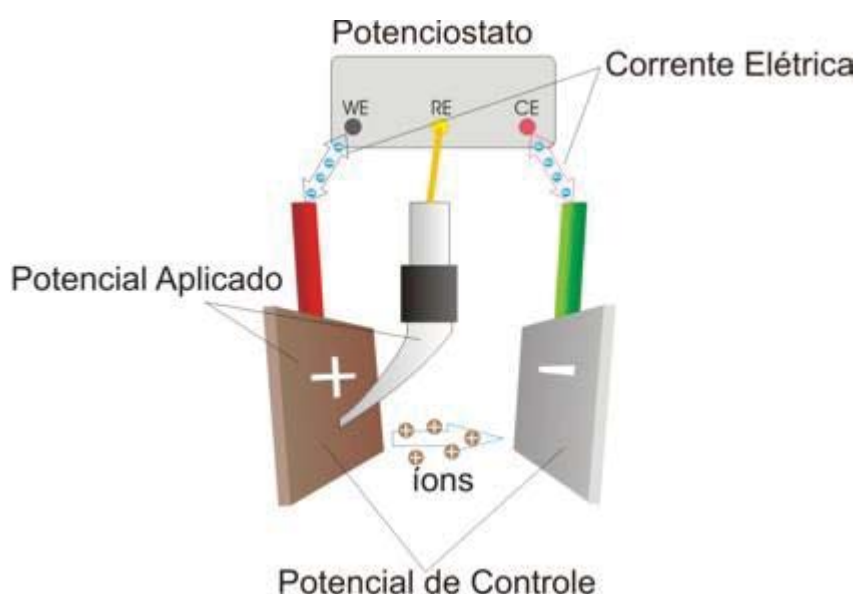
A Voltametria Cíclica é descrita por Burke & Murphy como uma técnica eletroquímica importante para a determinação da área superficial de um eletrodo, a qual consiste da imersão de eletrodos em uma solução eletrolítica para obtenção da corrente capacitiva na dupla camada elétrica, onde nenhuma reação eletroquímica ocorre, em diferentes potenciais. Isto permite, em velocidades de varredura diferentes, a determinação direta da superfície de contato entre o eletrólito e a condução eletrônica.^{26;27;28}

São utilizados três eletrodos para obter informações qualitativas e quantitativas sobre o sistema em solução com espécies eletroativas, sendo estes:

eletrodo de trabalho biofuncionalizado com a penicilinase, eletrodo de referência (calomelano) e um contra eletrodo de platina.

Neste sistema é possível observar o processo de oxirredução em uma ampla faixa de potencial. A Figura 8 esquematiza uma célula eletroquímica de um potenciostato/galvanostato.

Figura 8 - Esquema de um potenciostato/galvanostato ligado à uma célula eletroquímica de 3 eletrodos.



Fonte: Disponível em: <http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/9/92/Potenciostato4.jpg>. Acesso em: 4 jul. 2013.

O potenciostato deve controlar o potencial do eletrodo de trabalho em relação ao eletrodo de referência, manter o potencial e a corrente elétrica entre o eletrodo de trabalho e o contra eletrodo estáveis.

3.4.2 Espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE)

A EIE é uma técnica eletroquímica de alta sensibilidade utilizada em detecções de eventos elétricos complexos de uma interface eletrodo/solução, sendo esta uma técnica de estado estacionário, pois o estado eletroquímico não se altera com o tempo.²⁹

Este método relacionou capacitância com resistência, aplicando um potencial alternado com diferentes valores de frequência para determinar a capacitância.^{29;30;31}

A EIE é usada para se obter informações sobre as propriedades de sistemas, no caso o biossensor, tais como a reatividade da interface, a corrosão, a adesão e a presença de defeitos. Principalmente, estudar comportamentos corrosivos de superfície.^{30;31}

A EIE utiliza de sinais muito pequenos que não perturbam as propriedades do eletrodo, tornando possível estudar reações de corrosão em meios de baixa condutividade e possibilita em uma única medida estabelecer os valores da resistência de polarização e a capacitância da dupla camada.^{29;30}

Em um circuito de corrente alternada o potencial elétrico $E(t)$ varia com o tempo de acordo com a expressão:

$$E(t) = A \cdot \cos \omega \cdot t \quad (\text{Eq. 3})$$

onde $\omega = 2\pi f$, sendo f a frequência em que se dá a oscilação da corrente em Hz (Hertz), e ω é expresso em radianos. E a relação entre o potencial e a corrente pode ser expressa conforme a expressão seguinte:

$$E(t) = Z \cdot i(t) \quad (\text{Eq. 4})$$

onde Z é a impedância e $i(t)$ a corrente em determinado tempo.²⁹

O potenciostato aplica um potencial alternado e a resposta obtida pelo detector é a corrente, enquanto no galvanostato é o inverso.^{29;30}

3.4.3 Cronoamperometria

Resumidamente, a cronoamperometria é uma das técnicas eletroquímicas tradicionais, que determina a corrente elétrica, relacionada com a concentração das espécies oxidadas ou reduzidas, que flui através do eletrodo de trabalho em função do tempo, em um potencial constante, previamente estabelecido. Onde a carga Q envolvida no processo pode ser calculada através da área sob a curva obedecendo a Equação 5, na qual i é a corrente e dt é a variação do tempo.

$$Q = \int_0^t i dt \quad (\text{Eq. 5}).^{32;33}$$

3.5 Medidas piezelétricas

Utilizou-se de uma Microbalança Eletroquímica de Cristal de Quartzo (EQCM-D) da Q-Sense®, modelo E4 Auto, para obter as variações de frequência referentes ao acoplamento de substrato e formação de produtos acoplados a um computador para análise e aquisição de dados.

Figura 9 - EQCM-D E4 Auto (Q-Sense®).



Fonte: dp UNION®. Disponível em:

<http://www.dpunion.com.br/Produto_Detail.aspx?D=901>. Acesso em: 20 jul.2013.

Cristais de quartzo foram utilizados como eletrodos de trabalho, QSX-301, especificações: corte AT, frequência fundamental de $4,95 \text{ MHz} \pm 50 \text{ KHz}$, 14 mm de diâmetro e 0,3 mm de espessura.

Figura 10 - Cristais de quartzo recoberto por ouro.



Fonte: Qsense®. Disponível em: <<http://qsense.com/products/q-sense-sensors/q-sense-custom-made-sensors-1>>. Acesso em: 4 jul. 2013.)

A palavra piezo vem do grego *piezein* que significa pressionar. Piezeletricidade ("eletricidade de pressão"), nome proposto por Hankel, em 1881, para nomear o fenômeno descoberto no ano anterior pelos irmãos Pierre e Jacques Curie, o qual define-se pela capacidade de alguns materiais se tornarem eletricamente polarizados quando sujeitos a algum tipo de stress. Principais propriedades piezoelétricas:

- Quando ocorre uma deformação homogênea o material torna-se polarizado, ou seja, o material manifestará um campo elétrico interno quando sob ação de forças que o deformam. O mesmo, sobre o efeito inverso, se submetê-lo a um campo elétrico ele se deforma, denominando eletrostrição, ou seja, variação das dimensões de um dielétrico sob a influência de um campo elétrico.
- É dependente da orientação do eixo de simetria do material, para determinar o quanto as dimensões irão variar, podendo se obter diversos tipos de deformações.
- Materiais que apresentam esta propriedade: cristal de quartzo, o sal de Rochelle, o titanato de bário, entre outros.
- No caso do cristal de quartzo, se excitá-lo com placas de metal formando um capacitor e utilizar uma corrente de alta frequência, formam-se ondas estacionárias na frequência de ressonância.³⁴

3.6 Otimização das condições

Diversos fatores influenciam a ação enzimática, dentre eles: o pH, a temperatura, concentração da enzima e concentração do substrato.

As melhores condições de trabalho para o tampão e demais soluções referidas neste trabalho foram qualificadas por Prado (2012).³⁵

Os potenciais a serem aplicados (anódico ou catódico), na cronoamperometria, e demais variáveis foram estudados e otimizados, exclusivamente, para os objetivos deste trabalho.

3.6.1 pH

Curvas foram obtidas sob a influência da variação do pH para ser analisado o pH ótimo em relação à atividade enzimática.

As enzimas, por serem formadas de aminoácidos, possuem grupos químicos ionizáveis (carboxilas, grupamentos amino, tióis, entre outros), podendo estes ter cargas negativas, positivas ou neutras de acordo com o pH do meio. Cada enzima tem seu pH ótimo, uma pequena variação de pH pode fazer com que a enzima sofra mudanças conformacionais.³⁵

3.6.2 Temperatura

Os aumentos de temperatura aceleram as reações químicas, a cada 10°C de aumento, duplica-se a velocidade da reação. Em temperaturas baixas, as enzimas encontram-se muito rígidas. Entretanto, por se tratar de proteínas uma temperatura muito alta leva a desnaturação, pois a mesma perde sua conformação.^{34;35}

3.6.3 Concentração da enzima

Quando se tem substrato em excesso no sistema, a velocidade inicial da reação enzimática é diretamente proporcional à concentração de enzima.³⁵

3.6.4 Concentração do substrato

As reações catalíticas que ocorrem no organismo devem ter velocidade compatível. Esta velocidade é obtida pelo consumo de substrato ou formação de produto frente a unidade de tempo. A reação atinge uma velocidade máxima mesmo em elevada concentração de reagente, pois depende de outros fatores.³⁵

Resultados e Discussões

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 Qualificando o biossensor

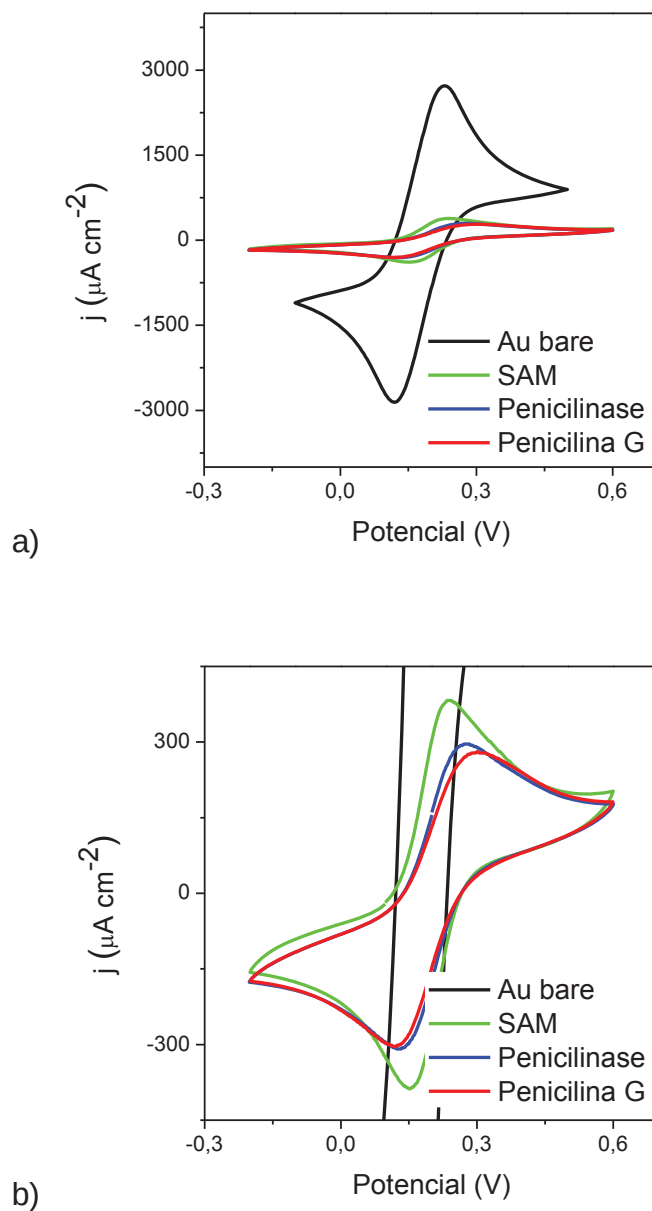
Os biossensores eletroquímicos são dispositivos capazes de fornecer sinais analíticos do meio operacional através do uso de componentes biológicos como parte do sensor, sendo o biocomponente responsável pela alta seletividade molecular e pela formação de produtos detectáveis.³⁴

A voltametria cíclica é uma técnica eletroquímica onde as informações qualitativas e quantitativas de uma espécie química são obtidas a partir do registro de curvas corrente-potencial, feitas durante a eletrólise dessa espécie em uma cela eletroquímica constituída por um eletrodo de trabalho, ou seja, o eletrodo de ouro, um eletrodo de referência de calomelano e um contra eletrodo de platina. O potencial é aplicado em forma de varredura, isto é, variando-o a uma velocidade constante em função do tempo. O potencial e a corrente resultante são registrados simultaneamente. A curva corrente vs. potencial obtida é chamada de voltamograma.^{34;35;36}

Para assegurar a efetividade do experimento, cada etapa de montagem foi testada para verificar a ocorrência do bloqueio da superfície de ouro do eletrodo de trabalho, para isso realizou-se voltametrias cíclicas após cada etapa de adsorção na superfície metálica.

Foi utilizado na cela uma solução de ferricianeto de potássio (1 mmol L^{-1}), adicionalmente a ferrocianeto de potássio tri-hidratado (1 mmol L^{-1}) e nitrato de potássio ($0,5 \text{ mol L}^{-1}$), conhecida como solução de ferri/ferro, para que possibilite a troca eletrônica da interface com o meio.

Figura 11 - Voltametrias cíclicas com solução de ferri/ferro, mostrando o bloqueio da superfície de ouro.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Meio eletrolítico de ferri/ferro 1 mmol L^{-1} em eletrólito de suporte $\text{KNO}_3 \text{ } 1 \text{ mol L}^{-1}$. penicilina G a 1 mmol L^{-1} . (a) Indica os valores globais de corrente. (b) Ampliação de (a) na região de correntes bloqueadas.

Na Figura 11 (a), observou-se que ocorre um decréscimo nas correntes anódicas e catódicas, ou seja, a monocamada de L-cisteína impede a passagem de elétrons, responsáveis pela oxidação e redução, $Fe^{+2} \leftrightarrow Fe^{+3} + e^{-}$, porém há transferência eletrônica, mas em quantidade diminuta.

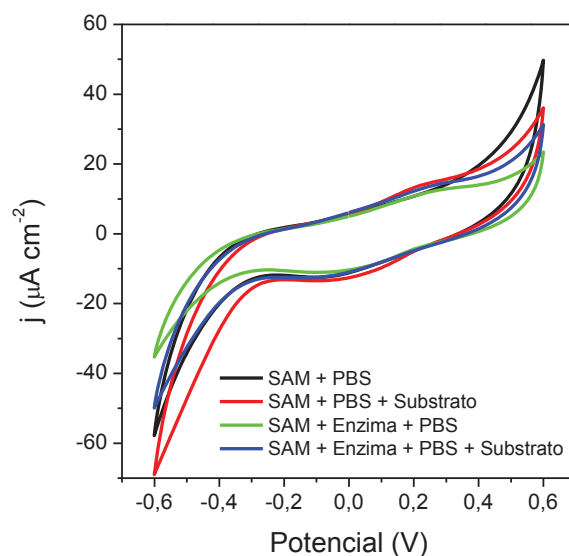
Para fins comparativos, ampliou-se a imagem na região onde ocorreu bloqueio da corrente, podendo analisar que ao ser adsorvida, a enzima penicilinase, há um novo impedimento e quando se coloca a penicilina G, sem mediador de elétrons, também ocorre, porém discreto. Visto que, não há presença de $CoCl_2$ (catalisador) a penicilina não apresenta atividade catalítica e, portanto, correntes associadas a uma reação desta enzima com o substrato não foram detectadas nestes voltamogramas.

Estes biossensores com superfícies modificadas por SAM são muito atrativos. Combinam alta sensibilidade dos métodos eletroquímicos tradicionais com novas possibilidades de aumento de seletividade e estabilidade promovida pela monocamada. O planejamento molecular da superfície visa atender as necessidades específicas do sensor em função de sua aplicação. Tais manipulações realizadas na superfície oferecem novos níveis de aplicabilidade e reatividade, o que vem a ampliar o seu alcance, como observado neste trabalho.³⁷

4.2 Especificidade da penicilina G pela enzima

Nesta etapa, buscou-se comprovar, por voltametria cíclica, que o consumo do substrato ocorreria somente na presença de sua enzima específica. Sendo assim, na Figura 12 observou-se que a transferência eletrônica característica de catálise enzimática ocorreu, porém em baixa quantidade devido à ausência do mediador de elétrons (catalisador enzimático).

Figura 12 - Voltametria cíclica que garante a não degradação do substrato.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Penicilina G $0,65 \text{ mmol L}^{-1}$. Meio eletrolítico: PBS $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7,4. Velocidade de varredura de 100 mV s^{-1} .

Notou-se que a ausência do mediador de elétrons fez com que não houvesse nenhuma evidência de corrente catalítica, como esperado. Necessitou-se da adição do CoCl_2 ao sistema para que se obtivesse um voltamograma típico de catálise enzimática, o qual foi demonstrado na Figura 13.

4.3 Efeito do cofator e do mediador de elétrons

Algumas enzimas não necessitam de componentes adicionais para mostrarem uma atividade completa, como a quimiotripsina (enzima que hidrolisa proteína) ou triosefosfato isomerase, que são ativas na ausência do cofator. No entanto, outras requerem ligação a moléculas não protéicas para que possam exercer a sua atividade. Os cofatores podem ser inorgânicos (íons metálicos) ou compostos orgânicos (flavina ou heme). Estas moléculas ligam-se às enzimas, são normalmente encontradas no sítio ativo e estão envolvidas na reação catalítica.^{4;5}

A natureza essencial de tais cofatores explicam por qual razão os organismos necessitam de quantidades diminutas de certos elementos em sua dieta.^{4;5}

A Tabela 3 exemplifica alguns cofatores.

Tabela 3 - Exemplos de elementos inorgânicos que servem como cofatores.

Elementos inorgânicos que servem como cofatores das enzimas	
Cu²⁺	Citocromo oxidase
Fe²⁺	Citocromo oxidase, catalase, peroxidase
ou	
Fe³⁺	
K⁺	Piruvato quinase
Mg²⁺	Hexoquinase, glicose-6-fosfatase, piruvato quinase
Mn²⁺	Arginase, ribonucleotídeo redutase
Mo	Dinitrogenase
Ni⁺²	Urease
Se	Glutathiona peroxidase
Zn²⁺	Anidrase carbônica, desidrogenase alcoólica, carboxipeptidase A e B

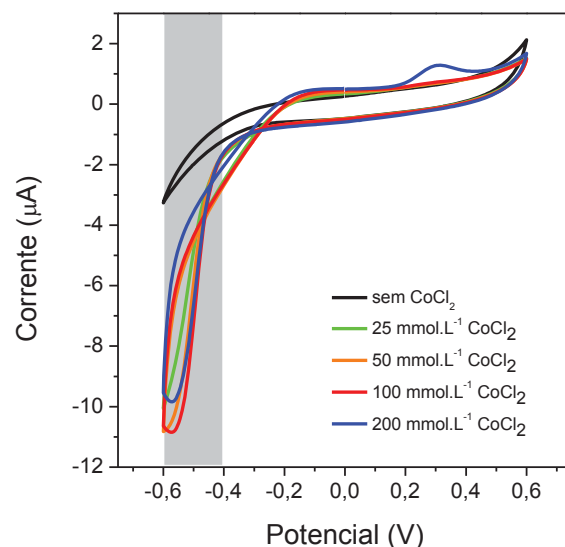
Fonte: Disponível em: <[http://pt.wikipedia.org/wiki/Cofator_\(bioqu%C3%ADmica\)](http://pt.wikipedia.org/wiki/Cofator_(bioqu%C3%ADmica))>. Acesso em 6 set. 2013.

Alguns metais pesados podem se ligar às enzimas, pois o Cd²⁺ e o Hg²⁺ pertencem ao mesmo grupo da tabela periódica do Zn²⁺, entretanto eles inativam as enzimas.

Desta forma, na presença do cofator, um sinal analítico típico de catálise enzimática passa a ser observado nos padrões voltamétricos.

Para obtenção deste, foi acrescido à última fase do experimento soluções de diferentes concentrações de cloreto de cobalto junto com a penicilina, para que o cobalto, um íon bivalente (Co⁺²), exerça a função de mediador de elétrons (catalisador da reação enzimática), ou seja, neste caso houve a necessidade de um catalisador que doasse elétron para a enzima para que ela se reestabelecesse, demonstrando sua influência na atividade oxirredutiva.³⁴

Figura 13 - Voltametria cíclica com diferentes concentrações do CoCl_2 .



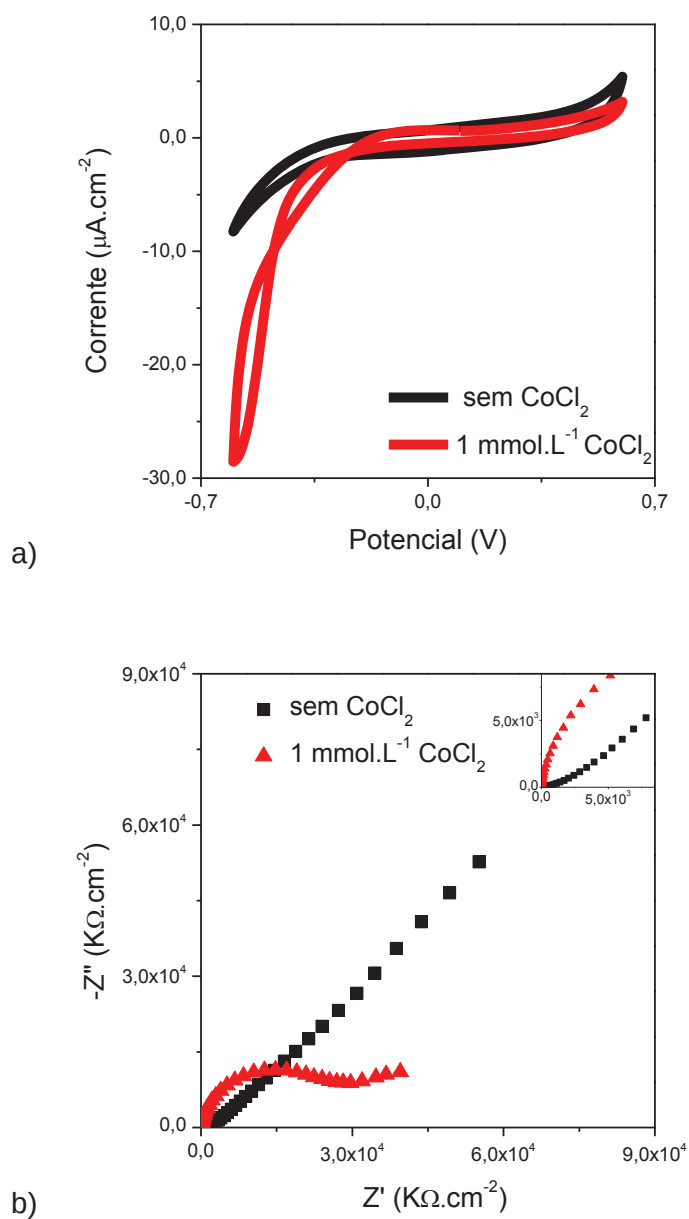
Fonte: Elaborado pelo autor.

Realizado em PBS 0,1 mol L^{-1} pH 7,4. Velocidade de varredura de 100 mV s^{-1} . Penicilina G 0,65 mmol L^{-1} .

Comprovou-se a necessidade da presença de um mediador de elétrons, como observado na Figura 13. A faixa cinza indicou o melhor intervalo de potencial para indução de atividade catalítica da enzima.

Para que a enzima exerça sua função catalítica adsorveu-se o mediador de elétrons à configuração do sensor, para isto utilizou-se de 1 mmol L^{-1} do CoCl_2 em solução aquosa (Figura 14), imerso por 2 h, inserindo mais uma etapa, após a ativação do filme de L-cisteína por EDC/NHS. Observou-se que a resposta foi satisfatória, pois continuou a se obter uma voltametria de catálise enzimática como anteriormente.

Figura 14 - VC e EIE, realizadas com e sem cofator.



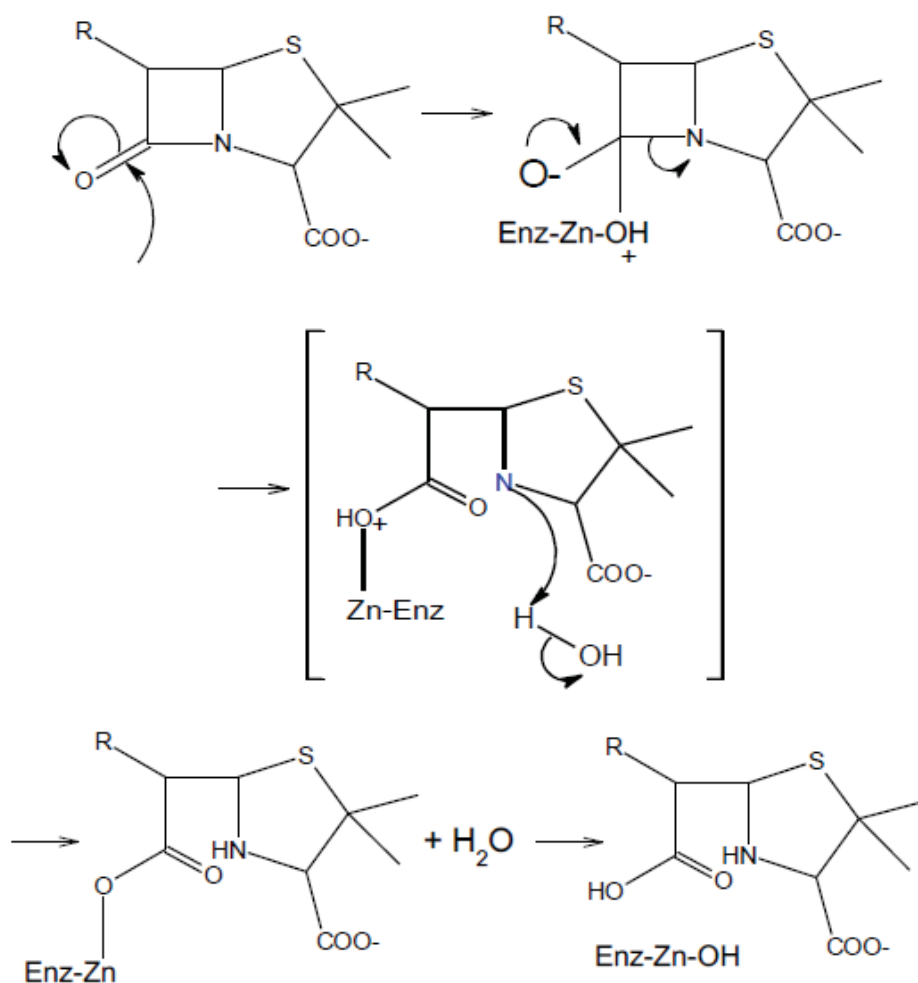
Fonte: Elaborado pelo autor.

(a) Voltametria cíclica (VC) sem e com 1 mmol L^{-1} de CoCl_2 adsorvido no biossensor de penicilina. Velocidade de varredura de 100 mV s^{-1} . Eletrodo de referência: calomelano KCl saturado. (b) Espectroscopia de Impedância

Eletroquímica (EIE) sem e com 1mmol L^{-1} de CoCl_2 , realizada em potencial de circuito aberto. Eletrodo de referência: calomelano KCl saturado.

Observou-se na Figura 14, especificamente na VC, um bloqueio de corrente relacionado a ausência de cofator, pois este trabalha como mediador de elétrons para que a reação de oxirredução aconteça, podendo esta ser comprovada pela EIE na mesma figura, ou seja, a resistência é bem maior na reação que não tem cofator. A resistência torna-se menor na presença de cofator, observada pela formação do semicírculo, isto é, quanto menor o diâmetro do semicírculo, menor a resistência e maior a facilidade de troca de elétrons.

Figura 15 – Possível mecanismo de ação de β -lactamases sobre a penicilina.

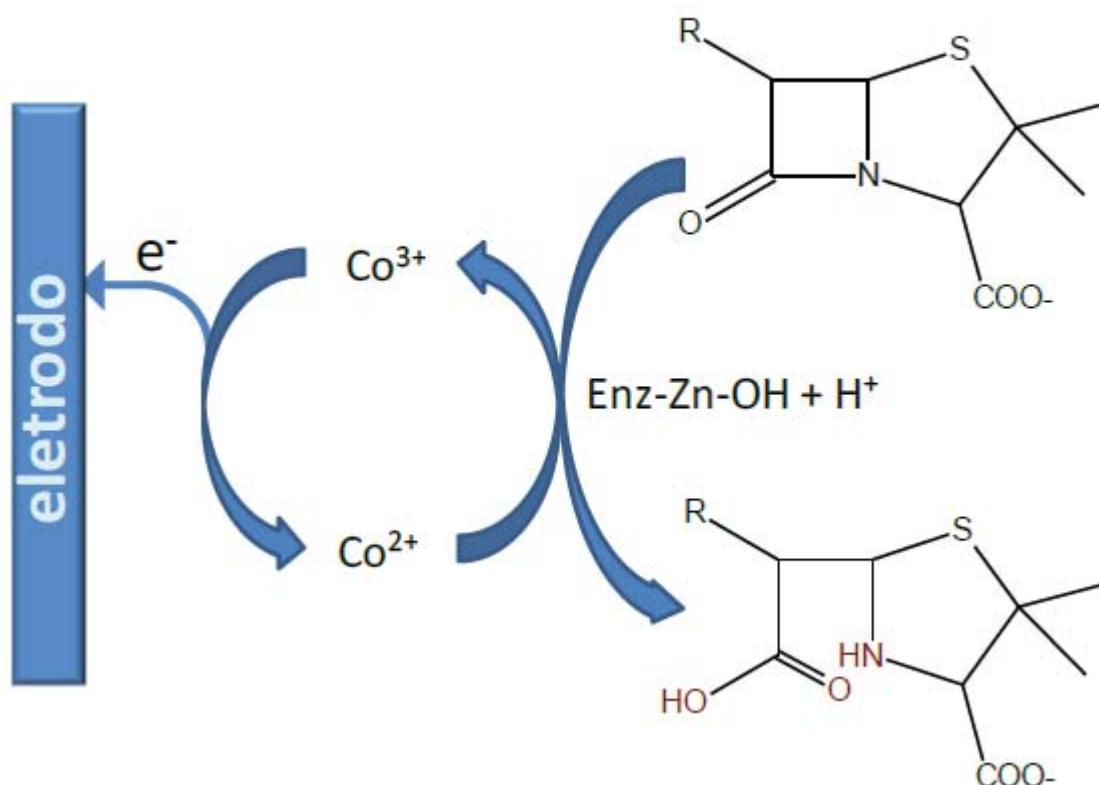


Fonte: PRADO (2012)³⁴.

A Figura 15 sugere que o sítio ativo orienta e polariza o anel β -lactâmico para facilitar o ataque nucleofílico pela ligação do íon zinco (ou cobalto) a água e/ou hidroxila, indicando que a penicilina necessitou receber elétron (reduzir-se) para que seu anel fosse rompido.³⁴

A adsorção do mediador ao sensor o classifica como um biossensor de 2ª geração, permitindo que este seja operado em um potencial menor relacionado ao potencial requerido sem o CoCl_2 , com reversibilidade no estado de oxidação como visto na Figura e diminuindo as interferências nas análises.³⁴

Figura 16 – Mecanismo proposto para a ação do CoCl_2 como mediador de elétrons no biossensor.



Fonte: Adaptado de PRADO (2012).³⁴

Após esta etapa, determinou-se que o melhor potencial para análise cronoamperométrica seria -550 mV, ou seja, com este potencial aplicado, a enzima

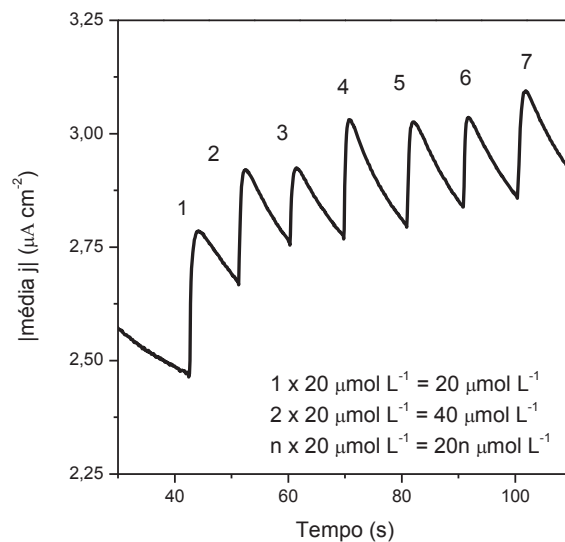
doaria elétrons e os recuperaria com facilidade, de forma que a atividade redox catalítica fosse maximizada ao redor deste potencial.

4.4 Medidas cronoamperométricas

A cronoamperometria é uma das técnicas eletroquímicas tradicionais e consiste no registro da corrente gerada (i), pela oxidação ou redução de espécies devido a um potencial externo aplicado (de oxidação ou de redução), em função do tempo (t).³⁸

Após as análises voltamétricas puderam-se definir quais as melhores condições, em relação ao potencial aplicado, concentrações e pH, para com isto obter a Figura 17, na qual relaciona-se o aumento do sinal de corrente elétrica pelo tempo, ou seja, a cada adição de penicilina G nas concentrações de 20,40,60,80,100,120,140 $\mu\text{mol L}^{-1}$, respectivamente, tem-se um aumento de densidade de corrente. Todos os resultados obtidos em triplicata, porém será apresentado a média obtida em módulo, sendo que o comportamento foi bastante similar e o desvio entre as medidas menor que 5%.

Figura 17 - Perfil cronoamperométrico obtido por adições sucessivas de 20, 40, 60, 80, 100, 120, 140 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de antibiótico β -lactâmico.

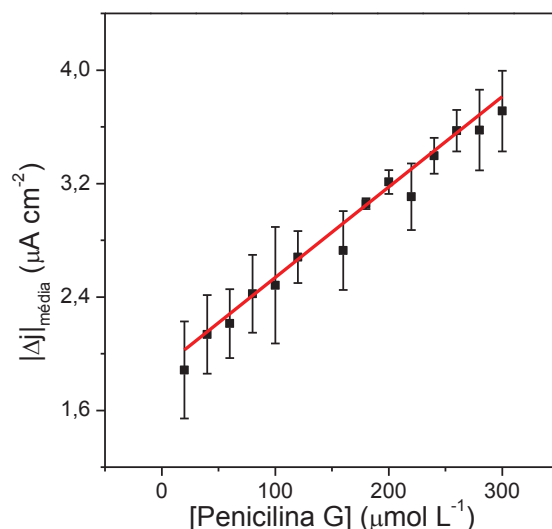


Fonte: Elaborado pelo autor.

Realizado em tampão PBS 0,01 mol L^{-1} pH 7,4. E_{app} = - 550 mV *versus* eletrodo de calomelano KCl saturado.

Com a otimização dos parâmetros e do biossensor conseguiu-se uma faixa de resposta linear, apresentado na Figura 17.

Figura 18 - Gráfico de “Michaelis-Menten”.



Fonte: Elaborado pelo autor.

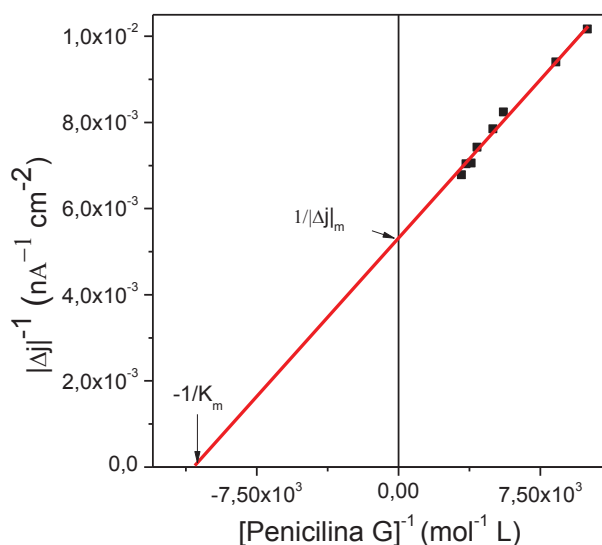
Foi delineado a parte que apresenta dependência linear. Onde o fator de correlação é 0,97, sendo o intercepto $1,90 (\pm 5,72 \times 10^{-2}) \mu\text{A cm}^{-2}$ e coeficiente angular de $6,38 \times 10^{-3} (\pm 3,03 \times 10^{-4}) \mu\text{A cm}^{-2} \mu\text{mol L}^{-1}$.

O estudo realizado da cinética enzimática leva a concluir que o biossensor segue a cinética de “Michaelis-Menten”, porém não apresentou hiperbólico (ver Figura 1 (a)), ou seja, a $|\Delta j|$ aumenta até atingir $|\Delta j|_m$ (valor máximo) sendo esta limitada pela etapa em que o complexo (ES) forma (E) + (P), onde $K_m = |\Delta j|_m/2$, mas não ocorreu devido às baixas concentrações de analito utilizado. Mesmo assim, optou-se trabalhar na faixa de concentração em que a resposta mantinha-se linear.^{39;40}

Plotou-se o gráfico de “Lineweaver-Burk” (Figura 17), ou duplo recíproco, podendo se obter a constante aparente de “Michaelis-Menten” (K_m) por extrapolação da reta ao eixo da abcissa, referente a $[\text{Penicilina G}]^{-1}$, tendo-se que, $K_m^{-1} = -[\text{Penicilina G}]^{-1} (\text{mol}^{-1} \text{L})$, quando $y = 0$. O K_m obtido desta forma foi de $94,4 \mu\text{mol L}^{-1}$, apresentando compatibilidade com a referência fornecida pela Sigma-Aldrich® ($60 \mu\text{mol L}^{-1}$), sabendo-se que K_m é inversamente proporcional a afinidade da enzima pelo seu substrato, pode-se inferir que há uma afinidade elevada da

penicilinase com a penicilina G, que mesmo imobilizada na SAM manteve sua atividade catalítica.^{39;40;41;42;43}

Figura 19 - Gráfico do duplo recíproco ou “Lineweaver-Burk” para os valores obtidos na Figura 18.



Fonte: Elaborado pelo autor.

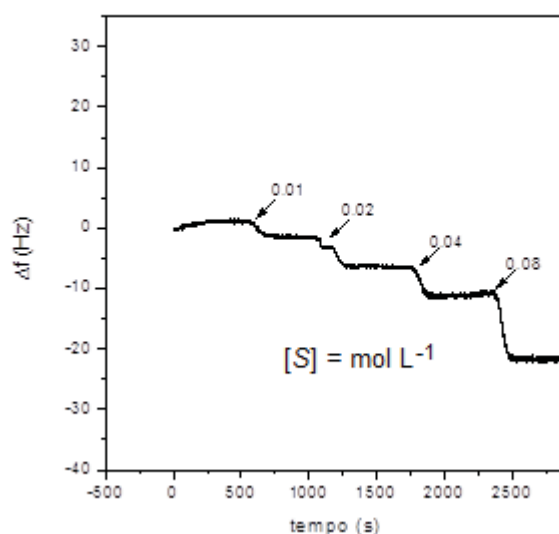
Quando $x = 0$ obtêm $1/v_m$, neste caso, $1/|\Delta j|_m$ ($\text{nA}^{-1} \text{cm}^2$), e quando $y = 0$, têm-se $-1/K_m$. K_m obtido dos dados foi de $94,4 \mu\text{mol L}^{-1}$ (sendo que a referência fornecida pelo fabricante (Sigma Aldrich®) foi de $60 \mu\text{mol L}^{-1}$). Onde o fator de correlação obtido foi de 0,99, intercepto igual a $5,27 \times 10^{-3} (\pm 1,19 \times 10^{-4}) \text{ nA}^{-1} \text{cm}^{-2}$ e coeficiente angular de $4,98 \times 10^{-7} (\pm 2,01 \times 10^{-8}) \text{ nA}^{-1} \text{cm}^{-2} \text{ mol L}^{-1}$.

4.5 Perfil piezelétrico

Passou-se a considerar como frequência de 0 Hz, quando todos os reagentes estariam adsorvidos na superfície do biossensor, incluindo a enzima penicilinase.

Quando adicionado a penicilinase à superfície do sensor e foi obtida a resposta esperada, ou seja, a partir da adição de diferentes concentrações de analito, em solução, constatou-se uma relação entre aumento da concentração *versus* diminuição da frequência vibracional do cristal de quartzo, como visto na Figura 21.

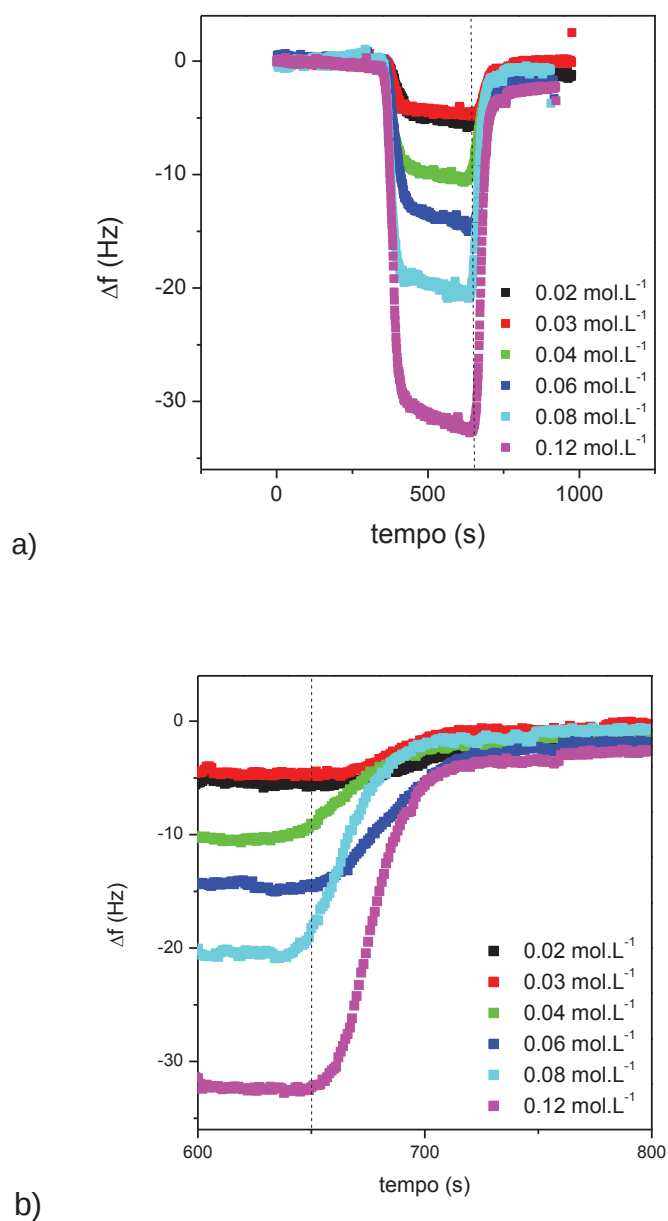
Figura 20 - Gráfico piezelétrico para diversas concentrações de analito.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Realizaram-se medidas com adições sucessivas de soluções de substrato com concentração de 0,01 mol L⁻¹, 0,02 mol L⁻¹, 0,04 mol L⁻¹, 0,08 mol L⁻¹, respectivamente, para observar a variação de frequência (Δf) correspondente, em tempo real, conforme observado na Figura 21.

Figura 21 – Gráficos das reações enzimáticas para diferentes concentrações de substrato.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Observou-se na Figura 22 (a) curvas referentes a formação do complexo intermediário (*ES*), curva descendente e formação de produto (curva ascendente ou curva progresso) respectivamente. Enquanto em (b) têm-se as curvas de progresso,

em destaque, para diferentes concentrações de substrato. Em 650 s foi parado o fluxo para que a enzima reagisse com o substrato e nos desse a curva de progresso referente a este processo relacionando a formação do produto pelo tempo e/ou o consumo do substrato pela enzima num dado período.

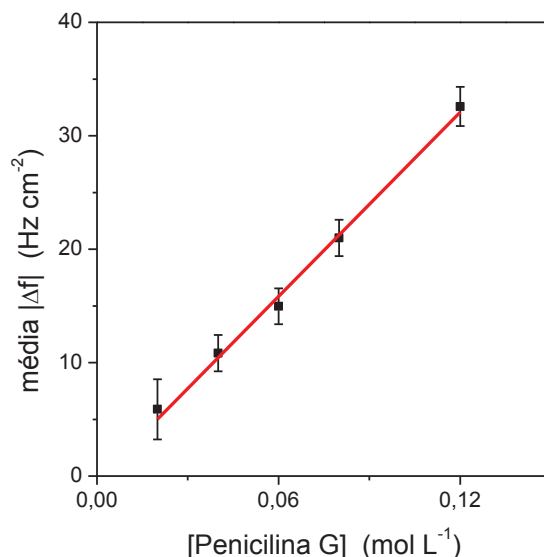
No intervalo de tempo 300-500 s observou-se que houve uma diminuição na frequência vibracional do cristal remetendo a formação do complexo (ES), conforme discutido e apresentado, anteriormente, na Figura 3.

No intervalo de 300-650 s, aproximadamente, constatou-se que a vibração variou pouco indicando o equilíbrio da enzima-substrato, a partir de 650 s o fluxo foi interrompido, obtendo P_0 (concentração de produto inicial) e foi observada a formação da curva de progresso, mostrando o consumo do substrato e/ou a formação do produto até o valor de P_{max} (concentração de produto máxima, em torno de 800 s).

Constatou-se que conforme aumentou a concentração de substrato houve uma diminuição progressiva na variação de frequência de vibração do cristal, isto pode ser explicado pela quantidade de massa maior acoplada à enzima adsorvida na superfície de ouro do cristal de quartzo (no intervalo de 300-600 s).

A partir das variações obtidas pela formação do produto (Figura 22), calculou-se as médias das triplicatas e se plotou a função linear, apresentada na Figura 23. O artigo de Ngeh-Ngwainbi, Suleiman & Guilbault discorreu sobre outros modos de se projetar e obter um biossensor de cristal piezelétrico.⁴³

Figura 22 - Gráfico das médias de variação de frequência pela concentração de Penicilina G.



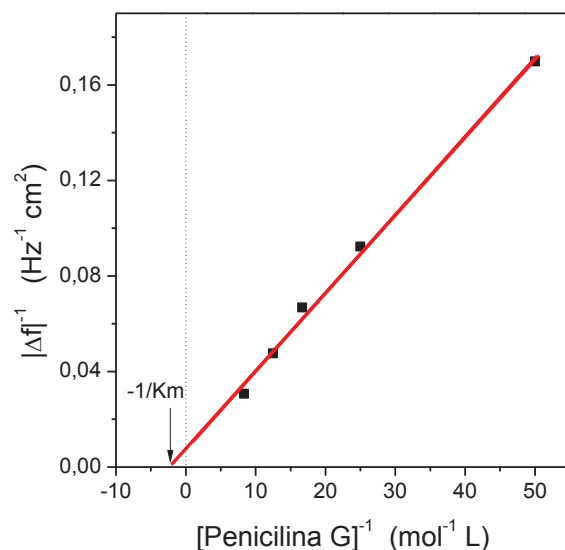
Fonte: Elaborado pelo autor.

Na Figura 23 visualizou-se a média com seu desvio padrão para cada concentração obtido da curva progresso. Fator de correlação aproximadamente 0,99.

Uma vez que a penicilinase segue a cinética enzimática de “Michaelis-Menten”, isso nos possibilita construir um gráfico de “Lineweaver-Burk”^{4;5;6;7;11;39;40;41;42}, pois ao plotar $|\Delta f|^{-1}$ pelo $[penicilina\ G]^{-1}$ tem-se a linearização da equação de “Michaelis-Menten”, tornando possível a comparação da resposta obtida eletroquimicamente, baseada na variação de corrente, tendo em vista que ela atinge um valor máximo limitado pela concentração enzimática com a variação de frequência máxima que também obedece à limitação imposta pela enzima.

O trabalho de Lineweaver & Burk demonstrou a linearização da curva hiperbólica obtida pelo dados do gráfico de Michaelis-Menten.⁴⁴

Figura 23 - Gráfico do duplo recíproco ou “Lineweaver-Burk” para dados obtidos da Figura 23.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Quando $y = 0$, tem-se $-1/K_m$. K_m obtido dos dados foi de 430 mmol L^{-1} (sendo que a referência fornecida pelo fabricante (Sigma Aldrich®) foi de $60 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$). Onde fator de correlação = 0,99, intercepto igual a $7,63 \times 10^{-3} (\pm 3,32 \times 10^{-3}) \text{ Hz}^{-1}$ e coeficiente angular de $3,28 \times 10^{-3} (\pm 1,23 \times 10^{-4}) \text{ Hz}^{-1} \text{ mol L}^{-1}$.

Sendo a QCM uma técnica que pode relacionar a variação de frequência de oscilação do cristal com a massa aderida em sua superfície, por meio da relação de Sauerbrey, através da equação abaixo,

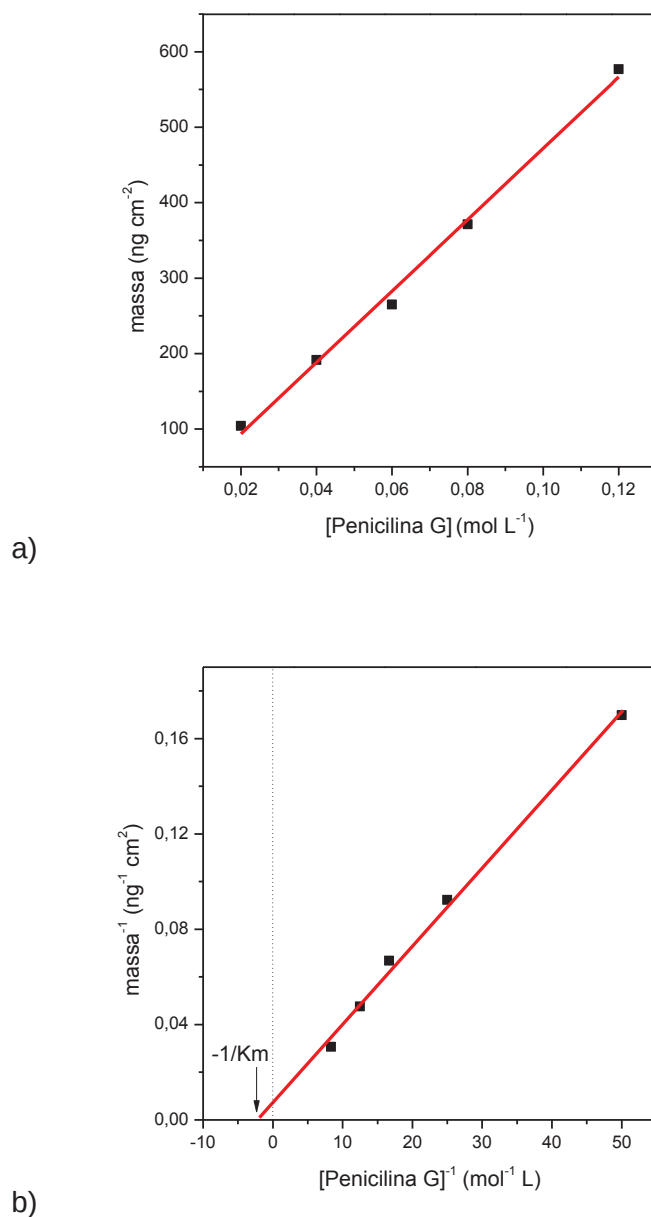
$$\Delta f = \frac{-2f_0^2}{A\sqrt{\rho_q\mu_q}} \Delta m \quad (\text{Eq. 2})$$

a reescrevemos de forma simplificada,

$$\Delta f = -n \frac{1}{C} \Delta m \quad (\text{Eq. 3})$$

sendo que n é o número do harmônico ($n = 1, 3, 5, 7 \dots$) e C o coeficiente de sensibilidade teórica da QCM ($17,7 \text{ ng Hz}^{-1} \text{ cm}^{-2}$ para cristal de 5 MHz).¹² Para desta forma se obter a Figura 23.

Figura 24 - Gráficos de “Michaelis-Menten” e “Lineweaver-Burk”, respectivamente.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Na Figura 25 (a) construiu-se o gráfico de “Michaelis-Menten” obtido da Eq. 3 e a variação de frequência obtida no 3º harmônico, enquanto em (b) o gráfico de “Lineweaver-Burk” obtido com os valores da Figura 25 (a). Quando $y = 0$, tem-se $-1/K_m$. K_m obtido dos dados foi de 430 mmol L⁻¹ (sendo que a referência fornecida

pelo fabricante (Sigma Aldrich®) foi de 60 $\mu\text{mol L}^{-1}$). Onde fator de correlação = 0,99, intercepto igual a $7,63 \times 10^{-3}$ ($\pm 3,32 \times 10^{-3}$) Hz^{-1} e coeficiente angular de $3,28 \times 10^{-3}$ ($\pm 1,23 \times 10^{-4}$) $\text{Hz}^{-1} \text{mol L}^{-1}$.

Conclusão

5 CONCLUSÃO

5.1 Biossensor

Relembrando a definição da IUPAC (União Internacional de Química Pura e Aplicada), biossensor é qualquer dispositivo que utiliza de reações bioquímicas específicas mediadas por enzimas isoladas, imunossistemas, tecidos, organelas ou de células inteiras para detectar compostos químicos, geralmente por meio de transdutores elétricos, térmicos ou ópticos.¹⁶

O biossensor, projetado e desenvolvido neste trabalho, funcionou de acordo com as expectativas, ou seja, a enzima penicilinase, degradou o seu substrato específico, mesmo estando adsorvida em uma superfície metálica.

O mesmo proporcionou a possibilidade de observar a cinética enzimática, em tempo real, e entendê-la melhor.

5.2 Técnica eletroquímica

Os resultados aferidos por VC e EIE, demonstram a alta sensibilidade atribuída aos ensaios eletroquímicos, pois mesmo com baixas concentrações de analito em solução, conseguiu-se detectar com precisão a presença do antibiótico.

O valor obtido para K_m , constante de afinidade, atribuída ao modelo de “Michaelis-Menten”, foi muito próximo ao referido pela Sigma-Aldrich® ($60 \mu\text{mol L}^{-1}$), para metodologias ópticas, tendo como resultado $94,4 \mu\text{mol L}^{-1}$.

5.3 Técnica piezelétrica

De acordo com Sauerbrey o filme é tratado como uma extensão da espessura do cristal de quartzo, o que traz alguns parâmetros a serem ainda analisados, pois a aplicação quantitativa da equação tem que obedecer a condições em relação a rigidez da massa depositada, ou seja, a viscoelasticidade do filme depositado precisa ser considerada para que o resultado obtido sofra correções e chegue próximo ao do fabricante.^{11,12,13}

A sensibilidade para este sistema demonstrou-se menor, em relação à técnica eletroquímica, requerendo uma quantidade maior de analito em solução, o qual chegou a atingir a saturação do sistema.

O valor registrado para K_m foi de 430 mmol L⁻¹, tanto para variação de frequência como para variação de massa. Utilizou-se da equação de Sauerbrey para a conversão. Deve-se considerar o fator de viscoelasticidade para tentar chegar a um resultado mais próximo ao da referência.

5.4 Considerações finais

O trabalho alcançou seu objetivo maior, que era a de criar um biossensor enzimático, porém com uma enzima redox acoplada à superfície do eletrodo.

A cinética enzimática pôde ser vista, em tempo real.

Os dados eletroquímicos foram satisfatórios, pois chegaram bem próximas à referência utilizada. Entretanto, a medida realizada no cristal de quartzo requer um estudo mais aprofundado do filme depositado na superfície.

Referências

REFERÊNCIAS

- 1 NÓBREGA, R. B. da; CAVALCANTI, E. dos S.; SOUZA, W. da S. **Infra-estrutura para inovação**: estudo de caso no segmento da biotecnologia. Disponível em: <<http://hdl.handle.net/10926/609>>. Acesso em: 23 jun. 2013.
- 2 ARAGÃO, F. J. L. **Organismos transgênicos**. Barueri: Manole , 2003.
- 3 AMÂNCIO, M. C.; CALDAS, R. de A. Biotecnologia no contexto da convenção de diversidade biológica: análise da implementação do Art. 19 deste acordo. **Desenvolvimento e Meio Ambiente**, v. 22, n. 1, p. 125-140, 2010.
- 4 VITOLO, M. Aplicações de enzimas na tecnologia de alimentos. In: AQUARONE, E. et al. (Coord.). **Biotecnologia industrial**: biotecnologia na produção de alimentos. São Paulo: Edgard Blücher, 2001. v. 4, cap. 14, p. 387-420.
- 5 MOTTA, V. T. **Bioquímica básica**. Porto Alegre: Médica Nassau, 2006. Cap. 3, p. 69-101.
- 6 BERTONCHELI, C. de M.; HÖRNER, R. A review on metallo- β -lactamases. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 44, n. 4, p. 577-599, 2008.
- 7 FERREIRA, M. V. C.; PAES, V. R.; LICHTENSTEIN, A. Penicilina: oitenta anos; Penicillin: eighty years. **Revista de Medicina**, v. 87, n. 4, p. 272-276, 2008.
- 8 NOUÉR, S. A. et al. Risk factors for acquisition of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing SPM metallo- β -lactamase. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 49, n. 9, p. 3663-3667, 2005.
- 9 JACOBY, G. A.; MUNOZ-PRICE, L. S. The new β -lactamases. **New England Journal of Medicine**, v. 352, n. 4, p. 380-391, 2005.
- 10 HENRICHFREISE, B. et al. Detection of VIM-2 metallo- β -lactamase in *Pseudomonas aeruginosa* from Germany. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 49, n. 4, p. 1668-1669, 2005.
- 11 OLIVEIRA, A. P.; FARIA, R. B. Ordens não inteiras em cinética química. **Química Nova**, v. 33, n. 6, p. 1412-1415, 2010.
- 12 LUYBEN, K.; TRAMPER, J. Optimal design for continuous stirred tank reactors in series using Michaelis–Menten kinetics. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 24, n. 5, p. 1217-1220, 1982.
- 13 THEVENOT, D. R. et al. Electrochemical biosensors: recommended definitions and classification. **Pure and Applied Chemistry**, v. 71, n. 12, p. 2333-2348, 1999. Disponível em: <<http://pac.iupac.org/publications/pac/pdf/1999/pdf/7112x2333.pdf>>. Acesso em: 26 jun. 2013.
- 14 KARUBE, I.; NOMURA, Y. Enzyme sensors for environmental analysis. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 10, n. 1, p. 177-181, 2000.

- 15 STRADIOTTO, N. R.; YAMANAKA, H.; ZANONI, M. V. B. Electrochemical sensors: a powerful tool in analytical chemistry. **Journal of the Brazilian Chemistry Society**, n. 14, p.159-173, 2003. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/jbchs/v14n2/15595.pdf>>. Acesso em: 26 jun. 2013.
- 16 BORISOV, S. M. et al. Optical biosensors. **Chemical Reviews**, v. 108, n. 2, p. 423-461, 2008. Disponível em: <<http://www.lic.vnu.edu.vn/website/data/scopus/magnetic020.pdf>>. Acesso em: 26 jun. 2013.
- 17 VASHIST, S. K.; VASHIST, P. Recent advances in quartz crystal microbalance-based sensors. **Journal of Sensors**, v. 2011, p. 1-13, 2011.
- 18 DANIELSSON, B. Calorimetric biosensors. **Journal of Biotechnology**, v. 15, n. 3, p. 187-200, 1990.
- 19 VARELA, H.; MALTA, M.; TORRESI, R. M. Técnicas *in situ* de baixo custo em eletroquímica: a microbalança a cristal de quartzo. **Química Nova**, v. 23, n. 5, p. 664-679, 2000.
- 20 BUENO, P. R. et al. Electrogravimetric real-time and *in situ* Michaelis–Menten enzymatic kinetics: progress curve of acetylcholinesterase hydrolysis. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 114, n. 49, p. 16605-16610, 2010.
- 21 SANTOS, A. dos et al. Determinação dos parâmetros cinéticos e termodinâmicos da adsorção de L-cisteína em ouro por meio da técnica de microbalança a cristal de quartzo. **Química Nova**, v. 35, n. 7, p. 1365-1368, 2012.
- 22 LOUREIRO, F. C. C. L. et al. A method for determining the mutual diffusion coefficient of molecular solutes based on surface plasmon resonance spectroscopy. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 1, p. 1-8, 2010.
- 23 SAUERBREY, G. Verwendung von Schwingquarzen zur Wägung dünner Schichten und zur Mikrowägung. **Zeitschrift für Physik**, v. 155, n. 2, p. 206-222, 1959. Disponível em: <<http://link.springer.com/article/10.1007%2FBF01337937>>. Acesso em: 23 jun. 2013.
- 24 NUZZO, R. G.; ALLARA, D. L. Adsorption of bifunctional organic disulfides on gold surfaces. **Journal of the American Chemical Society**, v. 105, n. 13, p. 4481-4483, 1983. Disponível em: <<http://pubs.acs.org/doi/pdfplus/10.1021/ja00351a063>>. Acesso em: 2 jul. 2013.
- 25 TKAC, J.; DAVIS, J. J. An optimised electrode pre-treatment for SAM formation on polycrystalline gold. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 621, n. 1, p. 117-120, 2008.
- 26 SPATARU, N.; LE HELLOCO, J-G.; DURAND, R. A study of RuO₂ as an electrocatalyst for hydrogen evolution in alkaline solution. **Journal of Applied Electrochemistry**, v. 26, n. 4, p. 397-402, 1996. Disponível em: <<http://link.springer.com/article/10.1007/BF00251324#page-1>>. Acesso em: 4 jul. 2013.

27 SOFFER, A.; FOLMAN, M. The electrical double layer of high surface porous carbon electrode. **Journal of Electroanalytical Chemistry and Interfacial Electrochemistry**, v. 38, n. 1, p. 25-43, 1972.

28 OREN, Y.; TOBIAS, H.; SOFFER, A. The electrical double layer of carbon and graphite electrodes: Part I. Dependence on electrolyte type and concentration. **Journal of Electroanalytical Chemistry and Interfacial Electrochemistry**, v. 162, n. 1, p. 87-99, 1984.

29 CARVALHO, L. A. de; ANDRADE, A. R. de; BUENO, P. R. Electrochemical impedance spectroscopy applied in the study of heterogeneous reactions at dimensionally stable anodes. **Química Nova**, v. 29, n. 4, p. 796-804, jul./ago. 2006.

30 JIANGUO, L.; GAOPING, G.; CHUANWEI, Y. EIS study of corrosion behaviour of organic coating/Dacromet composite systems. **Electrochimica Acta**, v. 50, n. 16, p. 3320-3332, 2005.

31 BONORA, P. L.; DEFLORIAN, F.; FEDRIZZI, L. Electrochemical impedance spectroscopy as a tool for investigating underpaint corrosion. **Electrochimica Acta**, v. 41, n. 7, p. 1073-1082, 1996.

32 FERREIRA, R. de Q. et al. Determinação eletroquímica da capacidade antioxidante de sucos de frutas industrializados usando o CRAC assay. **Química Nova**, v. 31, n. 8, p. 2169-2173, 2008.

33 BARON, L. C. **Materiais piezelétricos**. Disponível em: <<http://www.foz.unioeste.br/~lamat/downcompendio/compendiov7.pdf#page=3>>Acesso em: 30 jul. 2013.

34 PRADO, T. M. do. **Desenvolvimento de um biossensor para a detecção de antibióticos β -lactâmicos no leite cru**. 2012. 75 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2012.

35 GIROTTO, E. M.; DE PAOLI, M-A. Mass transport in intrinsically conducting polymers: importance, techniques and theoretical models. **Química Nova**, v. 22, n. 3, p. 358-368, 1999.

36 SKOMPSKA, M. Quartz crystal microbalance study of electrochemical deposition of poly (3-dodecylthiophene) films on Au electrodes. **Electrochimica Acta**, v. 45, n. 22, p. 3841-3850, 2000.

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

38 CRESPILO, F. N. et al. Development of highly selective enzymatic devices based on deposition of permselective membranes on aligned nanowires. **The Journal of Physical Chemistry C**, v. 113, n. 15, p. 6037-6041, 2009.

39 MOSS, G. A.; BONDAR, R. J. L.; BUZZELLI, D. M. Kinetic enzymatic method for determining serum creatinine. **Clinical Chemistry**, v. 21, n. 10, p. 1422-1426, 1975.

40 DOWD, J. E.; RIGGS, D. S. A comparison of estimates of Michaelis-Menten kinetic constants from various linear transformations. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 240, n. 2, p. 863-869, 1965.

41 WILKINSON, G. N. Statistical estimations in enzyme kinetics. **Biochemical Journal**, v. 80, n. 2, p. 324-332, 1961.

42 ENGLISH, B. P. et al. Ever-fluctuating single enzyme molecules: Michaelis-Menten equation revisited. **Nature Chemical Biology**, v. 2, n. 2, p. 87-94, 2005.

43 NGEH-NGWAINBI, J.; SULEIMAN, A. A.; GUILBAULT, G. G. Piezoelectric crystal biosensors. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 5, n. 1, p. 13-26, 1990.

44 LINEWEAVER, H.; BURK, D. The determination of enzyme dissociation constants. **Journal of the American Chemical Society**, v. 56, n. 3, p. 658-666, 1934. Disponível em: <<http://pubs.acs.org/doi/pdf/10.1021/ja01318a036>>. Acesso em: 16 jul. 2013.

ANEXO

FICHA CATALOGRÁFICA

Callera, Welder Franzini Amaral

C157e Estudo de processos redox enzimáticos confinados em
eletrodos pelo concomitante monitoramento da variação de
massa e da corrente: o caso da penicilinase como modelo /
Welder Franzini Amaral Callera. – Araraquara : [s.n], 2013
83 f. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual
Paulista,

Instituto de Química

Orientador: Paulo Roberto Bueno

1. Biotecnologia. 2. Enzimas. 3. Biossensor.
4. Cinética enzimática. 5. Eletroquímica. I. Título.

