

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS

ANDRESSA CRISTINA VASQUES DE OLIVEIRA

**CONSTRUÇÃO DE UM BIOSSENSOR POTENCIOMÉTRICO IMPRESSO PARA
DETERMINAÇÃO DE ADRENALINA**

**Alfenas /MG
2017**

ANDRESSA CRISTINA VASQUES DE OLIVEIRA

**CONSTRUÇÃO DE UM BIOSSENSOR POTENCIOMÉTRICO IMPRESSO PARA
DETERMINAÇÃO DE ADRENALINA**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos
para obtenção do título de Mestre em Química pela
Universidade Federal de Alfenas.

Área de concentração: Química Analítica

Orientador: Prof. Dr. Pedro Orival Luccas

Coorientadora: Prof. Dr^a. Cristiana Schmidt de
Magalhães

Alfenas/MG

2017

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal de Alfenas
Biblioteca Central - Sede

Oliveira, Andressa Cristina Vasques de.
O48c Construção de um biossensor potenciométrico impresso para
determinação de adrenalina / Andressa Cristina Vasques de Oliveira. –
Alfenas/MG, 2018.
70 f.: il --

Orientador: Pedro Orival Luccas. .
Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal de
Alfenas, Alfenas, MG, 2018.
Bibliografia.

1. Adrenalina. 2. Biossensores. 3. Potenciometria. I. Luccas, Pedro
Orival. II. Título.

CDD-543

Andressa Cristina Vasques de Oliveira

**“Construção de um biossensor potenciométrico impresso
para determinação de adrenalina”**

A Banca examinadora, abaixo assinada, aprova a Dissertação apresentada como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Química pela Universidade Federal de Alfenas. Área de concentração: Química Analítica.

Aprovado em: 31 / 08 / 2017

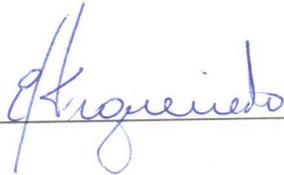
Prof. Dr. Pedro Orival Luccas

Instituição: Universidade Federal de Alfenas –
UNIFAL-MG

Assinatura: 

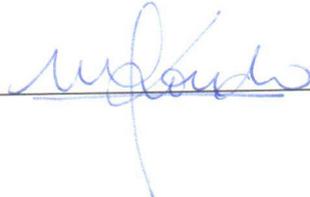
Prof. Dr. Eduardo Costa de Figueiredo

Instituição: Universidade Federal de Alfenas –
UNIFAL-MG

Assinatura: 

Profa. Dra. Márcia Matiko Kondo

Instituição: Universidade Federal de Itajubá -
UNIFEI

Assinatura: 

Dedico esse trabalho a minha família e amigos,
pelo apoio e compreensão durante toda
a execução desse projeto.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter me dado essa oportunidade.

A minha família, aos meus pais Izaías e Alaide, aos meus irmãos, especialmente a Luciane, e aos meus sobrinhos, Kauan, Claudio, Ariane, Raul e Izaías que me apoiaram em todos os momentos dessa jornada, que ouviram as minhas muitas reclamações e sempre me deram forças para continuar.

Aos meus orientadores Pedro e Cris, pela paciência e disposição, por acreditarem no nosso projeto mesmo quando tudo parecia sem saída.

Aos meus amigos: Suh, Poli, Rapha, Andreza, Rod, Jonathan, Gê, Cintinha e em especial a Carol, que me salvou inúmeras vezes, quando eu mais precisei. Agradeço também a Anna Carolina e a Gabi, que mesmo longe sempre me incentivaram e compreenderam inclusive minhas ausências. Meu mais sincero obrigada!!!

E a todos que de alguma forma contribuíram para a realização desse trabalho.

RESUMO

A adrenalina é liberada no sangue pelo sistema nervoso simpático e pela medula supra renal, tem grande importância para organismos agindo desde o prolongamento do efeito dos anestésicos locais até sua atuação no coração, podendo restaurar os batimentos cardíacos no caso de uma parada cardíaca. Dessa maneira, ela se apresenta como importante tema de estudo. Por outro lado, os biossensores impressos em papel, por se tratarem de uma técnica relativamente simples, de baixo custo e de fácil acesso, também apresentam grande potencial como ferramenta de química analítica. Esses utilizam uma enzima que pode catalisar uma oxidação ou redução do analito e gerar um sinal proporcional à concentração do mesmo. Como elemento biológico, do biossensor proposto, foi utilizado a enzima Polifenoloxidase. Portanto, neste trabalho foi construído um biossensor potenciométrico para determinações de adrenalina. O eletrodo de referência foi impresso em papel vegetal (Filipinho®) utilizando impressora jato de tinta (Hp 2050®) com os cartuchos de tintas originais. A tinta para impressão foi modificada com Cloreto de Potássio e Nitrato de Prata. O eletrodo indicador foi construído a partir da impressão da parte condutora, isto é, tinta com KCl. O eletrodo de trabalho se deu a partir da imobilização da enzima em forma de pasta contendo grafite e gelatina comercial (Dr. Oetker®). A impressão de ambos os eletrodos originou, portanto, o biossensor proposto. A enzima foi extraída do inhame (*Colocasia sp.*) com tampão fosfato (pH = 7,0). A melhor composição foi de 1000 µL de Extrato Bruto Enzimático (EBE) com 500 µL de gelatina e 0,330 g de pó de grafite. O equipamento portátil, para as medidas potenciométricas, consiste de uma interface computacional (Arduino Duo®) que possui entradas analógicas com resolução de 12 bits. Para ajuste de impedância de entrada construiu-se um circuito (Op-Amp CI OP07, Analog Devices®) do tipo *buffer*. A comunicação com o usuário foi feita através de um programa desenvolvido em linguagem visual Basic®, a interface foi conectada ao computador através da porta USB. Empregando soluções de Adrenalina em tampão fosfato (pH = 7,0). Foi calculado o Limite de Detecção ($LD = 2,15 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$) e a faixa de resposta linear foi de 5×10^{-2} a $5 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$. A exatidão foi checada comparando com método titulométrico e houve concordância entre os resultados a um nível de 95 % (teste-t pareado). O sistema foi aplicado para a determinação de adrenalina em medicamentos injetáveis e os resultados foram satisfatório a precisão expressa em coeficiente de variação foi sempre inferior a 22%.

Palavras-chave: Adrenalina. Biossensor impresso. Potenciometria.

ABSTRACT

Adrenaline is released into the blood by the sympathetic nervous system and the suprarenal medulla. It is of great importance for organisms acting from the prolongation of the effect of local anaesthetics to their action on the heart and can restore heart rate in the event of cardiac arrest. In this way, it presents itself as an important topic of study. On the other hand, paper-based biosensors, because they are a relatively simple technique, inexpensive and easily accessible, also have great potential as a tool for analytical chemistry. These utilize an enzyme that can catalyze an oxidation or reduction of the analyte and generate a signal proportional to the concentration thereof. As a biological element of the proposed biosensor, the enzyme Polyphenoloxidase was used. Therefore, in this work, a potentiometric biosensor for adrenaline determinations was constructed. The reference electrode was printed on parchment paper (Filipinho®) using an inkjet printer (Hp 2050®) with the original ink cartridges. The printing ink was modified with Potassium Chloride and Silver Nitrate. The indicator electrode was constructed from the printing of the conductive part, i.e., ink with KCl. The working electrode was obtained from the immobilization of the enzyme in paste form containing graphite and commercial jelly (Dr. Oetker®). The impression of both electrodes originated, therefore, the proposed biosensor. The enzyme was extracted from the yam (*Colocasia* sp.) With phosphate buffer (pH = 7.0). The best composition was 1000 µL of Enzymatic Crude Extract (EBE) with 500 µL of jelly and 0.330 g of graphite powder. The portable equipment, for potentiometric measurements, consists of a computer interface (Arduino Duo®) that has analogue inputs with 12-bit resolution. To adjust the input impedance, a circuit (Op-Amp CI OP07, Analog Devices®) of the buffer type was constructed. Communication with the user was done through a program developed in visual language Basic®; the interface was connected to the computer through the USB port. Employing Adrenaline solutions in phosphate buffer (pH = 7.0). The Detection Limit ($LD = 2.15 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$) was calculated and the linear response range was 5×10^{-2} to $5 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$. The accuracy was checked against a titration method, and the results were concordant at a 95% level (paired t-test). The system was applied for the determination of adrenaline in injectable drugs, and the results were satisfactory the precision expressed in coefficient of variation was always less than 22%.

Keywords: Adrenaline, printed biosensor, potentiometry.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AgNO ₃	- Nitrato de Prata
ANOVA	- Análise de Variância
CE	- Concentração de Enzima
CLAE	- Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CT	- Concentração do Tampão
DE	- Dimensão do Eletrodo
EBE	- Extrato Bruto Enzimático
KCL	- Cloreto de Potássio
LD	- Limite de Detecção
MC	- Massa de Grafite
MG	- Massa de Gelatina
PCR	- Proteínas C reativas
PFO	- Polifenoloxidase
pH	- pH do Tampão
POCT	- Point of care Testing
PVP	- Polivinilpirrolidona
RL	- Região Linear
USB	- Universal Serial Bus
VP	- Volume da Pasta

LISTA DE FIGURAS

Figura 1– Ilustração de um Biossensor.....	14
Figura 2– Representação da estrutura molecular da adrenalina: 1,2-benzenodiol-4-(1-hidroxi-2-metilamina etil)	18
Figura 3- Representação da reação da epinefrina em presença de PFO, resultando na formação de epinefrinoquinona.....	19
Figura 4- Representação esquemática da epinefrina em presença da PFO, resultando na formação de epinefrinoquinona.....	20
Figura 5- Matriz de Doehlert de dois níveis com 3 variáveis e deslocamento.....	23
Figura 6– Esquema para a construção do eletrodo em papel por serigrafia	28
Figura 7– Geometria dos eletrodos impressos utilizando a tinta preta com KCl em tamanho Real.....	29
Figura 8– Eletrodo de referência impresso com a tinta contendo AgNO_3 , em tamanho real..	30
Figura 9– Esquema do procedimento de preparação do EBE	31
Figura 10– Esquema da determinação da atividade enzimática	32
Figura 11- Esquema da construção dos eletrodos em forma de fitas	32
Figura 12– Foto real do biossensor durante uma análise	34
Figura 13– Foto do eletrodo construído através da técnica “ <i>Silk Screen</i> ”	40
Figura 14– Curva analítica da adrenalina em tampão fosfato, utilizando papel fotográfico..	43
Figura 15- Teste realizado com aglutinantes diferentes com o intuito de descobrir qual tinha o maior ΔE ao ser misturado com a enzima PFO. Figura a) Silicone; b) Vaselina Líquida; c) Vaselina sólida e d) Gelatina.....	44
Figura 16– Curva analítica da adrenalina em tampão fosfato, utilizando papel vegetal	47
Figura 17– Medida potenciométrica na região linear da curva da solução de adrenalina em tampão fosfato , utilizando papel vegetal e gelatina	48
Figura 18– Diagrama de Pareto	51
Figura 19- Superfície de resposta pH versus Concentração da enzima (ua mL^{-1}),	54
Figura 20- Superfície de resposta pH versus Concentração molar do tampão (mol L^{-1}),....	55
Figura 21- Superfície de resposta Concentração da enzima (ua mL^{-1}) versus Concentração	

molar do tampão (mol L^{-1})	56
Figura 22- Superfície de resposta pH versus Concentração da enzima (ua mL^{-1}),	58
Figura 23- Superfície de resposta pH versus Concentração molar do tampão (mol L^{-1}),.....	59
Figura 24- Superfície de resposta Concentração da enzima (ua mL^{-1}) versus Concentração molar do tampão (mol L^{-1})	59
Figura 25– Resultado da ANOVA para a matriz de Doehlert utilizada	60
Figura 26– Curva analítica da adrenalina em tampão fosfato , após otimização	61
Figura 27 – Região linear após otimização	62

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	12
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	14
2.1	BIOSSENSOR.....	14
2.2	<i>POINT OF CARE TESTING</i>	17
2.3	ADRENALINA.....	18
2.4	PLANEJAMENTO FATORIAL E OTIMIZAÇÃO.....	20
3	OBJETIVOS.....	25
3.1	GERAIS	25
3.2	ESPECÍFICOS	25
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	26
4.1	EQUIPAMENTOS.....	26
4.2	REAGENTES E PADRÕES	26
4.3	METODOLOGIA	27
4.3.1	Construção dos eletrodos.....	27
4.3.1.1	Serigrafia.....	27
4.3.1.2	Eletrodo impresso com impressora jato de tinta.....	28
4.3.1.3	Eletrodo de referência.....	29
4.3.1.4	Preparo do extrato bruto enzimático (EBE).....	30
4.3.1.5	Determinação da atividade enzimática do EBE	31
4.3.1.6	Eletrodo de trabalho (biossensor).....	32
4.3.1.7	Escolha dos aglutinantes para a pasta de carbono com EBE.....	33
4.3.1.8	Determinações potenciométricas e sistema de aquisição de dados.....	34
4.3.2	Avaliação dos parâmetros para a construção do biossensor empregando planejamento fatorial e otimização com matriz de Doehlert.....	35
4.3.3	Figuras de mérito do biossensor.....	38
4.3.4	Exatidão e aplicação em amostras de anestésicos.....	39
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	40
5.1	CONSTRUÇÃO DOS ELETRODOS DE TRABALHO E DEREFERÊNCIA	40
5.1.1	Serigrafia “silk screen”.....	40

5.1.2 Eletrodo impresso.....	41
5.1.3 Medida da atividade enzimática	42
5.2 AVALIAÇÃO DOS ELETRODOS CONTRUÍDOS EM PAPEL FOTOGRÁFICO.....	42
5.3 AVALIAÇÃO DO PAPEL SUPORTE E AGLUTINANTES DO BIOSSENSOR.....	43
5.4 PLANEJAMENTO FATORIAL E OTIMIZAÇÃO.....	48
5.4.1 Matriz De Doelhart.....	52
5.4.2 Precisão.....	62
5.4.3 Determinação de adrenalina em medicamentos injetáveis e avaliação da exatidão.....	62
6. CONCLUSÃO.....	64
REFERÊNCIAS.....	65

1 INTRODUÇÃO

O biossensor pode ser definido como um sensor composto por um biorreceptor e um transdutor. O biorreceptor é o material biológico que reconhece o analito alvo e o transdutor converte esse reconhecimento num sinal mensurável.¹ O biossensor pode ser classificado de acordo com a natureza do elemento de biorreconhecimento ou da transdução do sinal ou da combinação dos dois.^{2,3}

A maioria dos biossensores emprega detecção eletroquímica por ser um transdutor de baixo custo e fácil de construir e utilizar. A reação que ocorre no biossensor eletroquímico normalmente gera uma corrente mensurável, amperometria, ou um potencial mensuráveis, potenciometria, ou ainda pode alterar as propriedades condutoras do meio entre os eletrodos, condutometria.^{4,5,6}

A escolha do material suporte, a ser utilizado para a construção dos sensores, vai depender da aplicação a ser empregada, pois há uma grande variedade de materiais existentes. Deve se considerar parâmetros como hidrofobicidade, rigidez, homogeneidade entre outros, na escolha desse suporte.⁷ Nessa vertente, os biossensores eletroquímicos impresso em papel vêm se mostrando como uma alternativa para aplicações em diversas áreas, como por exemplo, o *point of care testing* já largamente utilizado para detecção de glicose em sangue em diagnósticos clínicos rápidos.^{6,8,9}

Quanto ao material de reconhecimento biológico, uma das enzimas exploradas na construção de biossensores é a Polifenoloxidase (PFO) que está presente em vários vegetais como maçã, banana, batata e inhame. Esta enzima quando oxidada produz à coloração escura, o chamado escurecimento enzimático.^{10,11}

A PFO catalisa a oxidação de fenóis. No presente trabalho, a substancia de interesse, que apresenta grupos fenólicos, é a adrenalina, substância essa que pode ser usada como substrato para medir a atividade enzimática, de PFO.⁵

Adrenalina é conhecida como uma catecolamina, um neurotransmissor importante, sendo liberada no sangue pelo sistema nervoso simpático e pela medula supra renal, importante para proporcionar uma resposta fisiológica rápida em casos emergenciais de dano, perigo ou doença.⁶ A Atividade hormonal da catecolamina na medula adrenal, onde a adrenalina é sintetizada, chega a 80% e atua no sistema cardiovascular (coração, vasos

sanguíneos e pressão arterial), musculatura lisa das vísceras, metabolismo e sistema nervoso central.^{12,13,14}

O método mais utilizado para a determinação de adrenalina é a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) com detecção por fluorescência ou detecção eletroquímica.^{2,15}

O biossensor vem sendo desenvolvido também como uma alternativa para determinação de adrenalina, alternativa essa muito mais barata e de fácil utilização.^{16,2}

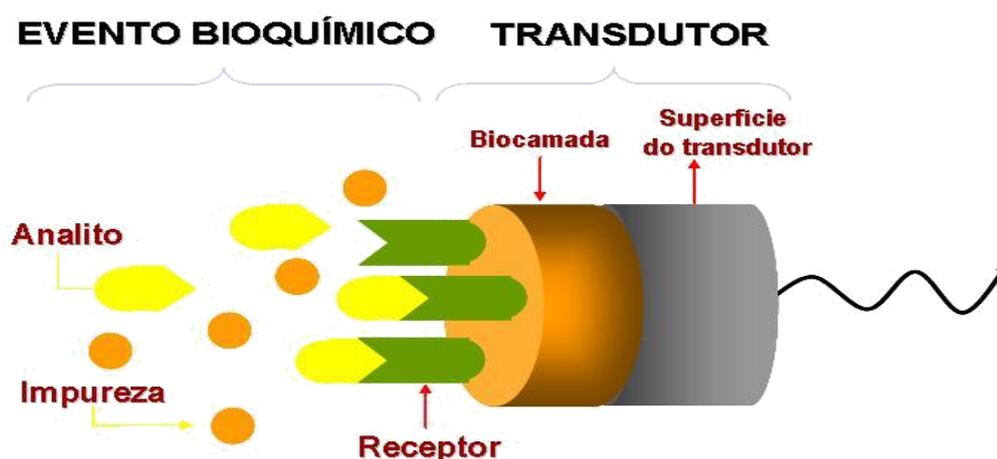
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A revisão bibliográfica foi dividida em três tópicos, biossensores, *Point of Care Testing* e adrenalina.

2.1 BIOSENSOR

O biossensor pode ser definido como um sensor que reconhece uma mudança biológica, química ou física e a converte em um sinal físico mensurável. O sensor contém um elemento que permite o reconhecimento de respostas que sejam seletivas a um tipo de analito ou grupo de analitos.¹⁷ Outro componente do sensor é o transdutor, que converte o biorreconhecimento, em sinal que possa ser mensurável (vide figura 1).¹⁸ Por fim, um processador de sinal, coleta, amplifica e exibe o sinal medido.¹⁶

Figura 1- Ilustração de um Biossensor



Fonte: adaptado de Delbem et al., 2002

Os biossensores podem ser divididos em várias subclasses e essa divisão ocorre de acordo com a natureza do elemento de biorreconhecimento, ou da transdução do sinal,

ou da combinação dos dois a serem estudadas. Assim, temos os biossensores eletroquímicos que podem ser divididos em: amperométricos, voltamétricos, condutométricos e potenciométricos.^{19,20}

Os biossensores amperométricos e voltamétricos são caracterizados pela aplicação de um potencial entre dois eletrodos e acompanhamento da corrente gerada na solução. A corrente é resultado de uma redução ou oxidação eletroquímica no eletrodo de trabalho. O termo voltametria é usado para técnicas em que se aplica uma faixa de potencial (varredura) e acompanha-se a corrente gerada que é proporcional a concentração do analito. Métodos voltamétricos incluem voltametria cíclica, voltametria hidrodinâmica, voltametria linear de varredura, entre outros. Esses métodos têm uma ampla faixa dinâmica e são úteis em níveis de quantificações baixos. É a ausência de uma varredura de potencial, que distingue voltametria de amperometria.²¹

Biossensores amperométricos têm boa seletividade, na medida em que o potencial utilizado para a oxidação ou a redução é característica dos analitos. Biossensores condutométricos, muitas vezes, incluem enzimas, cujas reações geram produtos que resultam em mudanças de força iônica, e conseqüentemente, maior condutividade.¹⁶

Existe também a potenciometria, que é a alteração de potenciais sobre um eletrodo devido ao aumento/diminuição da densidade de carga na superfície de um eletrodo.^{18, 22} Neste processo faz-se a medida de potencial entre dois eletrodos, quando a corrente é zero. O eletrodo indicador (biossensor) tem um potencial dependente da atividade (ou concentração) do analito.^{14,23} O potencial está relacionado à concentração, através do sistema logarítmico de acordo com a equação de Nernst²⁴

Dentre os suportes para a construção dos biossensores, no presente trabalho, explorou-se o papel, devido ao interesse em miniaturização e emprego em sistema do tipo “*point of care*”. Eles apresentam vantagens como baixo custo, versatilidade, facilidade operacional, entre outras.²⁵

A composição química do papel varia de acordo com o tipo de planta utilizado em sua produção, porém de modo geral, o principal constituinte do papel é a celulose, um polímero, mais precisamente, um polissacarídeo constituído de monômeros de β -D-Glucose. A D-Glucose ($C_6H_{12}O_6$) é um sacarídeo contendo cinco grupos álcool e um grupo aldeído. A celulose é utilizada como suporte, já que possui uma fibra hidrofílica, ou seja, o papel pode ser quimicamente modificado e nele incorporado uma grande variedade de grupos funcionais. A celulose é compatível com materiais biológicos,

facilitando assim a construção dos biossensores. Como pode ser incinerado, o papel apresenta uma bio-segurança maior, já que pode ser eliminado logo após o seu uso.⁷

Existe uma variedade de papéis disponíveis para fabricação de *Point of Care testing*. A escolha do mais apropriado baseia-se, essencialmente, nas etapas de construção, necessárias para o desenvolvimento do dispositivo, e na área de aplicação do biossensor.

No desenvolvimento de sensores e tecnologias de microfluídos, o papel de filtro foi o material mais utilizado nos últimos anos, devido à sua capacidade de absorção de água, porém, existem outros tipos de papel, comercialmente disponíveis, que podem também ser utilizados; com exemplos temos o papel brilhante, o papel acetato e o papel vegetal.²⁶

Vários estudos já foram realizados com biossensores impressos, e suas principais vantagens são: a rapidez dos resultados, a versatilidade, serem descartáveis e o baixo custo.²⁷

Na área ambiental pode se mencionar o trabalho de KAMPOURIS *et al.* (2009), onde foi construído um biossensor impresso capaz de medir pH. Estes biossensores, para medidas de pH, impressos em tela, incorporam o reagente fenantraquinona que é sensível ao hidrônio e o dimetilferroceno que atua como eletrodo de referência interna. Podendo então substituir os eletrodos de vidro na determinação de pH *in situ*.²⁸

Outro exemplo de aplicação na área ambiental, é a rápida determinação *in situ*, de compostos fenólicos e seus derivados, que consistem em um desafio ambiental importante devido à fácil penetração dessas espécies através de membranas de plantas ou da pele de animais e seres humanos, com efeitos colaterais tóxicos. No trabalho de RENEDO *et al.* (2007)²⁹ foram utilizadas enzimas na preparação de biossensores para a determinação de compostos fenólicos, a medição amperométrica foi realizada com um baixo potencial com intuito de reduzir significativamente a interferência; nesse trabalho, foram utilizados as enzimas polifenol oxidase (PPO), tirosinase (Tyr) e lacase (Lac), essas podem catalisar a oxidação de benzenodióis e fenóis em quinonas, ou em espécies radicais, através da reação com oxigênio em solução, os autores mencionaram que um dos aspectos mais importantes que afeta os desempenhos de biossensores enzimáticos é sua imobilização efetiva na superfície do eléctrodo.²⁹

Nota-se que devido a possibilidade de miniaturização e versatilidade, dos biossensores, esses têm um grande potencial para ser usado *in situ* e conseqüentemente como *Point of Care Testing*.

2.2 POINT OF CARE TESTING

O *Point of Care Testing* (POCT), conhecido como “Teste realizado junto do paciente” tem sido muito difundido, devido a facilidade de uso. O teste é feito geralmente por pessoas, leigas, cuja formação principal não é na análise clínica, ou realizada pelos próprios pacientes, os chamados autotestes. Fatores como custo-eficiência, requisitos mínimos de infraestrutura, entre outros, também são de suma importância para que esse tipo de teste.^{30,31,32}

O POCT vem sendo desenvolvido desde a década de 80, mesmo que não recebendo esse nome na época, desde então, houve vários avanços em novas tecnologias fáceis de usar, incluindo o analisador de hemoglobina, analisadores de gases do sangue, medidores de glicose no sangue, medidores de Proteína C Reativa, PCR, contadores de colesterol, testes de gravidez, INR e assim por diante.

O POCT ultrapassou os limites das aplicações em análises clínicas e atualmente também é empregado para controle da qualidade dos alimentos, monitorização ambiental, testes de toxicologia e em ciências forenses. O principal objetivo do POCT é minimizar o intervalo entre os testes para diagnóstico e tratamento.³³

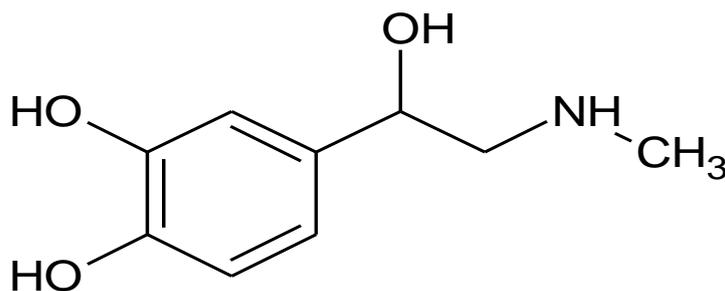
Para se obter um diagnóstico preciso para tratamento ou prevenção de doenças, muitas vezes, se demandam tecnologias não muito acessíveis em países em desenvolvimento econômico. Assim, parte da população não pode arcar com o custo de testes ou exames clínicos. Atualmente, precisa-se de um profissional especializado para interpretar as análises. Com o POCT, que pode dispensar um profissional para realizar os testes (já que esses podem ser usados até pelo próprio paciente em alguns casos), as áreas que não contam com uma equipe médica treinada, poderão utilizar e diagnosticar doenças muito mais rapidamente.⁷

Os biossensores, impressos em papel, podem ser considerados como uma classe de dispositivos com grande potencial para determinações do tipo *point-of-care*.³⁴

2.3 ADRENALINA

A adrenalina [1-(3,4-dihidroxiifenil)-2-metilaminoetanol], que também pode ser chamada de epinefrina, é uma catecolamina liberada pelo sistema nervoso simpático e pela medula supra-renal como sinal de respostas fisiológicas imediatas, como frio, medo, fadiga, choque, perigo, por isso chamada de mecanismo de luta ou fuga.¹³ Ela desempenha um papel importante no sistema nervoso e ajuda a manter a atividade física normal do corpo, incluindo a frequência cardíaca, a pressão arterial e a atuação no sistema nervoso simpático.¹⁹ Também é usada para aliviar a angústia respiratória, causada por broncoespasmo. Pode também ser muito útil nas reações de hipersensibilidade, incluindo anafilaxia, drogas e outros alergênicos. A adrenalina prolonga o efeito de anestésicos locais, por diminuir o fluxo sanguíneo local. No coração, pode restaurar os batimentos cardíacos no caso de uma parada cardíaca.³⁵ As concentrações fisiológicas das catecolaminas são na ordem de nanomolares e picomolares, sendo encontradas de 22 a 109 nmol L⁻¹ na urina e de 170 a 470 pmol L⁻¹ no plasma³⁶. A estrutura da adrenalina é mostrada na figura 2:

Figura 2- Representação da estrutura molecular da adrenalina: 1,2-benzenodiol-4-(1-hidroxi-2-metilamina etil)



Fonte: do autor, 2016

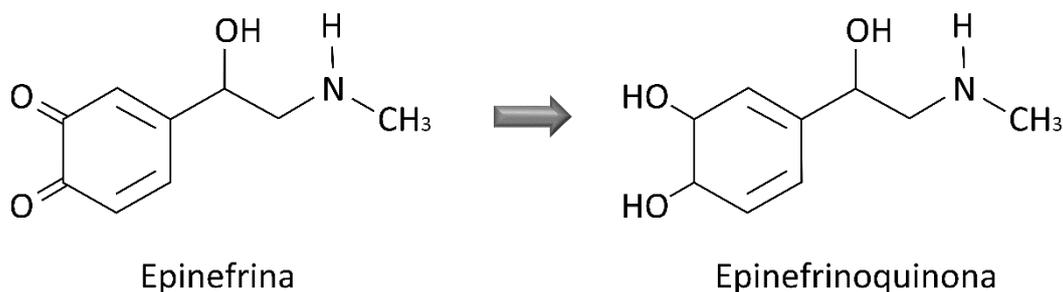
Como a adrenalina possui um grupo fenólico em sua estrutura, os biossensores enzimáticos se tornam interessantes para sua determinação. Sendo assim, a enzima Polifenoloxidase, que pode ser encontrada no Inhame (*colocasia sp.*) ou banana (*musa*

sp.), foi considerada apropriada, pois ela é responsável por catalisar a oxidação de grupos fenólicos como os existentes na adrenalina.

De uma maneira geral, enzimas são proteínas responsáveis por catalisar reações, podendo proporcionar uma compatibilidade entre a velocidade de reação e o processo bioquímico essencial para a manutenção da célula. Tem uma grande especificidade e poder catalítico que vem da sua natureza protéica, podendo reconhecer um grupo limitado de substratos.²¹

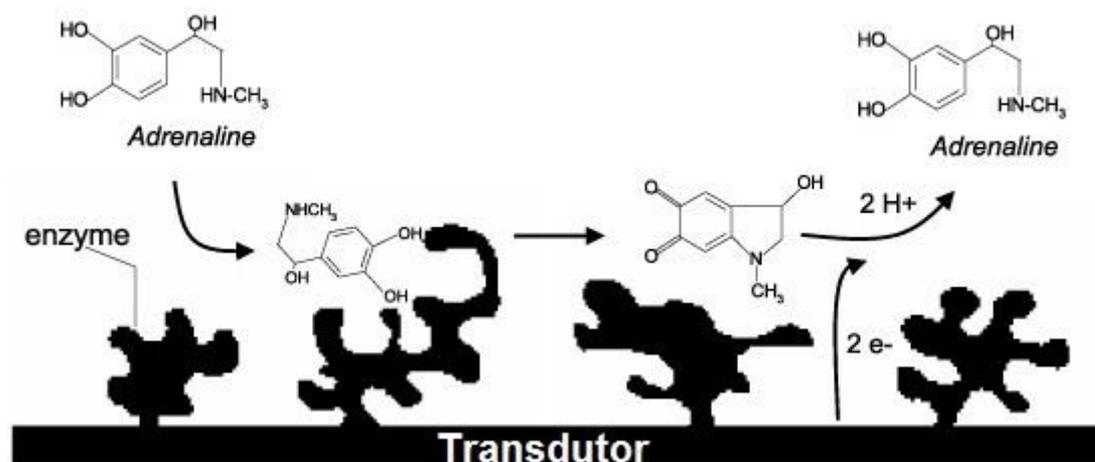
Cada enzima é seletiva para determinado substrato, assim a enzima PFO, possui centro dinuclear de cobre que é capaz de inserir oxigênio em um grupo hidroxila de um anel aromático existente, seguida pela oxidação do difenol à quinona apropriada (figura 3).^{37,38} A figura 4 mostra um representação esquemática da epinefrina frente a enzima PFO.³⁹

Figura 3- Representação da reação da epinefrina em presença de PFO, resultando na formação de epinefrinoquinona



Fonte: do autor, 2016

Figura 4 - Representação esquemática da epinefrina em presença da PFO, resultando na formação de epinefrinoquinona



Fonte: adaptado de Leite *et al.* 2003

A adrenalina também é indicada em medicamentos para: alívio de broncoespasmos, em paradas cardíacas, em reações alérgicas graves e para prolongar a ação de anestésicos. Portanto, de grande importância para a medicina e a sociedade como um todo.⁶

2.4 PLANEJAMENTO FATORIAL E OTIMIZAÇÃO

O planejamento de experimentos em busca de resultados otimizados de uma pesquisa de maneira geral, tem os objetivos de minimizar custos, tempo e maximizar rendimento e qualidade dos produtos. Para isso utilizam-se técnicas sistemáticas de planejamento de experimentos. A metodologia do planejamento fatorial, juntamente com a análise de superfície de resposta, é uma ferramenta fundamental para atingir os objetivos da otimização.⁴⁰

Para iniciar um planejamento, é necessário saber quais os fatores que podem influenciar nas respostas obtidas, realizar uma triagem das variáveis que possa ter interação entre si, e conseqüentemente alterar as respostas do experimento. Vale lembrar

que esquemas fatoriais são aqueles em que envolvem combinações entre os níveis de dois ou mais fatores. Existem os sistemas compostos por planejamento fatorial completo e planejamento fatorial fracionado.

Em um planejamento fatorial, são investigadas as influências de todas as variáveis experimentais de interesse e os efeitos de interação nas respostas. Se a combinação de k fatores é investigada em dois níveis, um planejamento fatorial consistirá de 2^k experimentos. Os níveis de fatores são expressos pelos símbolos (+) e (-). Os conjuntos de experimentos são executados de forma aleatória para não interferir nos resultados através de interpretações erradas. O planejamento fatorial de dois níveis para 3 fatores experimentais está apresentado na Tabela1.⁴¹

Tabela1 - Matriz de coeficiente para um planejamento fatorial 2^3 .

Experimentos	Variáveis			Interações			
	X ₁	X ₂	X ₃	X ₁ X ₂	X ₁ X ₃	X ₂ X ₃	X ₁ X ₂ X ₃
1	+	+	+	+	+	+	+
2	-	+	+	-	-	+	-
3	+	-	+	-	+	-	-
4	-	-	+	+	-	-	+
5	+	+	-	+	-	-	-
6	-	+	-	-	+	-	+
7	+	-	-	-	-	+	+
8	-	-	-	+	+	+	-

Através da aplicação do planejamento fatorial, é possível obter informações dos efeitos individuais e das interações de cada fator relacionado ao sistema. O efeito pode ser definido como a mudança ocorrida na resposta quando se passa do nível inferior (-) para o nível superior (+), podendo ser classificado em efeitos principais (causado por um dos fatores) e efeitos de interação.⁴¹

O número de experimentos é dado por 2^k , em que o número de ensaios necessários para a execução de um planejamento fatorial completo aumenta rapidamente com k , pode-se dizer que para cinco fatores seriam $2^5 = 32$ ensaios. Assim, quando se deseja apenas fazer uma triagem inicial de muitos fatores, é vantajoso aplicar um planejamento fatorial fracionado. Este tipo de planejamentos são possíveis por 2 motivos, primeiro porque apesar do número de interação de ordem aumentar drasticamente com o número de

fatores, esses efeitos tem valores pequenos, e segundo porque, quando o número de fatores aumenta, cresce a chance de que uma ou mais variáveis não afete significativamente as respostas.⁴² Veja exemplo na tabela 2:

Tabela 2 - Matriz de planejamento fatorial fracionado 2^{5-1}

Experimentos	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	X ₅
1	+	+	+	+	+
2	-	+	+	+	-
3	+	-	+	+	-
4	-	-	+	+	+
5	+	+	-	+	-
6	-	+	-	+	+
7	+	-	-	+	+
8	-	-	-	+	-
9	+	+	+	-	-
10	-	+	+	-	+
11	+	-	+	-	+
12	-	-	+	-	-
13	+	+	-	-	+
14	-	+	-	-	-
15	+	-	-	-	-
16	-	-	-	-	+

X5=1234

Os planejamentos fatoriais fracionários, ou completos com dois níveis, fornecem equações resultantes de primeira ordem que expressam a relação entre os fatores estudados e a resposta, como segue na equação 2:

$$Y = a + bA + cB \quad (2)$$

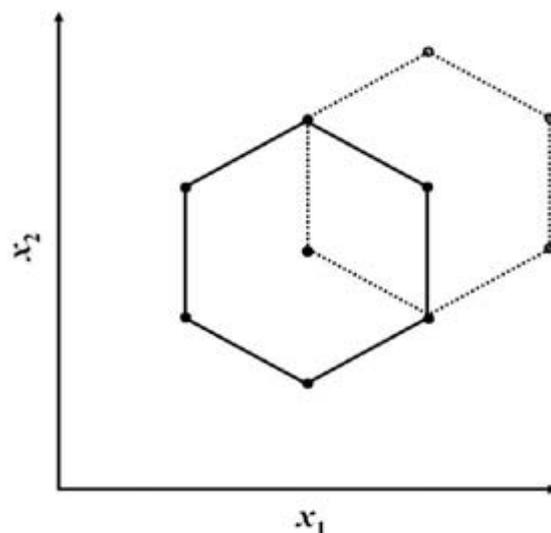
sendo:

- Y é a resposta experimental;
- A e B fatores a serem otimizados;
- a termo independente;
- b e c representam coeficientes dos termos lineares.

Para a otimização, desses fatores, é necessário utilizar planejamentos com funções quadráticas. Uma das otimizações mais utilizadas é a otimização utilizando matriz de Doehlert.

A Matriz de Doehlert é muito utilizada para planejamentos fatoriais de segunda ordem, os pontos da matriz Doehlert correspondem aos vértices de um hexágono, em geral, o número total de pontos experimentais no planejamento é igual a k^2+k+pc , em que k é o número de fatores e pc é o número de experimentos no ponto central. Uma importante propriedade do planejamento Doehlert diz respeito ao número de níveis que cada variável possui. Com quatro variáveis, por exemplo, o número de níveis é: 5, 7, 7 e 3, o que permite avaliar as variáveis consideradas mais importantes, ou seja, que apresentam efeitos mais pronunciados em um número maior de pontos do espaço estudado. A figura 5 apresenta uma matriz de Doehlert de dois níveis com 3 variáveis e deslocamento.⁴¹

Figura 5 - Matriz de Doehlert de dois níveis com 3 variáveis e deslocamento



Fonte: adaptada de Teófilo e Ferreira 2005.

Segundo o Instituto Nacional de Metrologia, na construção do modelo, o número de experimentos (N) necessários é dado por K^2+Co onde K é o número de fatores e Co é o número de experimentos no ponto central. Cada modelo é definido de acordo com o número de fatores e os valores codificados da matriz experimental.⁴¹

A tabela 3 apresenta os valores codificados e reais das matrizes de planejamento para dois, três fatores.

Tabela 3- Matriz de planejamento de Doehlert com 2 e 3 variáveis

Experimentos	Variáveis Experimentais				
	2 Variáveis		3 Variáveis		
	X1	X2	X1	X2	X3
1	0	0	0	0	0
2	1	0	1	0	0
3	0,5	0,866	0,5	0,866	0
4	-1	0	0,5	0,289	0,817
5	-0,5	-0,866	-1	0	0
6	0,5	-0,866	-0,5	-0,866	0
7	-0,5	0,866	-0,5	-0,289	-0,817
8			0,5	-0,866	0
9			0,5	-0,289	-0,817
10			-0,5	0,866	0
11			0	0,577	-0,817
12			-0,5	0,289	0,817
13			0	-0,577	0,817

A resposta experimental obtida, a partir dos planejamentos citados acima, fornece uma função polinomial que pode ser perfeitamente empregada na construção das superfícies de resposta. Para obtenção das condições de ótimo, basta derivar à equação obtida do planejamento em função do fator de interesse e igualar a zero.⁴⁰

3. OBJETIVOS

Os objetivos foram classificados em objetivos gerais e objetivos específicos.

3.1 GERAIS

Desenvolver biossensor potenciométrico construído em papel, contendo a enzima polifenoloxidase presente no inhame (*Colocasia sp.*), para a determinação de adrenalina.

3.2 ESPECÍFICOS

- a) Preparar e avaliar a atividade de um extrato protéico a partir do inhame (*Colocasia sp.*);
- b) Construir (imprimir) biossensores em papel, para a determinação de adrenalina
- c) Avaliar as variáveis pertinentes á construção do biossensor em papel: Concentração da enzima, volume da pasta, dimensões do eletrodo, massa de gelatina, massa de grafite, pH do tampão e concentração molar do tampão;
- d) Caracterizar o biossensor em termos de faixa de resposta linear, Limite de Detecção, precisão, exatidão e aplicabilidade em amostras de medicamentos.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

A parte metodológica desse trabalho foi dividida em tópicos que abrangem desde o material utilizado no desenvolvimento do trabalho a etapas de construção do biossensor, validação e teste com amostra.

4.1 EQUIPAMENTOS

Foram utilizados no desenvolvimento do projeto os equipamentos listados abaixo:

- a. Banho ultrassom Unique , USC- 1400;
- b. Peagmetro Hanna Instruments HI 221;
- c. Balança analítica Kern 410;
- d. Centrífuga Excelsa Baby 1 - Fanem;
- e. Espectrofotômetro Femto 435 UV-Vis
- f. Equipamento portátil, construído em nosso laboratório, para medidas potenciométricas que consiste de uma interface Arduino Duo® que possui entradas analógicas com resolução de 12 bits e um circuito eletrônico (Op-Amp) para ajuste de impedância.
- g. Impressora Hp 2050®
- h. Liquidificador Mondial Power NL

4.2 REAGENTES

Os reagentes utilizados foram:

- a. Epinefrina 99% (Sigma) utilizada como padrão e para determinação da atividade Enzimática;

- b. Dihidrogenofosfato de potássio (Synth) e hidróxido de sódio (Vetec) utilizados na obtenção do tampão fosfato;
- c. Polivinilpirrolidona (Vetec) utilizado como preservante do extrato bruto enzimático;
- d. Grafite (Synth) e gelatina em pó comercial Dr. Oetker[®], utilizados no preparo da pasta com a Enzima;
- e. Cloreto de Potássio e Nitrato de Prata (Vetec), utilizados na alteração das tintas.
- f. Álcool Isopropílico e Etileno Glicol utilizados no preparo da tinta;
- g. Colas comerciais (cola branca, cola tipo SuperBonder[®]);
- h. Papéis comerciais (papel pardo, sulfite, cartão, fotográfico e vegetal);
- i. Inhame (*colocasia sp.*)

4.3 METODOLOGIA

O trabalho proposto foi realizado em 4 etapas. A primeira foi a construção dos eletrodos: Construiu-se o eletrodo de referência (prata/cloreto de prata) e o eletrodo indicador com a enzima polifenoloxidase (PFO). Na segunda etapa, foi realizado um planejamento fatorial fracionado, para determinar quais as variáveis importantes no sistema, seguido de uma otimização através da Matriz de Doehlert. A terceira etapa consistiu e da caracterização da metodologia, parâmetros tais como: limite de detecção, seletividade, exatidão, precisão e linearidade foram avaliados. E por último, o método foi aplicado em amostras de anestésicos de Lidocaína.

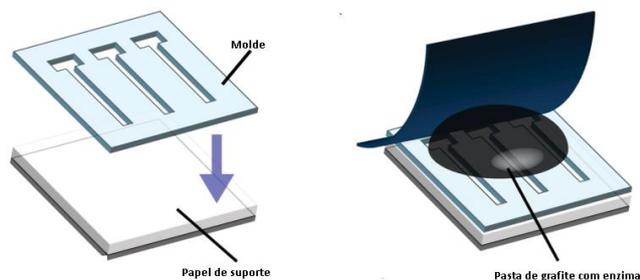
4.3.1 Construção dos eletrodos

4.3.1.1 Serigrafia

A impressão dos eletrodos se deu primeiramente por serigrafia “silk screen” proposto por Godino et al. (ver figura 6).³⁰ Posteriormente, empregando impressora do tipo Jato de tinta. Para a construção do biossensor foram utilizados vários tipos de papéis,

tais como: folhas de acetato de celulose, papel fotográfico de diversas gramaturas, papel sulfite, papel vegetal, e outros.

Figura 6 - Esquema para a construção do eletrodo em papel por serigrafia



Fonte: adaptado de Godino et al. 2012

Para o desenvolvimento dos biossensores através da técnica “silk screen”, foi realizado, diversos testes com colas comercialmente disponível no mercado local (Alfenas-MG). Porém, as colas testadas não apresentaram condutividade adequada, assim, foi necessário adicionar pó de grafite a essas colas. Foram testadas colas brancas, a base de acetato de polivinila (PVA), diluídos em água e colas de poliacrilato (SuperBonder®).

4.3.1.2 ELETRODO IMPRESSO COM IMPRESSORA JATO DE TINTA.

A construção dos eletrodos, também foi feita através da impressão empregando uma impressora jato de tinta comum.

Para iniciar o processo, de impressão dos eletrodos, foi necessário um estudo sobre tipos de tintas usadas. As tintas, de impressoras jato de tinta, se restringem principalmente a dois grupos, as tintas corantes e as tintas pigmentadas.

As tintas corantes, são aquelas produzidas por moléculas coloridas solúveis na água, possuem menos riscos de entupimento dos cartuchos, podendo ser utilizada em quase todos os tipos de papéis, são adequadas para a impressão de fotos, evitando causar variações de brilho e iluminações com aspecto artificial. A desvantagem é que ao entrar em contato com água, ou umidade, desbotam a coloração inicial.⁴⁴

As tintas pigmentadas são aquelas que oferecem maior qualidade na impressão de textos, pois possuem menos brilho e maior resistência à água e/ou umidade, e assim apresentam uma melhor fixação. Os pigmentos não se dissolvem no meio usado pela tinta, eles permanecem suspensos na solução. A desvantagem é que durante o armazenamento, ou quando expostos a altas temperaturas, sedimentos podem ser formados no cartucho de tinta, ou na cabeça de impressão, e com isso pode causar o entupimento.⁴⁴

Com o intuito de aumentar a condutividade, adicionou-se cloreto de potássio à tinta preta original da impressora. Para isso, adicionou-se uma massa de Cloreto de Potássio (KCl) suficiente para se ter uma solução $0,2 \text{ molL}^{-1}$. Com essa concentração de KCl, na tinta preta pigmentada para impressora HP®, os eletrodos impressos passaram a ter a mesma ordem de resistência em $M\Omega$ do eletrodo de vidro, resistência essa medida por um multímetro digital Fluke® que apresenta valores próximos a $20 M\Omega$.⁴⁵

Com a tinta alterada, imprimiu-se a base dos dois eletrodos, tanto o de referência, quanto o indicador, conforme figura 7.

Figura 7 - Geometria dos eletrodos impresso utilizando a tinta preta com KCl, em tamanho real

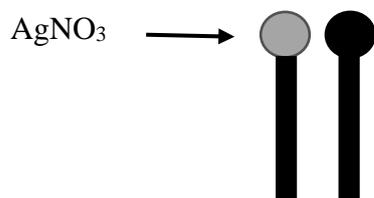


Fonte: do autor, 2016

4.3.1.3 ELETRODO DE REFERÊNCIA

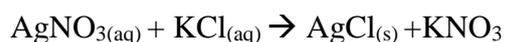
Depois da impressão da base dos eletrodos, imprimiu-se o eletrodo de referência de Prata/Cloreto de Prata. Para isso foi preparada uma tinta especial com Nitrato de Prata, AgNO_3 . Foram utilizados 810 mL de água deionizada, 120 mL de álcool isopropílico, 60 mL de dietileno glicol e 50 g AgNO_3 na preparação desta nova tinta.⁴⁵ Tomou-se o cuidado de prepará-la na mesma densidade e viscosidade das tintas comerciais, evitando assim que entupisse os cartuchos. Com essa tinta, imprimiu-se a segunda camada do eletrodo de referência encima da base já impressa com a tinta contendo KCl, conforme figura 8.

Figura 8 - Eletrodo de referência impresso com a tinta contendo AgNO_3 , em tamanho real



Fonte: do autor, 2016

Como eram impressos eletrodos usando uma tinta contendo AgNO_3 em cima da base dos eletrodos impressos contendo KCl , ocorreu a seguinte reação:

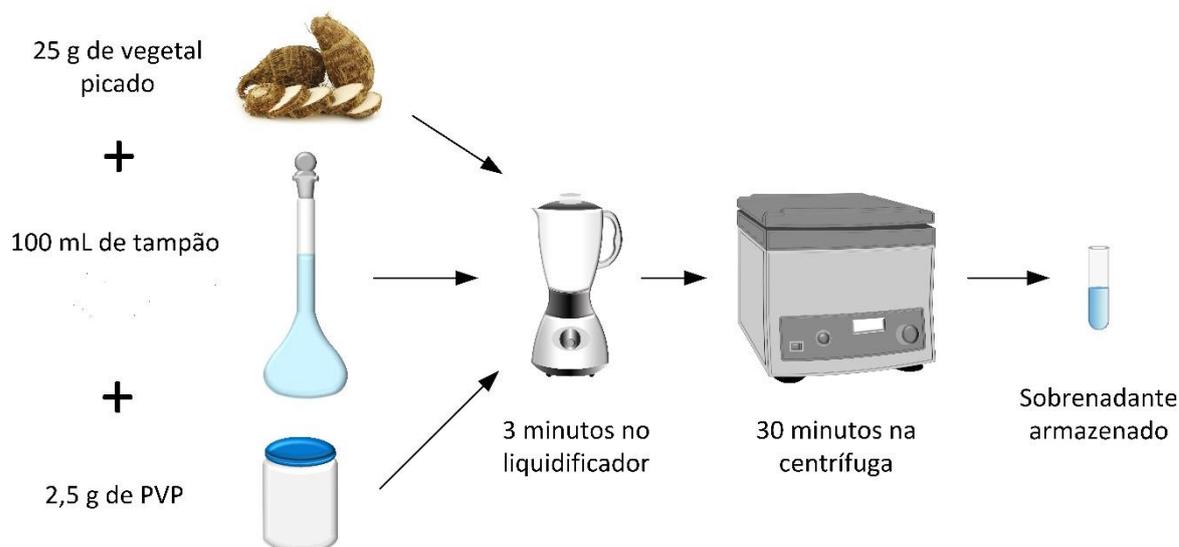


Portanto, tem-se a precipitação de Cloreto de prata e conseqüentemente o eletrodo de referência.

4.3.1.4 PREPARO DO EXTRATO BRUTO ENZIMÁTICO (EBE)

Para o preparo do Extrato protéico, foi pesado uma massa de 25,0 g de Inhame descascado e picado, que foi misturado com 100 mL de tampão fosfato 0,100 mol L^{-1} (pH = 7,00) ou tampão acetato com pH igual a 5,00. Foram adicionados ainda 2,50 g de agente protetor polivinilpirrolidona (PVP) e processado em um liquidificador durante 3 min. A mistura foi filtrada em gaze dobrada em quatro e centrifugada a 5.000 rpm durante 30 min, a 25°C. A solução sobrenadante ficou armazenada no refrigerador a 4 °C e usada como fonte enzimática.³ A figura 9 mostra uma representação desse procedimento.

Figura 9 - Esquema do procedimento de preparação do EBE

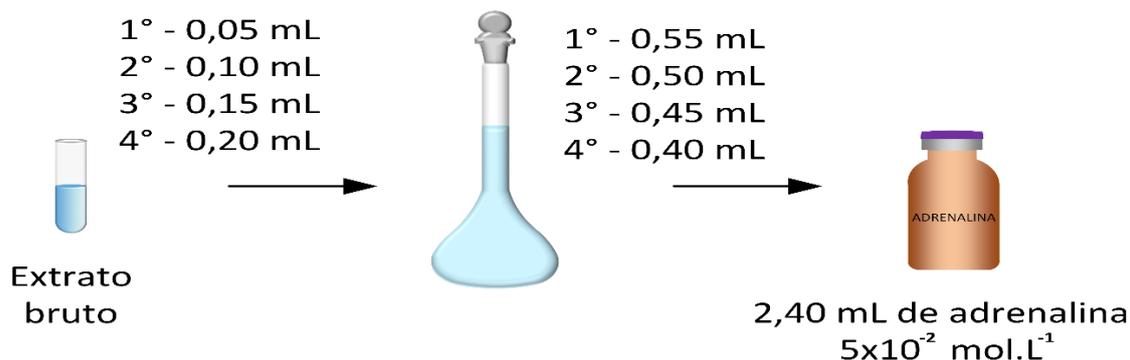


Fonte: do autor, 2016

4.3.1.5 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DO EBE

A atividade enzimática da PFO foi determinada pela medida de absorbância em 410 nm, monitorando a formação da epinefrinoquinona a partir da adrenalina (epinefrina). Mediu-se a velocidade da reação para as misturas reacionais contendo diferentes volumes de EBE, de 0,05 a 0,20 mL, com incrementos de 0,05 mL, adicionou-se 2,40 mL de adrenalina $5,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ preparada em tampão, completou-se o volume, também com tampão, para 3,00 mL, em cubeta de quartzo. O branco utilizado seguiu a mesma proporção do EBE e exceto a adrenalina.¹⁴ A figura 10 mostra uma representação da realização desse procedimento.

Figura 10 - Esquema da determinação da Atividade Enzimática

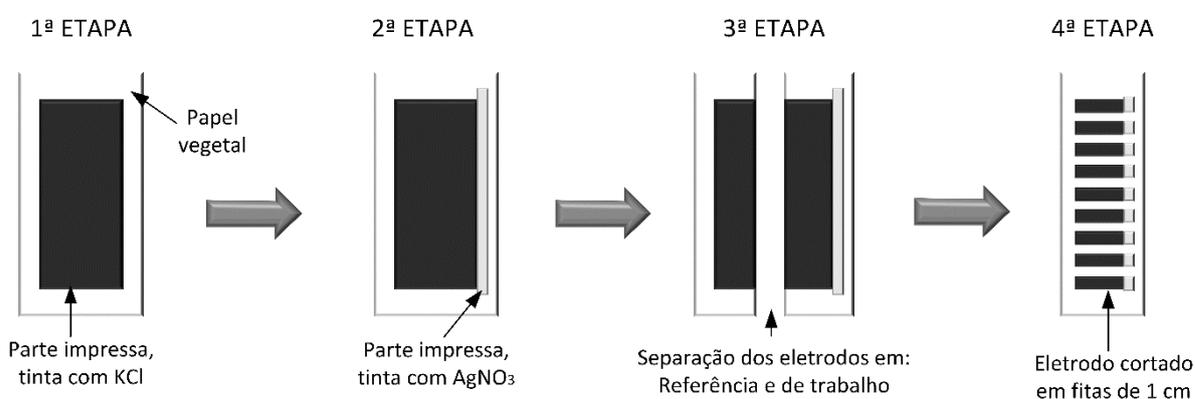


Fonte: do autor, 2016

4.3.1.6 ELETRODO DE TRABALHO (BIOSSENSOR):

O passo seguinte foi imprimir o eletrodo indicador, utilizando a enzima extraída PFO do inhame. Inicialmente, tentou-se colocar a solução enzimática no cartucho e imprimir sobre a base já impressa com tinta e KCl, conforme figura 8. Contudo, houve entupimento dos cartuchos, assim, a camada de enzima passou a ser depositada manualmente nos eletrodos. Também foi feita uma alteração na geometria do eletrodo, o mesmo passou a ser impresso na forma de fitas para facilitar o depósito manual da camada enzimática, conforme figura 11.

Figura 11 - Esquema da construção dos Eletrodos em forma de fitas



Fonte: do autor, 2016

Figura do tamanho de uma folha A4

Conforme o esquema da figura 11 mostra, imprimia-se toda a folha vegetal com a tinta alterada com KCl, posteriormente fazia uma segunda impressão de 1 cm apenas na direita da folha com a tinta alterada com AgNO_3 , para assim obter o eletrodo de referência. Depois da folha vegetal impressa cortava-se no meio e de um lado tinha-se o eletrodo de referência e do outro lado a base para se fazer o eletrodo indicador. A folha vegetal foi cortada então em tiras de 1 cm, tamanho ideal para se fazer as determinações.

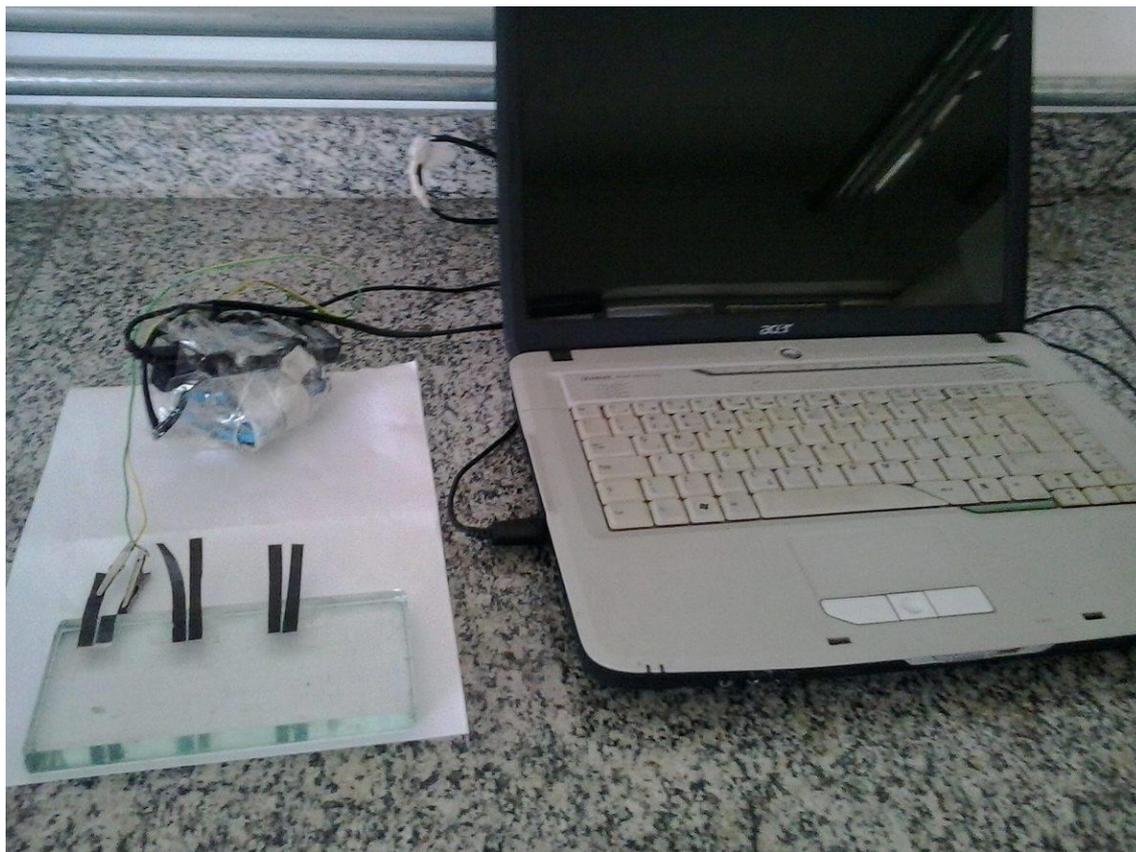
4.3.1.7 ESCOLHA DOS AGLUTINANTES PARA A PASTA DE CARBONO COM EBE.

Para a deposição da camada enzimática, foram feitos testes com diversos aglutinantes. Os aglutinantes testados foram: silicone, vaselina líquida, vaselina sólida e gelatina, com várias concentrações diferentes. Os aglutinantes eram misturados com EBE e pó de grafite para torná-los mais condutores.

Primeiramente, misturou-se o pó de grafite com o EBE, até formar uma pasta homogênea, e por fim adicionou-se o aglutinante (e.g. gelatina).

Quando se empregou a gelatina, como aglutinante, esta foi preparada em tampão (fosfato pH=7,0) na concentração $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, aqueceu-se 10 mL de tampão até chegar próximo à fervura, retirou do aquecimento, e adicionou-se 1 g da gelatina em pó e mexeu-se até total homogeneização. Em seguida foram adicionados 20 μL da mistura (pasta) sobre cada fita do eletrodo indicador. Esse procedimento tinha que ser feito rapidamente para evitar a gelificação enquanto se pipetava em cada eletrodo. Depois de adicionar a pasta sobre os eletrodos, estes foram armazenados no congelador a -12°C “overnight”. A figura 12 mostra um biossensor acoplado ao sistema de leitura do sinal analítico.

Figura 12 - Foto real do Biossensor durante uma análise



Fonte: do autor, 2016

5.3.1.8 DETERMINAÇÕES POTENCIOMÉTRICAS E SISTEMA DE AQUISIÇÃO DE DADOS

O equipamento portátil, para as medidas potenciométricas, foi construído no laboratório e consiste de uma interface Arduino Duo® que possui entradas analógicas com resolução de 12 bits. Para ajuste de impedância de entrada construiu-se um circuito Op-Amp CI OP07 (Analog Devices) do tipo buffer. A comunicação com o usuário foi feita através de um programa desenvolvido em linguagem visual Basic®, a interface foi conectada ao computador através da porta USB.

As leituras potenciométricas foram realizadas da seguinte forma: colocou-se o biossensor e o eletrodo de referência sobre uma placa de vidro, usada como apoio, prendeu-se os jacarés nos respectivos eletrodos e o programa de leitura foi acionado. O sinal inicial é considerado a linha base. Após adicionar-se 50 μL de tampão, obteve-se o primeiro “degrau” que é a diferença entre a linha base e o sinal do tampão. Após 60 s, o

sinal do tampão atinge o máximo e estabiliza, então, se adiciona mais 50 μL da solução de adrenalina. Assim, obtém-se o segundo “degrau”, que é a diferença entre o branco e a adrenalina. Esse é o sinal de interesse.

4.3.2 AVALIAÇÃO DOS PARAMETROS PARA A CONSTRUÇÃO DO BIOSSENSOR EMPREGANDO PLANEJAMENTO FATORIAL E OTIMIZAÇÃO COM MATRIZ DE DOEHLERT.

Na construção dos biossensores, decidiu-se por estudar sete variáveis: Volume da Pasta (VP) adicionado no eletrodo, número de unidades de atividade do extrato adicionado no eletrodo (CE), massa da gelatina (MG) utilizada no preparo da pasta enzimática, massa de grafite (MC) utilizado no preparo da pasta enzimática, tamanho do eletrodo (TE), pH do tampão utilizado na extração da enzima, concentração molar do tampão (CT) utilizado na extração da enzima. Para isso empregou-se uma matriz de experimentos para um planejamento fatorial 2^{7-3} .

Tabela 4 - Planejamento Fatorial Fracionado 2^{7-3}

Experimento/Variáveis							
	1	2	3	4	1234	123	124
1	1	1	1	1	1	1	1
2	-1	1	1	1	-1	-1	-1
3	1	-1	1	1	-1	-1	-1
4	-1	-1	1	1	1	1	1
5	1	1	-1	1	-1	-1	1
6	-1	1	-1	1	1	1	-1
7	1	-1	-1	1	1	1	-1
8	-1	-1	-1	1	-1	-1	1
9	1	1	1	-1	-1	1	-1
10	-1	1	1	-1	1	-1	1
11	1	-1	1	-1	1	-1	1
12	-1	-1	1	-1	-1	1	-1
13	1	1	-1	-1	1	-1	-1
14	-1	1	-1	-1	-1	1	1
15	1	-1	-1	-1	-1	1	1
16	-1	-1	-1	-1	1	-1	-1

Fonte: do autor, 2017

Os níveis para cada variável estudada estão apresentados na tabela 5

Tabela 5 - Níveis com os respectivos valores reais

Variáveis	-1	+1
VP (μL)	20	50
CE (μL)	40	80
G (g)	0,00625	0,0125
MC (g)	0,330	0,400
DE (cm)	0,5	1,0
pH	6	8
CT ($\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	0,1	0,25

Fonte: do autor, 2017

Todos os níveis foram escolhidos considerando testes preliminares em que se obtiveram sinais estáveis com magnitudes mensuráveis. A respeito da massa de gelatina (MG), esta foi preparada usando a mesma quantidade prescrita no rótulo.

Na avaliação dos resultados, notou-se, a partir do diagrama de Pareto, que 3 variáveis apresentaram maior significância e, portanto, passou-se para a etapa de otimização dessas variáveis, o que foi realizado utilizando uma Matriz de Doehlert conforme mostra a tabela 6.

Tabela 6 - Matriz de Doehlert para 3 Variáveis, valores codificados entre parênteses

Experimentos	A -pH	B-CE	C-Ct
1	6 (0)	50 (0)	0,3 (0)
2	8 (1)	50 (0)	0,3 (0)
3	7 (0,5)	80 (0,866)	0,3 (0)
4	7 (0,5)	60 (0,289)	0,5 (0,817)
5	4 (-1)	50 (0)	0,3 (0)
6	5 (-0,5)	20 (-0,866)	0,3 (0)
7	5 (-0,5)	40(-0,289)	0,1 (-0,817)
8	7 (0,5)	20 (-0,866)	0,3 (0)
9	7 (0,5)	40 (-0,289)	0,1 (-0,817)
10	5 (-0,5)	80 (0,866)	0,3 (0)
11	6 (0)	70 (0,577)	0,1 (-0,817)
12	5 (-0,5)	60 (0,289)	0,5 (0,817)
13	6 (0)	30 (-0,577)	0,5 (0,817)

Fonte: do autor, 2017

Com essa otimização percebeu-se a necessidade de um deslocamento da Matriz de Doehlert, portanto foram feitos sete novos experimentos e aproveitado seis experimentos da Matriz anterior, conforme mostra a tabela 7, os experimentos em negrito foram os novos experimentos realizados.

Tabela 7- Deslocamento da Matriz de Doehlert para 3 Variáveis

Experimentos	A	B	C
1	-0,5	0,289	0,817
2	0,5	0,289	0,817
3	0	1,155	0,817
4	0	0,577	1,634
5	-1,5	0,289	0,817
6	-1	-0,577	0,817
7	-1	0	0
8	0	-0,577	0,817
9	0	0	0
10	-1	1,155	0,817
11	-0,5	0,866	0
12	-1	0,577	1,634
13	-0,5	-0,289	1,634

Fonte: do autor, 2017

4.3.3.FIGURAS DE MÉRITO DO BIOSSENSOR.

Durante a caracterização da metodologia os parâmetros analisados foram: faixa de trabalho, linearidade, limite de detecção, exatidão e precisão.

O intervalo de concentração, onde é possível construir uma curva analítica linear corresponde à faixa de resposta linear. Assim, o intervalo de aplicação de um método analítico, pode ser definido como a região da curva analítica compreendida entre a concentração mais baixa até a concentração na qual a curva analítica desvia-se da linearidade.⁴⁴ A faixa de trabalho e linearidade foram estudados através da análise em triplicatas, de soluções padrões de adrenalina em concentrações de 1×10^{-6} a 1×10^{-3} mol.L⁻¹.

O limite de detecção foi estudado através da extrapolação da faixa de trabalho na região linear e a faixa onde não se obtém mais respostas significativas de adrenalina (região de ruído), i.é., faixa em que a resposta para adrenalina se tornou constante. E por

fim, a precisão foi estudada a partir da média dos coeficientes de variação obtidos para as leituras das amostras.

4.3.4 EXATIDÃO APLICAÇÃO EM AMOSTRAS DE ANESTÉSICOS

As amostras de anestésicos foram obtidas em loja especializada em produtos odontológicos. As amostras de anestésicos contendo adrenalina na proporção de 1:100 apresentava concentração molar de $5,45 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, concentração que está dentro da região linear da curva analítica obtida, portanto não houve necessidade de diluição ou pré concentração das amostras. Assim, nenhum tratamento prévio da amostra foi necessário. As leituras eram realizadas da mesma maneira que a curva analítica.

A exatidão foi checada a partir de comparação de resultados. Foram realizadas determinações com o biossensor, construído a partir da metodologia proposta nesse trabalho, e com a metodologia titulométrica, descrita na Farmacopeia Brasileira, 3^a edição, para amostras de anestésicos.⁴⁶

5 RESULTADO E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos durante a execução desse trabalho serão apresentados nos itens abaixo.

5.1 CONSTRUÇÃO DOS ELETRODOS DE TRABALHO E DE REFERÊNCIA

Serigrafia “*SILK SCREEN*”

Nesta etapa, foi necessário utilizar um molde (mascara) para construir os eletrodos, porém, como se estava trabalhando com colas, houve dificuldades para retirar a máscara, já que essa grudava firmemente aos eletrodos, dificultando muito a reprodutibilidade na construção dos mesmos. Além disso, as colas são materiais de difícil manuseio, devido à secagem relativamente rápida e por aderirem em praticamente todos os materiais de trabalho, essas dificuldades inviabilizaram a construção dos eletrodos do tipo “*silk screen*” neste trabalho. Uma foto dos eletrodos construídos com colas pode ser visto na figura 13.

Figura 13 - Foto dos eletrodos construídos através da técnica “*Silk Screen*”



Fonte: do autor, 2016

5.1.1 ELETRODO IMPRESSO

Para a construção dos eletrodos impressos, inicialmente avaliou-se a condutividade das tintas comerciais mais comuns para impressoras HP®. Notou-se a necessidade de melhorar a condutividade, assim, foram feitos testes com adição de substâncias condutoras na tinta utilizada. A substância escolhida a princípio, foi o pó de grafite. Porém, esse se mostrou ineficiente, já que entupia os cartuchos de tinta. Então, passou-se a utilizar Cloreto de Potássio, KCl, pois além de condutor se mostrou solúvel na tinta. Nessa etapa, houve algumas dificuldades já que o KCl, depois de algum tempo de uso, se depositava na parte inferior do cartucho, impossibilitando que esse fosse utilizado, pois eles paravam de funcionar momentaneamente e precisavam sofrer algum tipo de manipulação, tais como colocá-lo em água quente, fazer pressão com uma seringa no topo do cartucho e/ou utilizar o ultrassom como ferramenta de apoio.

A melhor concentração de KCl foi de $0,2 \text{ mol L}^{-1}$. Em concentrações maiores a tinta ficava com a viscosidade diferente das tintas comerciais, e, portanto, não imprimia. Essa concentração foi o limite para deixar a solução suficientemente condutora e ao mesmo tempo não alterar sua viscosidade.

A etapa seguinte foi preparar uma tinta que contivesse AgNO_3 (para a segunda camada do eletrodo de referência) e, ao mesmo tempo, mantivesse a mesma densidade e viscosidade das tintas comerciais, já que esses são parâmetros fundamentais para que a impressora reconheça o cartucho e imprima normalmente. A melhor composição de tinta foi a que continha 81% de água deionizada, 2% de álcool isopropílico, 12% de dietileno glicol e 5% de AgNO_3 . A densidade e a viscosidade dessa tinta podem ser visualizadas na tabela 8.

Tabela 8 - Viscosidade e Densidade das tintas: comercial pigmentada e tinta contendo AgNO_3 preparada no laboratório

Tipo de Tinta	Viscosidade ($\text{N}\cdot\text{s}/\text{m}^2$)	Densidade (g.mL)
Comercial	$1,22 \times 10^{-3} \pm 1,5 \times 10^{-4}$	$1,000 \pm 0,002$
Laboratório	$1,35 \times 10^{-3} \pm 1,5 \times 10^{-4}$	$1,040 \pm 0,000$

Fonte: do autor

Tanto a densidade, quanto a viscosidade, de ambas as tintas, não apresentaram diferenças significativas (tabela 8).

5.1.2 MEDIDAS DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA.

O extrato protéico, ou EBE, foi extraído do inhame e em seguida medido a sua atividade enzimática. Para o cálculo da atividade enzimática (UA, unidade de atividade) foi utilizada a fórmula abaixo.

$$A \text{ (atividade)} = \frac{\Delta_{\text{abs}} \times 1000}{(\Delta T \times b \times V)}$$

Onde:

A = atividade enzimática

Δ_{abs} = variação da absorbância

Δt = variação do tempo (minutos)

b = percurso óptico da cubeta (cm)

V = volume da amostra (mL)

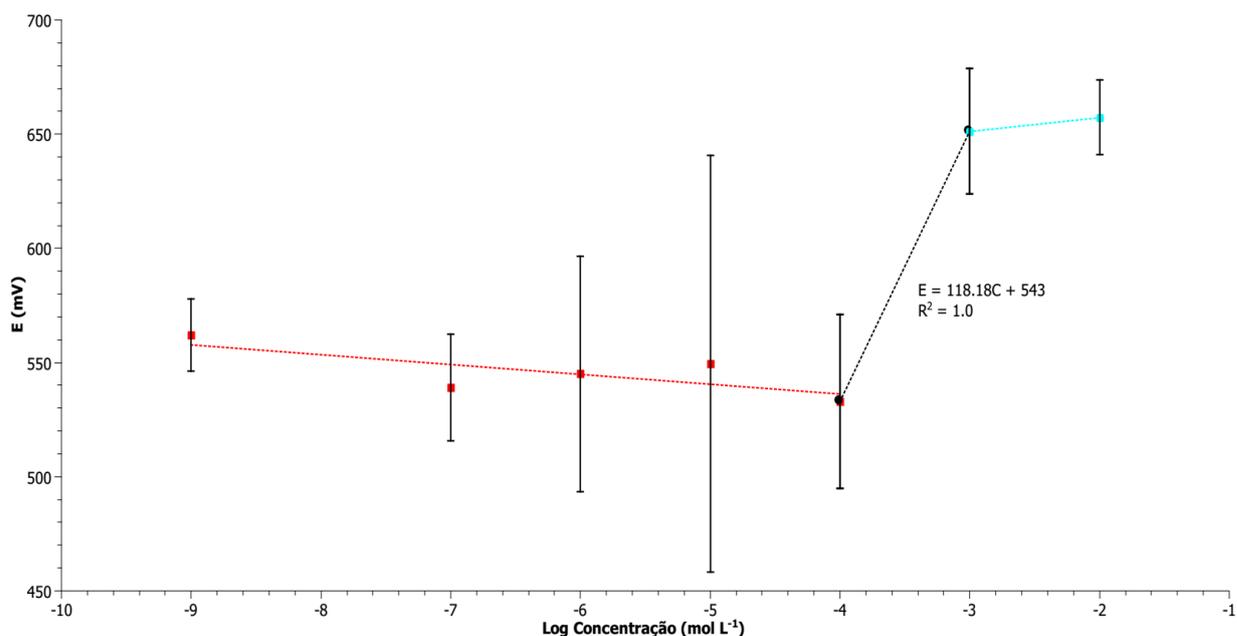
A Atividade enzimática do inhame foi de $720,0 \pm 13,6$ UA. Esse valor foi próximo do valor obtido em trabalhos anteriores.¹⁴

5.2 AVALIAÇÃO DOS ELETRODOS CONSTRUÍDOS EM PAPEL FOTOGRÁFICO

Os primeiros eletrodos, tanto o de referência quanto o biossensor, foram construídos com papel fotográfico. A figura 14 apresenta uma curva analítica obtida com esses eletrodos, os padrões foram preparados em tampão fosfato, pH = 7,0 de concentração $0,1 \text{ mol L}^{-1}$. As leituras foram feitas em triplicatas. A partir dessa curva analítica, obteve-se a Região Linear ($3,0 \times 10^{-3}$ a $4,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$) e o Limite de Detecção = $1,06 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$.

Os biossensores utilizados na construção da curva (Figura 20) foram impressos no mesmo dia das análises e continham 4 camadas de extrato enzimático depositadas com uma micropipeta sobre o eletrodo.

Figura 14- Curva Analítica da adrenalina em tampão fosfato, utilizando papel fotográfico



Fonte: do autor, 2017

Nota-se (figura 14) que a precisão das medidas com os biossensores construídos em papel fotográfico, foi ruim com valores de 4 a 28% de coeficiente de variação. Provavelmente os altos valores de precisão estão relacionados às dificuldades experimentais no momento de se colocar a gota de 20 microlitros de amostra sobre o padrão, como se trata de um papel hidrofóbico, o líquido não ocupava a mesma região sobre cada eletrodo dificultando a repetibilidade (precisão) das medidas. Portanto passou-se a estudar outros tipos de papel a serem utilizados como suporte na construção dos eletrodos.

5.3 AVALIAÇÃO DO PAPEL PARA SUPORTE E AGLUTINANTE DO BIOSSENSOR.

Foram testadas algumas alternativas para tentar controlar a difusão da gota no papel fotográfico, porém sem sucesso. Assim mudou-se o suporte dos eletrodos para a folha vegetal com o intuito de diminuir o desvio padrão das medidas, ou seja, melhorar a precisão.

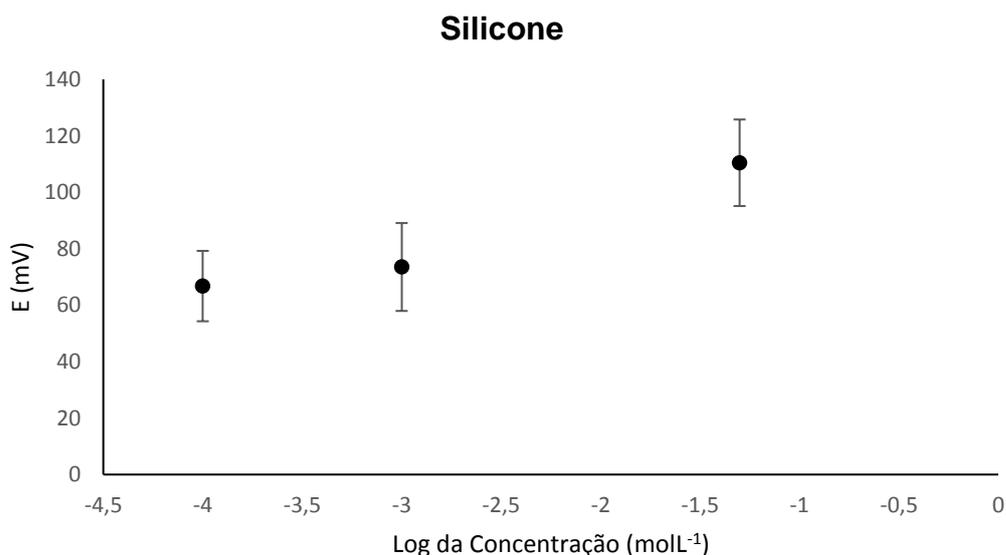
O papel vegetal, diferente de todos os outros papéis testados, apresentou uma hidrofobicidade maior, fazendo com que a gota da solução se mantivesse no lugar em que

foi adicionada. Entretanto, apesar de se resolver o problema da difusão da solução no suporte, os resultados potenciométricos ainda mostravam um alto desvio padrão.

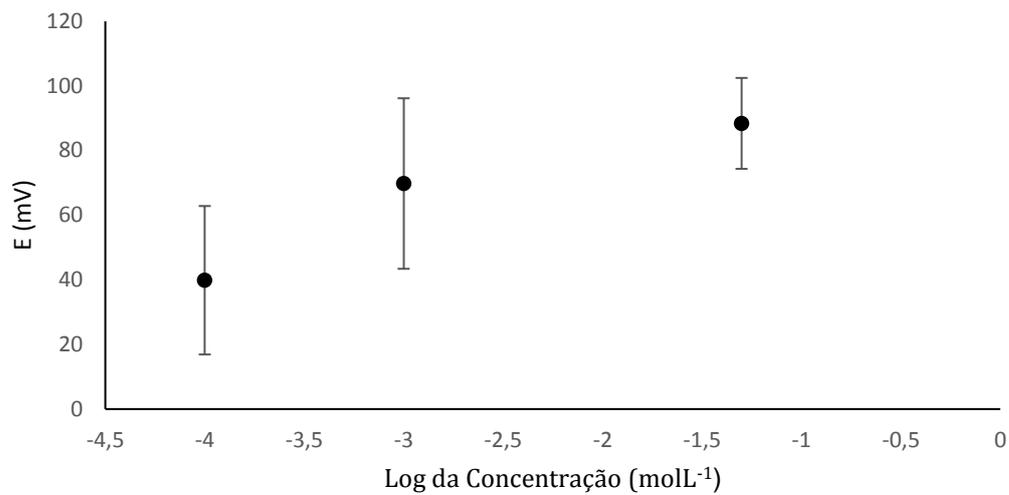
Buscando a resolução do problema de falta de reprodutibilidade, foi necessário estudar quais as possíveis variáveis que estavam influenciando na resposta do biossensor.

O principal parâmetro, observado foi a dificuldade de incorporação do EBE no biossensor, nesse contexto, foram avaliados alguns aglutinantes para melhorar a imobilização da enzima e aumentar a reprodutibilidade, neste estudo empregou-se três concentrações diferentes do analito (ver figura 15). O resultado com os diversos tipos de aglutinantes pode ser observado na figura 15, os aglutinantes testados foram: Vaselina Sólida, Vaselina Líquida, Silicone e Gelatina.

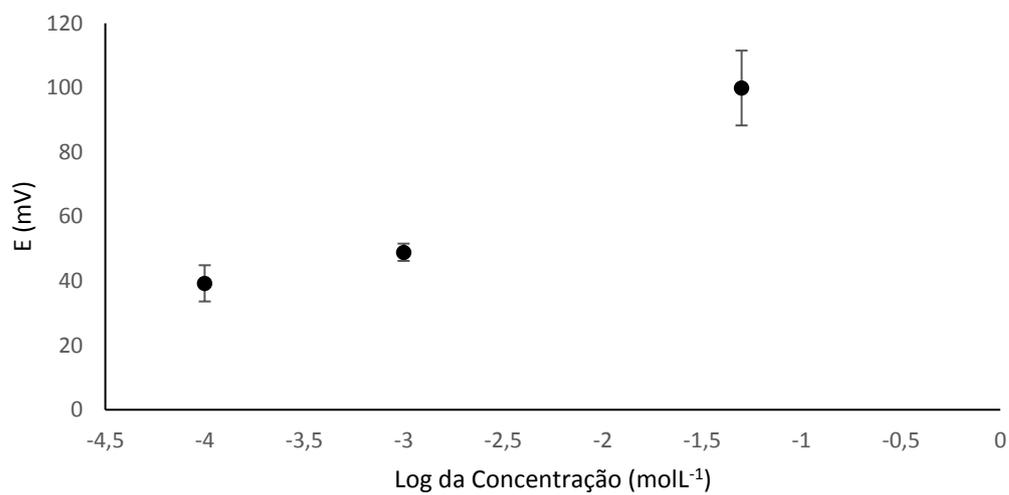
Figura 15 - Teste realizado com aglutinantes diferentes com o intuito de descobrir qual tinha o maior ΔE ao ser misturado com a enzima PFO. Figura a) Silicone; b) Vaselina Líquida; c) Vaselina sólida e d) Gelatina

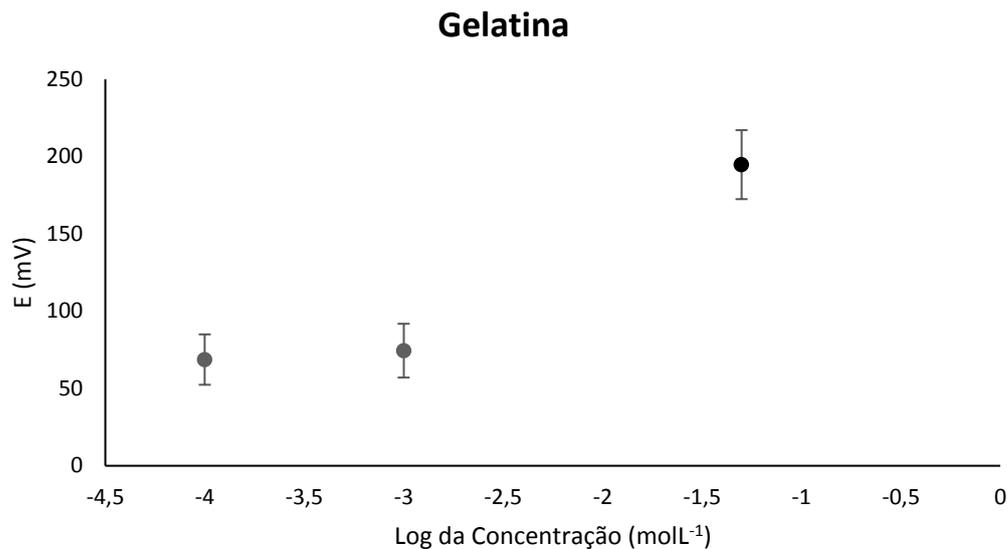


Vaselina Líquida



Vaselina Sólida

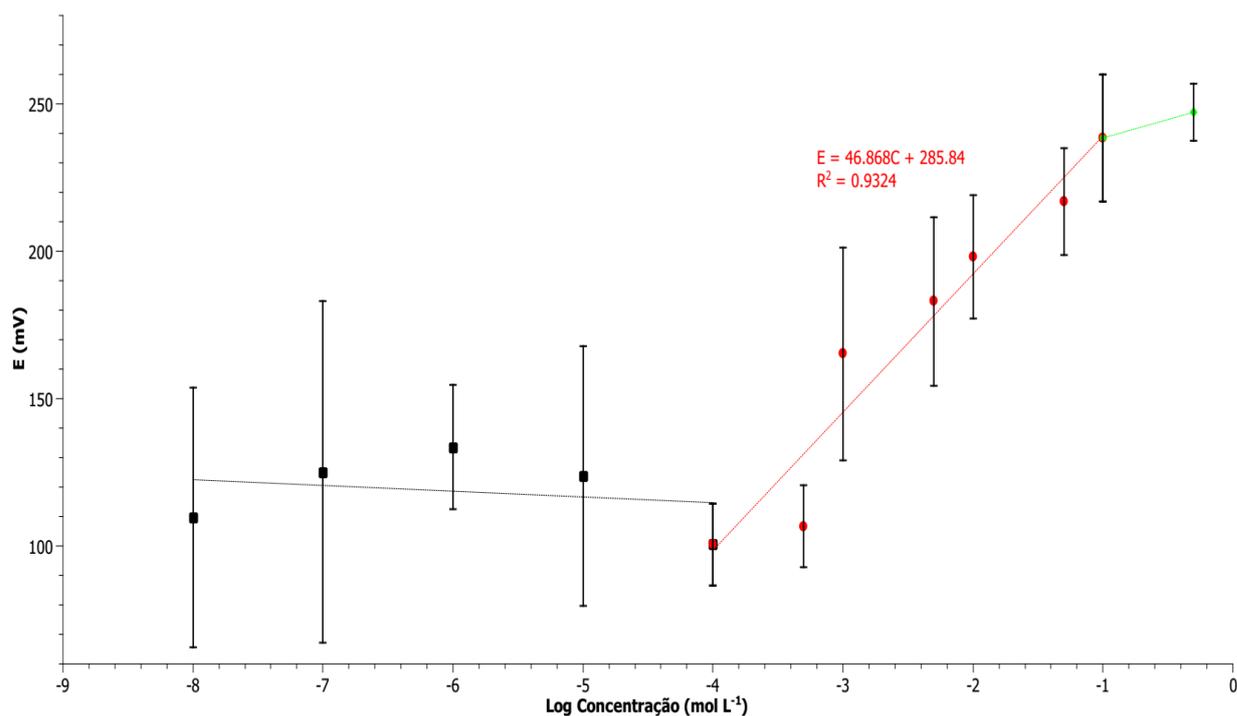




Fonte: do autor, 2016

Conforme apresenta a figura 15, foram realizados testes com 4 tipos de aglutinantes. Trabalhou-se com três concentrações da solução de adrenalina, $5,0 \times 10^{-2}$, $1,0 \times 10^{-3}$ e $1,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹. Um dos principais quesitos analisados foi o desvio padrão obtido para cada concentração de adrenalina. Conforme se vê, tanto o silicone quanto a vaselina sólida apresentaram desvio padrão relativos, muito grandes (dá ordem de 40%), provavelmente devido a maior hidrofobicidade dessas substâncias. A escolha do aglutinante ficou entre a gelatina e a vaselina líquida. Avaliou-se então, visualmente a textura da pasta, e a facilidade de preparo e armazenamento dos biossensores, mas o principal motivo para a escolha desse aglutinante foi o menor desvio padrão das medidas. Após avaliação dos resultados optou-se por trabalhar com papel vegetal, e a gelatina. Portanto o aglutinante selecionado foi a gelatina comercial, pois apresentou resultados satisfatórios em termos de precisão das medidas e também características como: menor custo, boa disponibilidade, boa consistência da pasta de EBE e fácil preparo. A figura 17 mostra uma curva analítica da adrenalina feita em tampão fosfato, pH 7,0, concentração $0,1$ molL⁻¹, com biossensores construídos com papel vegetal e pasta de grafite contendo o aglutinante gelatina, todas as leituras foram feitas e triplicatas.

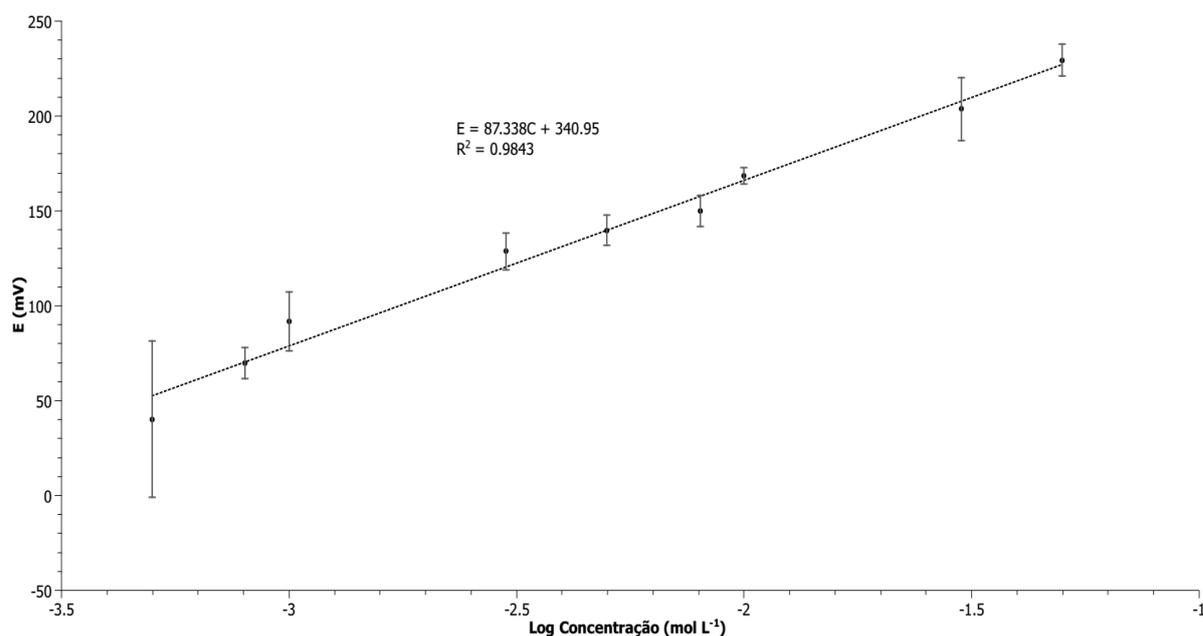
Figura 17 - Curva Analítica da adrenalina em tampão fosfato, utilizando papel vegetal



Fonte: do autor, 2017

Calculou-se o LD para essa curva e encontrou-se o valor de $2,15 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, valor melhor que o encontrado na primeira curva. Então verificou-se a previsão das medidas, assim foram feitos novos testes, porém apenas na região linear. A figura 18 mostra a região linear com equação $E = 46,868 \log C + 285,84$ e $R^2 = 0,9324$. A precisão apresentou coeficiente de variação sempre inferior à 14%.

Figura 18 - Medida Potenciométrica na região Linear da Curva Analítica da solução de adrenalina em tampão fosfato, utilizando papel vegetal e gelatina



Fonte: do autor, 2017

Os resultados obtidos até essa etapa do trabalho corroboram para a funcionalidade e viabilidade do biossensor construído em papel vegetal e pasta de grafite contendo gelatina como aglutinante. Assim, passou-se para a etapa de otimização dos principais parâmetros, empregando ferramentas quimiométricas.

5.4 PLANEJAMENTO FATORIAL E OTIMIZAÇÃO

O planejamento fatorial fracionado 2^{7-3} , envolvendo 16 experimentos foi realizado com a intenção de investigar a influência das variáveis na resposta do biossensor. A tabela 9 mostra a matriz de planejamento experimental e a média dos resultados obtidos em duplicata em cada leitura do biossensor.

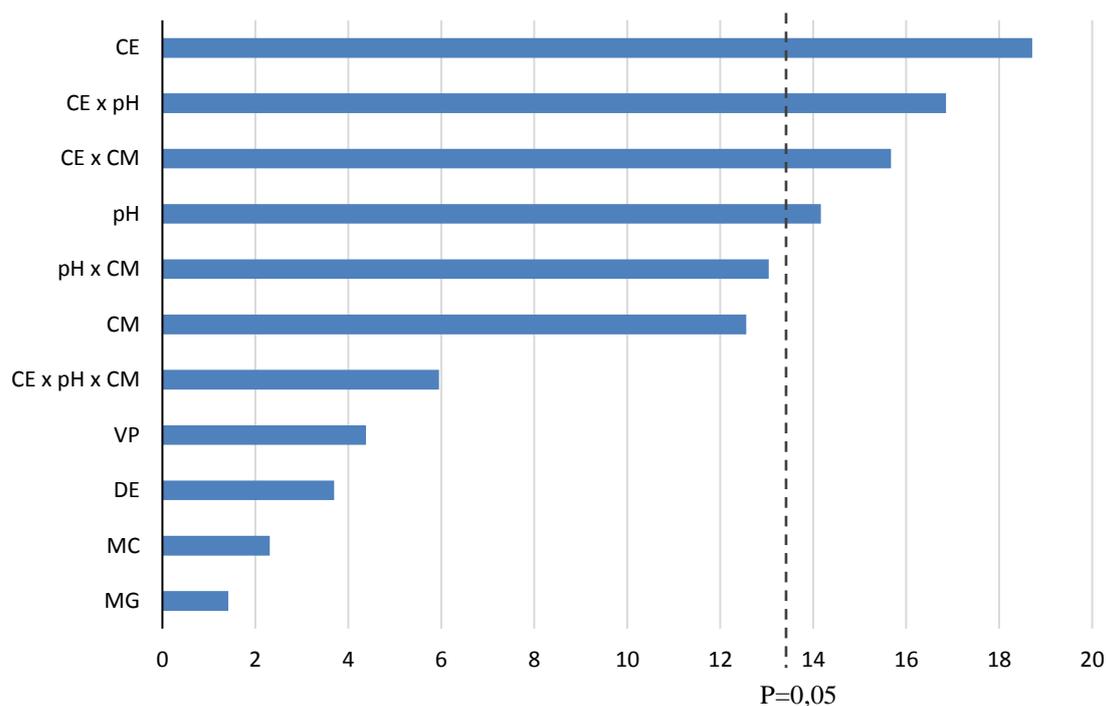
Tabela 9 - Planejamento Fatorial Fracionado 2⁷⁻³

Experimento	Vp	CE	mG	mC	DE	pH	Ct	Sinais (mV)	Desvio Padrão
1	1	1	1	1	1	1	1	36,54	8,44
2	-1	1	1	1	-1	-1	-1	10,93	0,87
3	1	-1	1	1	-1	-1	-1	111,00	20,69
4	-1	-1	1	1	1	1	1	73,37	3,81
5	1	1	-1	1	-1	-1	1	6,63	6,55
6	-1	1	-1	1	1	1	-1	53,03	4,35
7	1	-1	-1	1	1	1	-1	43,95	25,70
8	-1	-1	-1	1	-1	-1	1	221,20	29,66
9	1	1	1	-1	-1	1	-1	69,90	17,97
10	-1	1	1	-1	1	-1	1	93,05	23,01
11	1	-1	1	-1	1	-1	1	107,25	19,48
12	-1	-1	1	-1	-1	1	-1	47,50	4,31
13	1	1	-1	-1	1	-1	-1	72,87	12,10
14	-1	1	-1	-1	-1	1	1	45,57	13,32
15	1	-1	-1	-1	-1	1	1	55,03	12,70
16	-1	-1	-1	-1	1	-1	-1	28,57	5,51

Fonte: do autor

A partir do diagrama de Pareto, figura 19, pode-se observar que as variáveis: Concentração da Enzima, CE, pH e Concentração molar do Tampão, Ct, foram as mais significativas para esse sistema. O diagrama de Pareto mostrou que as interações CE - pH, CE - Ct e pH - Ct também foram significativas.

Figura 19 - Diagrama de Pareto



Fonte: do autor, 2017

A partir do Diagrama de Pareto é possível inferir quais as variáveis mais significativas para o sistema, as barras horizontais maiores que a linha vertical, dada por $p = 0,05$, indicam que o fator é significativo, nota-se, que a variável CE mostrou ser a mais significativa, indicando que uma maior quantidade da enzima corrobora para uma melhora na resposta do biossensor.

O pH e a concentração do tampão apresentaram significâncias, concordando com o trabalho de Xu, J. 2005, em estudo sobre a enzima polifenol oxidase e o melhor pH para extração da enzima, verificando que a enzima permanece mais ativa em pHs menores. Como o pH e o Ct estão ligados diretamente a extração da enzima, portanto, constatar que há interação entre CE - pH e CE - Ct, também reforçam a idéia de que o meio em que a enzima é extraída altera a resposta do biossensor.⁴⁷

Já a dimensão do biossensor, o volume da pasta, a massa da gelatina e do grafite usados na pasta de EBE, não apresentaram significâncias, portanto foram fixadas durante a continuação dos experimentos.

A dimensão do biossensor foi fixada em 0,5 cm, já que há interesse na miniaturização do biossensor. O volume da pasta foi fixado em 30 μL , quantidade suficiente para cobrir toda a superfície do eletrodo de trabalho. A massa de gelatina e grafite foram utilizadas as quantidades de 0,0125 g e 0,400 g respectivamente, essas massas foram escolhidas por resultarem na pasta enzimática com consistência (densidade e viscosidade) mais adequada para o manuseio, principalmente a pipetagem.

Um segundo estudo foi feito usando-se planejamento Doehlert para otimizar as variáveis significativas (Concentração da enzima, pH e concentração do tampão).

5.4.1 Matriz de Doehlert

A matriz de Doehlert para três variáveis consiste de treze experimentos que estão descritos na tabela 10. A concentração da enzima variou de 20 a 80 %, o pH variou de 4 a 8 e a concentração molar do tampão de 0,1 a 0,5 mol L^{-1} . Os valores destacados na tabela 10 foram empregado no experimentos de deslocamento da matriz.

Tabela 10 - Matriz de Doehlert para o planejamento 1

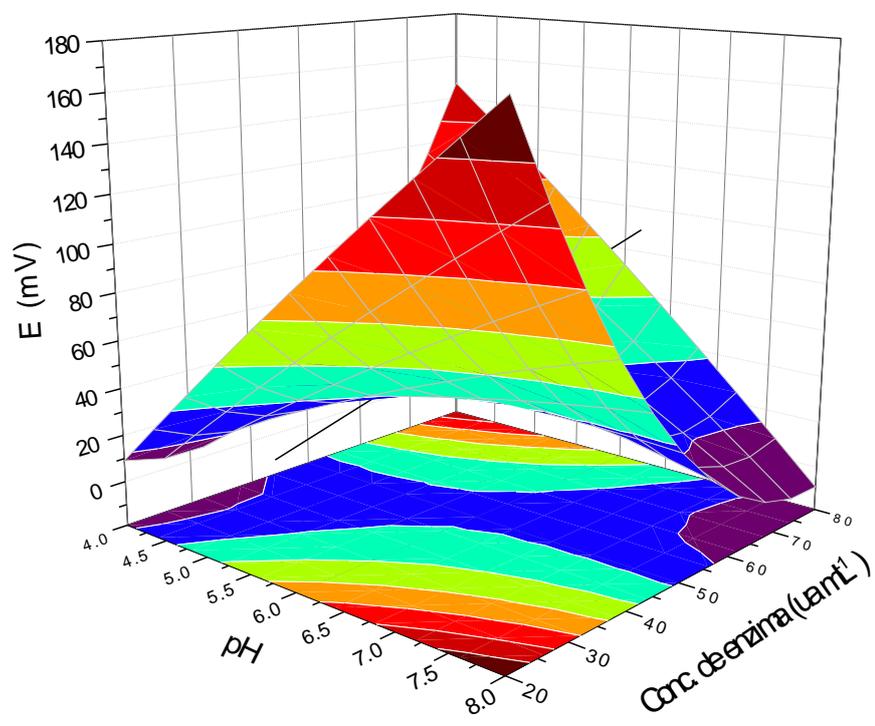
Experimento	CE (%)	pH	Ct (mol.L⁻¹)	Média dos Resultados (mV)	Desvio Padrão
1	50	6	0,3	8,20	3,80
2	50	8	0,3	18,40	7,93
3	80	7	0,3	24,80	11,57
4	60	7	0,5	14,13	6,71
5	50	4	0,3	44,53	8,00
6	20	5	0,3	36,70	9,10
7	40	5	0,1	108,60	5,90
8	20	7	0,3	134,30	4,25
9	40	7	0,1	76,70	7,58
10	80	5	0,3	73,33	13,76
11	70	6	0,1	117,60	2,40
12	60	5	0,5	234,13	21,68
13	30	6	0,5	66,05	22,09

Fonte: do autor, 2017

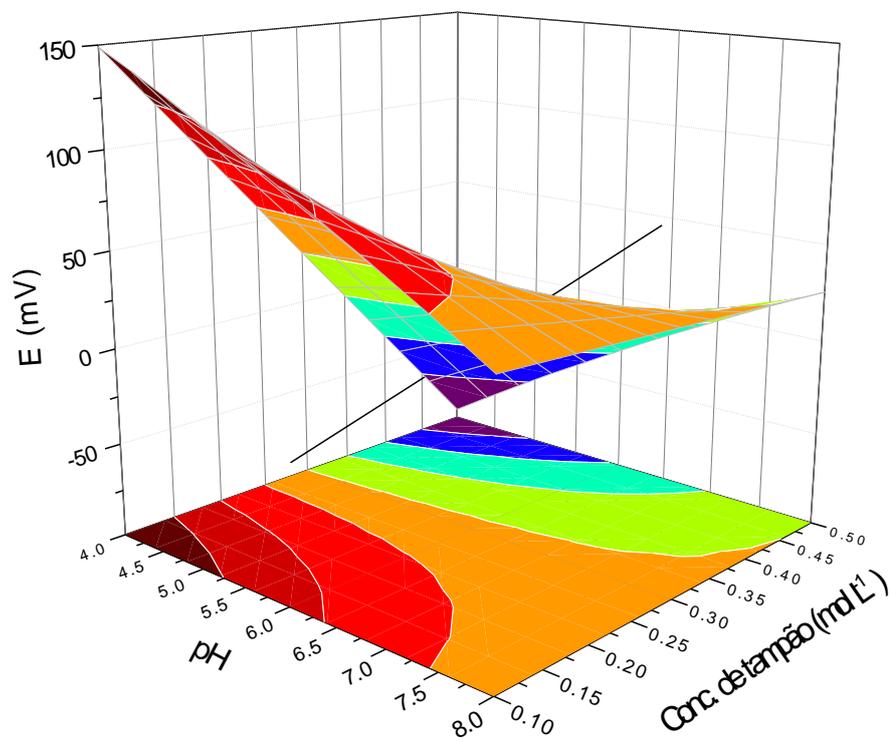
Com os resultados da matriz de Doehlert, fez-se um ajuste com modelo quadrático conforme equação abaixo:

$$R = 34,21 + 2,71 (\text{pH}) - 11,67 (\text{CE}) - 64,30 (\text{Ct}) - 80,61 (\text{pH}) (\text{CE}) + 57,00 (\text{pH}) (\text{Ct}) + 24,64 (\text{CE})(\text{Ct}) - 48,0506 (\text{pH})(\text{CE})(\text{Ct}) - 3,83 (\text{pH})^2 + 50,41 (\text{CE})^2 - 0,09 (\text{Ct})^2$$

Figura 20 - Superfície de resposta pH versus Concentração da enzima (ua mL^{-1})
R = resposta (mV) .

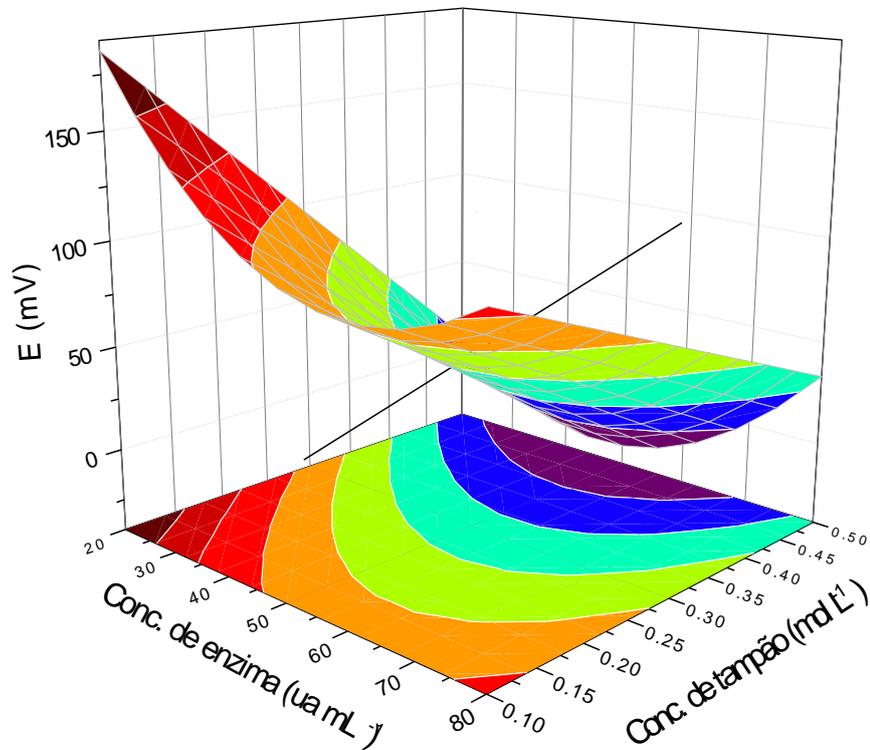


Fonte : do autor, 2017

Figura 21 - Superfície de resposta pH x Concentração molar do tampão (mol L⁻¹)

Fonte: do autor, 2017

Figura 22 - Superfície de resposta Concentração de enzima ($\mu\text{a mL}^{-1}$) x Concentração molar do tampão (mol L^{-1})



Fonte: do autor, 2017

Conforme os gráficos das figura20, 21 e 22 mostram, não foi possível obter máximos locais na região definida para as variáveis Dessa forma foi necessário realizar um deslocamento da Matriz de Doehlert. Assim, acrescentou-se 6 novos experimentos para uma segunda Matriz de Doehlert, conforme tabela 11 .

Tabela 11- Matriz de Doehlert planejamento 2

Experimento	CE (%)	pH	Ct (mol.L⁻¹)	Média dos Resultados (mV)	Desvio Padrão
1	60	5	0,5	234,13	21,68
2	60	7	0,5	14,13	6,71
3	90	6	0,5	169,9	20,38
4	70	6	0,7	96,70	18,11
5	60	3	0,5	75,62	11,42
6	30	4	0,5	58,95	11,64
7	50	4	0,3	44,53	8,00
8	30	6	0,5	66,05	22,09
9	50	6	0,3	71,27	7,58
10	90	4	0,5	81,43	6,05
11	80	5	0,3	36,7	9,10
12	70	4	0,7	85,05	11,68
13	40	5	0,7	75,50	23,36

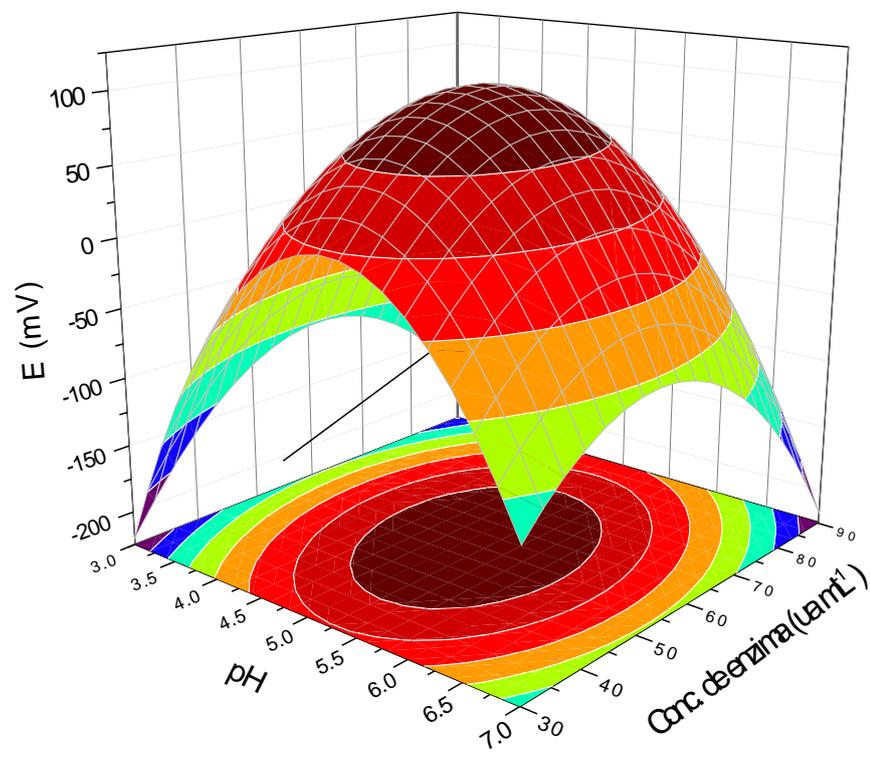
Fonte: do autor

Os dados obtidos na realização dos treze experimentos que compõe a segunda matriz de Doehlert geraram as superfícies de resposta apresentadas no gráfico, que podem ser descritas pela equação abaixo.

$$R = 62,64 - 161,92 (\text{pH}) + 40,07 (\text{CE}) + 258,09 (\text{Ct}) - 36,20 (\text{pH}) (\text{CE}) - 55,28 (\text{pH}) (\text{Ct}) + 99,76 (\text{CE})(\text{Ct}) + 101,8227 (\text{pH}) (\text{CE}) (\text{Ct}) - 188,67 (\text{pH})^2 - 123,84 (\text{CE})^2 - 170,44 (\text{Ct})^2$$

As superfícies de respostas estão apresentadas nas figuras abaixo.

Figura 23 - Superfície de resposta pH versus Concentração da enzima ($\mu\text{a mL}^{-1}$),
R = resposta (mV) .



Fonte : do autor, 2017

Figura 24 - Superfície de resposta pH x Concentração molar do tampão (mol L^{-1})

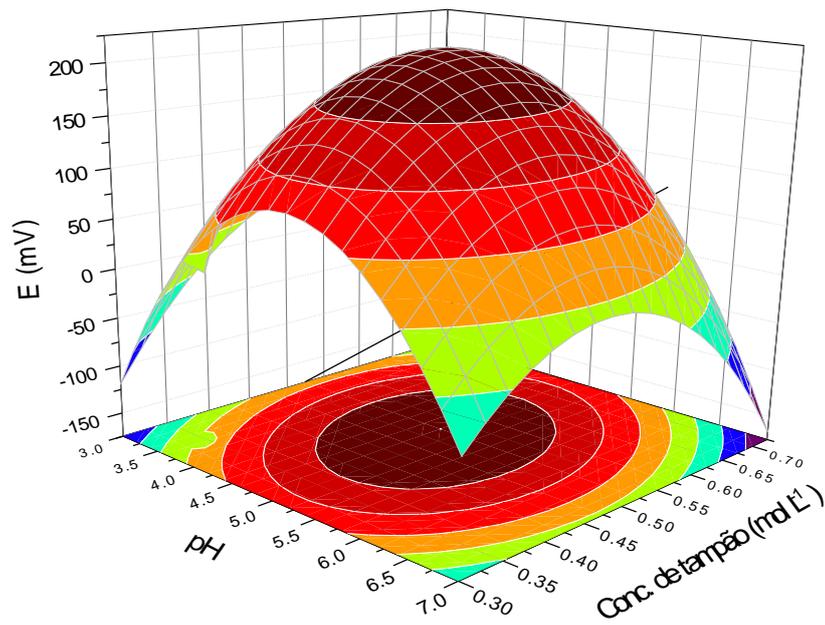
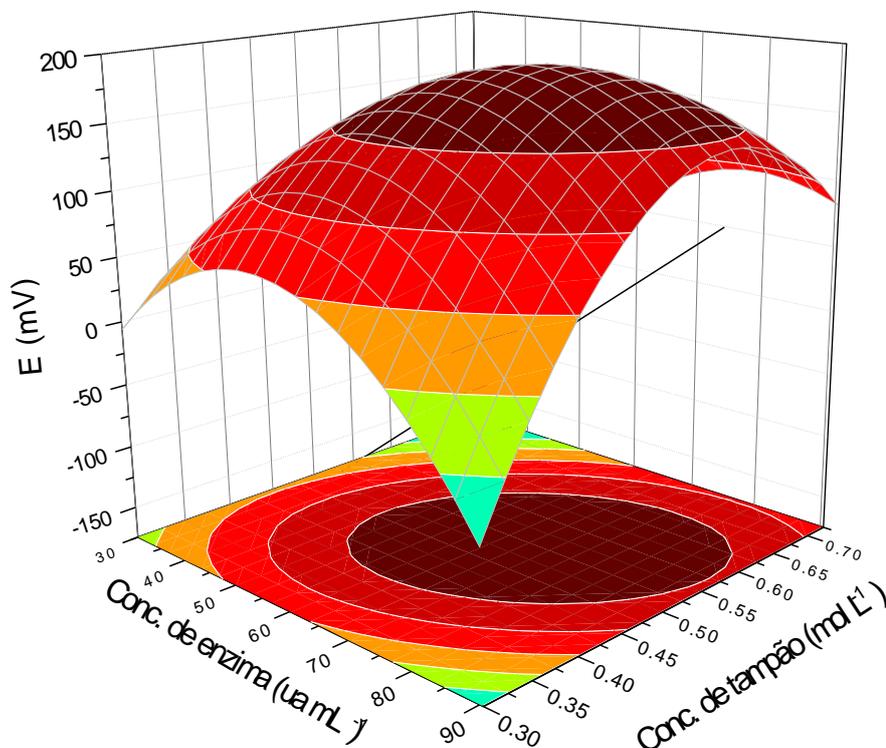


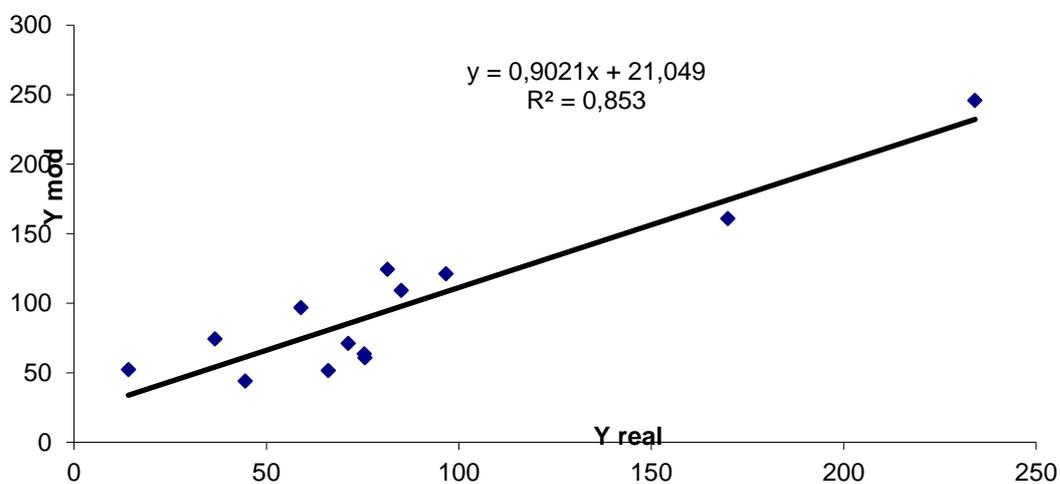
Figura 25 - Superfície de resposta Concentração de enzima (ua mL^{-1}) x Concentração molar do tampão (mol L^{-1})



As coordenadas do ponto máximo podem ser calculadas a partir da derivação da equação abaixo sendo: $\text{pH} = 5$; $\text{CE} = 64,05\%$ e $\text{Ct} = 0,50 \text{ mol.L}^{-1}$.

Para verificar os dados do modelo quadrático obtido com a matriz de Doehlert, fez-se Análise de Variância (ANOVA) os resultados para ($p = 0,05$) indicaram uma regressão significativa com F obtido (11,40) maior que F tabelado (2,19) e $R^2=0,803$, porém houve falta de ajuste no modelo: F obtido (58,32) maior que F tabelado (3,37). Considerando a dificuldade de se obter dados reprodutíveis com eletrodos diferentes para cada medida, pode-se considerar os parâmetros estatísticos aceitáveis. A figura 26 apresenta uma relação entre os valores reais e os valores do modelo indicando uma boa correlação entre os dados.

Figura 26 - Resultado da ANOVA para a matriz de Doehlert utilizada



Fonte: do autor, 2017

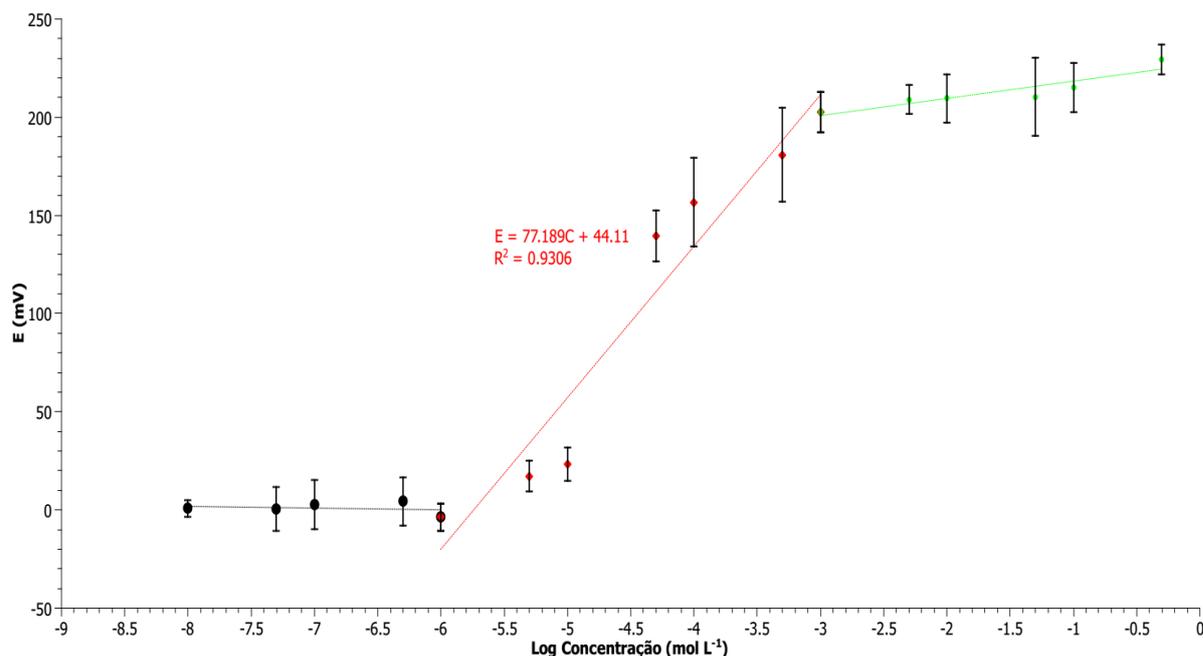
Com os resultados otimizados foi preparada uma nova curva analítica.

Abaixo estão as melhores condições obtidas:

-eletrodo de referências construído em papel vegetal sendo a primeira camada impressa com tinta comum e modificada com $\text{KCl } 0,2 \text{ mol L}^{-1}$, as dimensões do eletrodo são de 5 cm de comprimento por 1 cm de largura a área sensível recoberta com AgCl possui dimensões de 1cm^2 .

- biossensor construído com $1000 \mu\text{L}$ da enzima PFO extraída do inhame, adicionada a $0,330\text{g}$ de Grafite ($0,15\text{g mL}^{-1}$) e $500 \mu\text{L}$ de gelatina (preparada em tampão fosfato pH 7,0).

Figura 27 - Curva Analítica da adrenalina em tampão fosfato, após otimização



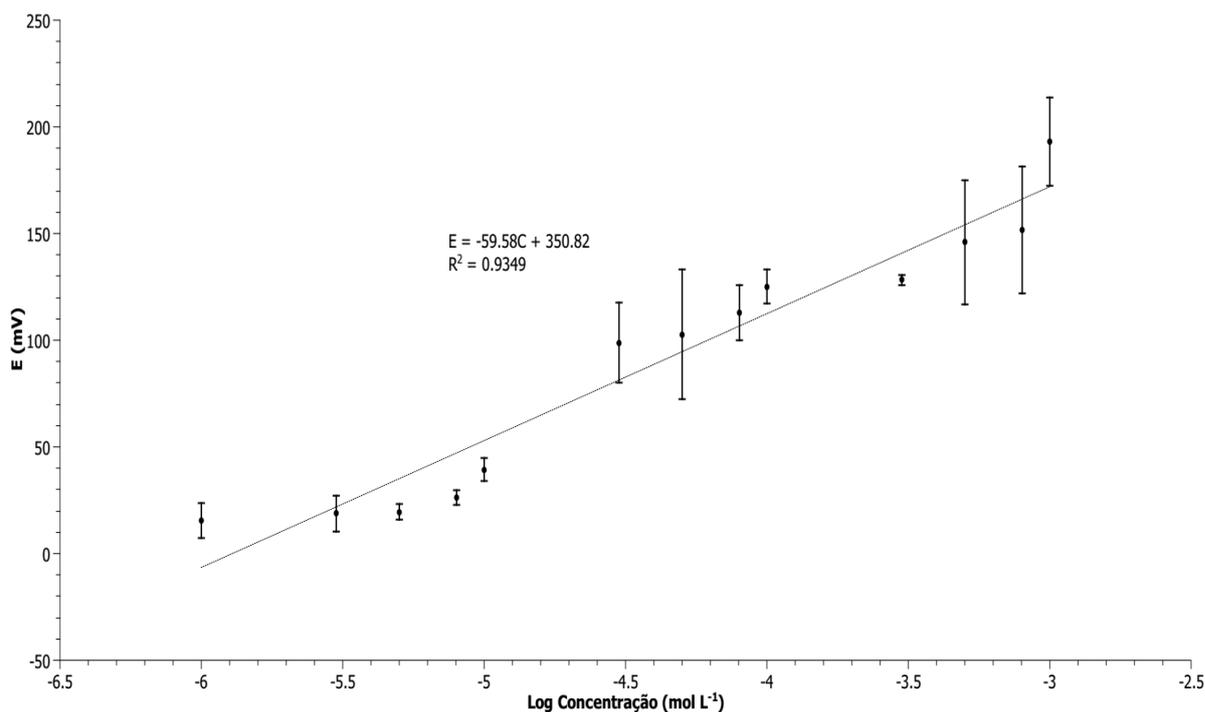
Fonte: do autor, 2017

O LD obtido foi de $1,82 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$. Comparando com trabalhos anteriores, feitos pelo nosso grupo, com a mesma enzima, esse limite de detecção foi menor que o encontrado por Luccas, et al. (2005) que foi de $3 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ e maior que o apresentado por Mataveli et al. (2007) que foi $8,0 \times 10^{-9} \text{ mol L}^{-1}$.^{5,37}

Deve se mencionar que no presente trabalho foi empregado um par de eletrodos para cada leitura e isto certamente influencia na precisão das medidas e consequentemente no LD. A região linear de $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ a $1,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ com equação $E = 59,58C + 350,82$ e $R^2 = 0,9349$, foi semelhante a obtida sem a otimização, contudo houve melhora na precisão das medidas e consequentemente no LD.

Esses resultados apresentam um biossensor com uma maior sensibilidade já que conseguiu detectar adrenalina com duas ordens de grandeza menor que a curva analítica construída antes da otimização. Confirmando assim a importância da otimização multivariada ser utilizada nesse experimento, mostrou que há interação entre as variáveis, informação que não poderia ter sido obtida com a otimização univariada.

Figura 28 - Região linear após a otimização



Fonte: do autor, 2017

5.4.2 PRECISÃO

Nesse trabalho o coeficiente de variação foi sempre inferior a 22 % , deve-se mencionar que todos os eletrodos utilizados, foram descartados, isso é, faz se apenas uma leitura com cada par de eletrodo, então a repetibilidade dos sinais reflete a destreza de todo o procedimento desde o preparo dos eletrodos, preparo das soluções padrões, amostragem e leitura dos sinais.

5.4.3 DETERMINAÇÃO DE ADRENALINA EM MEDICAMENTOS INJETÁVEIS E AVALIAÇÃO DA EXATIDÃO

Para se avaliar a exatidão das medidas foi empregada comparação com o método descrito na Farmacopeia Brasileira (1977) na qual utiliza o método volumétrico em que

a amostra é dissolvida em ácido acético glacial e titulada com ácido perclórico 0,1 mol L⁻¹, usando como indicador violeta cristal. Os resultados são apresentados na tabela 12.⁴⁶

As amostras foram obtidas no comércio local e consistem de Cloridrato de Lidocaína mais adrenalina, cada mL da solução injetável continha 20mg de cloridrato de lidocaína e 10,0 mg de adrenalina base.

Tabela 12 - Determinação de adrenalina em amostra de anestésico, valor rotulado 10 mg/mL.

Amostra	Farmacopeia (mg/mL)	Biossensor (mg/mL)	Erro relativo (%)
1	10,08 ± 0,15	9,60 ± 0,85	4,76
2	9,52 ± 0,33	8,99 ± 0,76	5,57
3	9,89 ± 0,28	9,87 ± 0,91	0,20

Fonte: do autor

Como apresentado na tabela o erro relativo ficou menor que 6% quando comparado com o método da farmacopéia brasileira.⁴⁶

6 CONCLUSÃO

Construiu-se um eletrodo impresso em papel vegetal empregando tinta comercial HP® modificada com adição de $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ de KCl, para o eletrodo de referência, imprimiu-se, sobre a primeira camada com KCl, mais três camadas com tinta comercial na qual foi adicionado AgNO_3 , esse eletrodo apresentou coloração característica de Ag/AgCl. Depois do planejamento fatorial e otimização por matriz de Doehlert as características do biossensor que apresentaram melhor resposta foram as que se utilizou a proporção de gelatina $1000\mu\text{L}$ de EBE, $500\mu\text{L}$ de gelatina e $0,330\text{g}$ de pó de grafite onde o extrato apresentava 64% de concentração da enzima PFO. A geometria escolhida para esse trabalho foi a na forma de fitas de 1cm de largura por 5cm de comprimento. O sistema tampão, para o preparo do extrato protéico, que apresentou melhores resultados foi o tampão acetato de pH 5 e concentração molar de $0,5 \text{ mol L}^{-1}$.

As principais características do biossensor foram: Limite de Detecção igual $1,82 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ e faixa linear de $1,0 \times 10^{-3}$ a $1,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$, resultados obtidos para replicatas feitas com pares de biossensores diferentes, já que cada leitura era realizada com uma par de biossensor. Adicionalmente tem-se o baixo custo do projeto e a sua possível reprodução em larga escala, além da simplicidade do Biossensor e tamanho reduzido.

REFERÊNCIAS

1 BHALLA N., JOLLY P., FORMISANO N., ESTRELA P., Introduction to biosensors, **Essays Biochem.** v. 60(1), p. 1–8, 2016.

2 HANSEN, A. M. et al. Validation of a high performance liquid chromatography analysis for the determination of noradrenaline and adrenaline in human urine with an on-line sample purification. **Talanta**, Oxford, v. 50, p. 367-379, 1999.

3 MEHROTRA P., Biosensors and their applications – A review, **J Oral Biol Craniofac Res.** v. 6(2), p. 153–159, 2016.

4 FELIX, E.S., YAMASHITA, M., ANGNES, L., Epinephrine quantification in pharmaceutical formulations utilizing plant tissue biosensors, **Biosens. Bioelectron.** v. 21, p. 2283–2289, 2006.

5 MOREIRA, L. N.; MAGALHÃES, C. S.; LUCCAS, P. O. Emprego de sistema em análise de fluxo contínuo com biossensor potenciométrico para determinação de adrenalina em medicamentos. **Infarma**, Brasília, v. 16, p. 59-62, 2005.

6 MAYER, A. M. Polyphenoloxidases in plants and fungi: going places? A review. **Phytochem.**, Oxford, v. 67, p. 2318-2331, 2006.

7 MARTINEZ, A. W.; PHILLIPS, S. T.; WHITESIDES, G. M. and CARRILHO E. Diagnostics for the Developing World: Microfluidic Paper-Based Analytical Devices **Anal. Chem.**, v. 82, p. 3–10, 2010.

8 TEMIZ, Y. et al.. Lab-on-a-chip devices: How to close and plug the lab?, **Microelectronic Engineering**, v. 132, p. 156-175, 2015.

9 JUNG, W. et al, Point-of-Care Testing (POCT) Diagnostic Systems Using Microfluidic Lab-on-a-Chip Technologies. **Microelectronic Engineering**, v. 132, p. 46-57, 2015.

10 ROCHA, A.M.C.N., MORAIS, A.M.M.B, Characterization of polyphenoloxidase (PPO) extracted from 'Jonagored' apple. **Food Control** v. 12, p. 85–90, 2001.

11 ÜNAL, M.U., Properties of polyphenol oxidase from Anamur banana (*Musa cavendishii*). **Food Chem.** v. 100, p. 909–913, 2007.

12 KAWADA, T. et al. Liquid chromatographic determination of myocardial interstitial epinephrine. **J. Chromatogr. B.** v. 714, p. 375–378, 1998.

13 HARPER, H. P. **Manual de química fisiológica**. 5. ed. São Paulo: Atheneu, 1982.554.

14 MATAVELI, L. R. V. **Construção e caracterização de um minibiossensor para determinação de adrenalina em amostras de interesse farmacêutica**, 2007. 81 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal de Alfenas, Alfenas.

15 GARRIDO, E.M., LIMA, J.L.F.C., DELERUE-MATOS, C., Flow injection amperometric determination of L-dopa, epinephrine or dopamine in pharmaceutical preparations. **J. Pharm. Biomed. Anal.** v.15, p. 845–849, 1997.

16 RONKAINEN N.J., HALSALL H.B.; HEINNEMAN W.R., Electrochemical biosensors. **ChemSoc Rev**; v. 39, p. 1747-1763, 2010.

17 GRIESHABER D., MACKENZIE R., VÖRÖS J., REIMHULT E., Electrochemical Biosensors - Sensor Principles and Architectures, **Sensors**, v. 8(3) p. 1400–1458, 2008.

18 THEVENOT, D.R., TOTH, K., DURST, R.A., WILSON, G.S., Electrochemical biosensors: recommended definitions and classification. **Biosens. Bioelectron.** v.16, p. 121-131, 2001.

19 BAHADIR, E.B; SEZGINTURK M.K. Electrochemical biosensors for hormone analyses. **Biosensors and Bioelectronics.** v.68, p 62-71, 2015.

20 GONÇALVES, A. L. M. **Design e fabrico de novos eléctrodos impressos em Papel para desenvolvimento de biossensores enzimáticos com aplicações biomédicas.** 2014, f. 72 Dissertação (Mestre em engenharia Biomédica), Faculdade de Ciências e Tecnologia e Universidade Nova de Lisboa, Lisboa.

21 MELO, E. I. **Desenvolvimento de biossensor potenciométrico em eletrodo de grafite modificado com aminofenóis para determinação de diclorvóse em alimentos de origem vegetal.** 2009 f.169 Dissertação (Doutorado em Química Analítica), UFG, UFMS e UFU, Uberlândia.

22 GUPTA, V.K. et al. A new approach for the degradation of high concentration of aromatic amine by heterocatalytic Fenton oxidation: Kinetic and spectroscopic studies, **Journal of Molecular Liquids**, v. 177, p. 114-118, 2013.

23 ROTARIU, L., BALA, C., MAGEARU, V., New potentiometric microbial biosensor for ethanol determination in alcoholic beverages. **Anal. Chim. Acta** v. 513, p. 119–123, 2004.

24 EGGINS, B.R., **Biosensors: Introduction**, 1st ed. Wiley Teubner, New York, 1996.

25 MARQUES, P. R. B. O; FARIA, R. C. E FERNANDES, J. B. Avaliação de eletrodos impressos modificados com enzimas AChE imobilizadas com náfon sobre carbono-meldola blue. **Ibersensor**, v. 137, p. 9-11, Lisboa, 2010.

26 LIANA D.D. et. al., Recent advances in paper-based sensors. **Sensors (Basel).**; v.12, p.11505–11526, 2012.

27 LI, M., LI, Y.T., LI, D. W., LONG, Y. T. Recent developments and applications of screen-printed electrodes in environmental assays—A review. **Anal. Chim. Acta**, v. 734, p. 31-44, 2012.

28 KAMPOURIS, D.K., KADARA, R.O., JENKINSON, N., BANKS, C.E., Screen printed electrochemical platforms for pH sensing. **Anal. Methods**, v.1 p. 25-28, 2009.

29 RENEDO, O.D., ALONSO-LOMILLO, M.A., MARTINEZ, M.J.A., Recent developments in the field of screen-printed electrodes and their related applications. **Talanta** v. 73, p. 202–219, 2007.

30 GODINO, N. et al., Fabricating electrodes for amperometric detection in hybrid paper/polymer lab-on-a-chip devices. **Lab Chip**, v.12, p.3281–3284, 2012.

31 UIC-University of Illinois at Chicago, Department of Pathology. 2011. Disponível em <http://pathology.uic.edu/clinical_pathology/POCTesting.asp> Acesso em: 25 Jul. 2017.

32 Price CP. Clinical review Point of care testing. 2001. Disponível em <<https://www.aacc.org/~media/practice-guidelines/point-of-care-testing/poct-entire-lmpg.pdf?la=en>> Acesso em: 22 Apr. 2017.

33 COWLE, I. A pragmatic approach to point-of-care testing. **Point of view**, v.1, p. 35-37, 2009.

34 MARK, D. et al., Microfluidic lab-on-a-chip platforms: requirements, characteristics and applications **Chem. Soc. Rev.**, v. 39, p. 1153–1182, 2010.

35 GOODMAN, L. S.; GILMAN, A. **As Bases Farmacológicas da Terapêutica**. 11 ed., Rio de Janeiro: McGraw- Hill Interamericana do Brasil, 2006.

36 SZEPONIK, J. et al. Ultrasensitive bienzyme sensor for adrenaline. **Biosensor & Bioelectronics**, v. 12, p. 9-10, 1997.