UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

INSTITUTO DE QUÍMICA

Programa de Pós-Graduação em Química

DESENVOLVIMENTO DE UM SENSOR PARA
ANÁLISE DE LACTATO EM AMOSTRAS
ALIMENTARES E BIOLÓGICAS

Denise Lowinsohn

Tese apresentada ao Instituto de Química da
Universidade de São Paulo para obtenção do
Título de Doutor em Química (Química
Analítica)

Orientador: Prof. Dr. Mauro Bertotti

São Paulo

Data de depósito na SPG:

01/02/2007

Aos meus pais, irmãos e amigos.

**Ao Prof. Dr. Mauro Bertotti
pela orientação, paciência, a amizade
no desenvolver deste trabalho e
pelo privilégio de aprender.**

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Roberto Tokoro, pelo convívio, conhecimentos transmitidos e pela amizade.

Aos Profs. Drs. do Instituto de Química Claudimir Lucio do Lago, Elizabeth de Oliveira, Fábio Rodrigo Piovezani, Ivano Gebhart Rolf Gutz, Jorge César Masini, Lúcio Angnes, Maria Encarnación Vásquez Suárez Iha, Nina Coichev, Pedro Vitoriano de Oliveira, Renato Sanches Freire, Silvia Helena Pires Serrano, pelo incentivo e conhecimentos transmitidos.

A todos os colegas do laboratório Maiara, Priscilla, Thiago, Tiago e Valber, pela amizade e pelos bons momentos.

Aos colegas da pós-graduação Cassiana, Juliana, Helena e Rodrigo pelas conversas e constante ajuda.

Aos meus amigos da época de graduação Allan, Cristiane, Celina, Elaine e Wilma, que me concederam suas amizades.

Aos técnicos Cristina e Fernando pelos constantes auxílios.

Às secretárias da Química Analítica, Célia e Marlene, pela presteza de seus serviços.

Às funcionárias Lúcia e Luciana que sempre foram muito prestativas.

A todos os funcionários da Seção de Graduação, de Pós Graduação e Assistência Acadêmica, pela forma eficaz e bondosa como realizam os seus trabalhos.

Aos colegas, professores e funcionários do Instituto de Química, pelo agradável convívio.

Aos meus pais, Jean e Kazuko, verdadeiros responsáveis pela minha formação.

Aos meus irmãos, Daniela e Daniel, pelo incentivo e apoio ao longo desta caminhada.

A todos que de alguma forma colaboraram no desenvolvimento deste trabalho.

À FAPESP, CNPq, CAPES e Pró Reitoria de Pós Graduação da USP pelo suporte financeiro.

Muito Obrigada

ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E DEFINIÇÕES

AP ou PB	Azul da Prússia ou “ <i>Prussian Blue</i> ”
BG	Verde de Berlin (“ <i>Berlin Green</i> ”)
BP ou PW	Branco da Prússia ou “ <i>Prussian White</i> ”
C	Concentração
CTAB	Brometo de cetiltrimetilamônio
FC b ₂	Flavocitocromo b ₂
e ⁻	Elétrons
E	Enzima
E _{aplicado}	Potencial aplicado
ECS	Eletrodo de calomelano saturado
E _{Oxid}	Enzima oxidada
E _{Red}	Enzima reduzida
FIA	Análise por Injeção em Fluxo (“ <i>Flow Injection Analysis</i> ”)
GPT	“ <i>Glutamic pyruvic transaminase</i> ”
HCF(s)	Hexacianoferrato(s)
HRP	“ <i>Horseradish peroxidase</i> ”
I	Corrente
Med _{Oxid}	Mediador oxidado
Med _{Red}	Mediador reduzido
MHCF	Metal-hexacianoferrato
NAD ⁺ , NADH	Nicotinamida – Adenina – Dinucleotídeo e sua forma reduzida
LDH	Lactato desidrogenase
LOD ou LOX	Lactato oxidase

LMO	Lactato monooxygenase
v	Velocidade de varredura
U	Unidades
ϕ	Diâmetro interno
λ	Comprimento de onda

ÍNDICE GERAL

RESUMO	xvii
ABSTRACT	xix
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Lactato – importância	1
1.2. Lactato – determinação.....	2
1.3. Sensores	7
1.4. Biossensores	9
1.5. Métodos de imobilização de enzimas na superfície do eletrodo	12
1.6. Modificação na superfície do eletrodo	14
1.7. Hexacianoferratos.....	16
1.8. Biossensores para determinação de lactato utilizando a enzima lactato oxidase	18
2. OBJETIVOS	21
3. PARTE EXPERIMENTAL.....	22
3.1. Reagentes e soluções	22
3.2. Construção do eletrodo de referência de Ag/AgCl.....	24
3.3. Preparação do eletrodo modificado com metal-hexacianoferrato (MHCF)	24
3.3.1. Filmes de cobalto-hexacianoferrato e de cobre-hexacianoferrato em eletrodo de platina	24
3.3.2. Filme de cobalto-hexacianoferrato em eletrodo de carbono vítreo	25
3.3.2.1. Solução recém-preparada	25
3.3.2.2. Solução deixada em repouso em diferentes tempos antes da execução dos voltamogramas	26

3.3.3. Filme de ferro-hexacianoferrato em eletrodo de carbono vítreo	26
3.3.3.1. Em meio ácido	26
3.3.3.2. Em meio ácido contendo CTAB e variando o eletrólito suporte.....	26
3.3.3.3. Em meio ácido contendo CTAB e variando a relação da concentração de KCl e NaCl	27
3.4. Imobilização da enzima lactato oxidase na superfície do eletrodo	27
3.5. Instrumentação	28
3.6. Amostras reais	30
3.6.1. Cerveja.....	30
3.6.2. Sangue	31
4. RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	32
4.1. Comportamento eletroquímico do lactato em diversos eletrodos e em meio de diferentes valores de pH	32
4.2. Comportamento eletroquímico do H_2O_2 em diferentes eletrodos	36
4.3. Estudos com eletrodos modificados com filmes MHCF para detecção de peróxido de hidrogênio	39
4.3.1. Co^{2+} ou Cu^{2+} / $Fe(CN)_6^{3-}$	39
4.3.1.1. Eletrodo de platina.....	39
4.3.1.2. Eletrodo de carbono vítreo	43
4.3.2. Fe^{3+} / $Fe(CN)_6^{3-}$	48
4.4. Construção do biossensor	60
4.4.1. Imobilização da lactato oxidase (LOX).....	60
4.4.2. Quantidade de enzima imobilizada na superfície do eletrodo modificado	61
4.5. Otimização dos parâmetros para o FIA	62
4.5.1. Efeito do pH	63

4.5.2. Efeito da vazão	64
4.5.3. Efeito do volume da amostra	65
4.5.4. Repetibilidade e frequência analítica.....	66
4.5.5. Linearidade e limite de detecção	67
4.5.6. Interferentes.....	67
4.5.7. Estabilidade e reprodutibilidade	68
4.6. Determinação de lactato em cervejas utilizando análise por injeção em fluxo	70
4.7. Determinação de lactato em sangue utilizando análise por injeção em fluxo .	72
5. CONCLUSÕES.....	79
6. PERSPECTIVAS FUTURAS	81
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	82
8. CURRICULUM VITAE	92
8.1. Dados pessoais.....	92
8.2. Formação acadêmica	92
8.3. Experiência profissional	93
8.4. Curso extracurricular	95
8.5. Prêmios	95
8.6. Produção científica	96
8.6.1. Trabalhos apresentados em reuniões científicas.....	96
8.6.2. Artigos em periódicos publicados	100
8.6.3. Artigos em periódicos submetidos para publicação	103

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Comparação de métodos eletroanalíticos perante outros métodos utilizados para quantificação de lactato.	3
Figura 2. Diagrama esquemático da detecção de L-lactato em microeletrodo de platina. A presença de diferentes camadas permite a detecção seletiva de L-lactato. (adaptado do artigo J. J. Burmeister, M. Plamer and G. A. Gerhardt, Biosens. Bioelectron., 2005 , 20, 1772-1779.)	6
Figura 3. Esquema geral dos principais componentes de um sensor.....	8
Figura 4. Alguns aspectos importantes a serem considerados na escolha de um sensor..	8
Figura 5. Representação esquemática de biossensores. (adaptado do artigo K. R. Rogers, Anal. Chim. Acta, 2006 , 568, 222-231.)	9
Figura 6. Esquema representativo para um biossensor de primeira geração.....	10
Figura 7. Esquema representativo para um biossensor de segunda geração.	11
Figura 8. Esquema representativo para um biossensor de terceira geração.	11
Figura 9. Esquemas das enzimas imobilizadas por (a) adsorção, (b) ligação covalente, (c) ligação cruzada, (d) oclusão e (e) microencapsulação.....	14
Figura 10. Esquema do sistema FIA: (A) amostra, (B) bomba peristáltica, (C) solução transportadora, (D) detector e (L) descarte. Esquema da célula utilizada: (a) entrada do fluxo; (b) descarte; (c) eletrodo auxiliar; (d) eletrodo de trabalho e (e) eletrodo de referência.	29
Figura 11. Voltamograma cíclico do eletrodo de cobre em meio de NaOH 1 mol L ⁻¹ . $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$	33

Figura 12. Voltamogramas obtidos em solução de NaOH 1 mol L ⁻¹ antes (a) e depois (b) da adição de lactato (concentração final = 40 mmol L ⁻¹), utilizando eletrodo de cobre. $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$	34
Figura 13. Curva amperométrica obtida em solução de NaOH 1molL ⁻¹ referente a adições sucessivas de alíquotas de lactato (Concentração em solução = 20 mmol L ⁻¹), utilizando eletrodo de cobre e sua respectiva curva analítica. $E_{\text{aplicado}} = 0,6 \text{ V}$. Curva amperométrica obtida sob agitação magnética.....	35
Figura 14. Voltamogramas de varredura linear obtidos utilizando eletrodo de platina na ausência (a) e na presença de H ₂ O ₂ : 1 mmol L ⁻¹ (b), 2 mmol L ⁻¹ (c), 3 mmol L ⁻¹ (d) em meio de tampão fosfato pH = 7,2. $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$	37
Figura 15. Voltamogramas de varredura linear consecutivos obtidos utilizando eletrodo de platina na presença de H ₂ O ₂ 2 mmol L ⁻¹ : (a) 1º ciclo, (b) 2º ciclo e (c) 3º ciclo em meio de tampão pH = 7,2. $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$	38
Figura 16. Formação dos filmes (A) CoHCF e (B) CuHCF em eletrodo de platina a partir da solução recém preparada de KCl 0,5 mol L ⁻¹ , K ₃ Fe(CN) ₆ 1 mmol L ⁻¹ e respectivamente CoCl ₂ 1 mmol L ⁻¹ ou CuCl ₂ 1 mmol L ⁻¹ . $v = 100 \text{ mV s}^{-1}$. 15 ciclos...	39
Figura 17. Verificação da estabilidade dos filmes gerados, (A) CoHCF e (B) CuHCF, em eletrólito suporte (KCl 0,5 mol L ⁻¹). $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$. 15 ciclos.	40
Figura 18. Voltamogramas cíclicos obtidos utilizando eletrodos modificados com CoHCF (A) e CuHCF (B) em solução contendo: (a) tampão fosfato (pH = 7,2) e peróxido de hidrogênio: (b) 0,5 mmol L ⁻¹ , (c) 1,0 mmol L ⁻¹ , (d) 1,5 mmol L ⁻¹ , (e) 2,0 mmol L ⁻¹ e (f) 2,5 mmol L ⁻¹ . $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$	41
Figura 19. Curva de calibração para H ₂ O ₂ obtida a partir dos dados voltamétricos utilizando o eletrodo modificado com CoHCF (a) e CuHCF (b).	42

Figura 20. Formação do filme de CoHCF em eletrodo de carbono vítreo a partir da solução recém preparada de KCl 0,1 mol L ⁻¹ , K ₃ Fe(CN) ₆ 0,6 mmol L ⁻¹ e CoCl ₂ 0,6 mmol L ⁻¹ (A). Verificação da estabilidade do filme gerado em eletrólito suporte (KCl 0,1 mol L ⁻¹) (B). $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$. 15 ciclos.	43
Figura 21. Voltamogramas cíclicos obtidos utilizando eletrodo de carbono vítreo modificado com CoHCF em solução contendo: (a) KCl 0,1 mol L ⁻¹ e (b) H ₂ O ₂ 1 mmol L ⁻¹ . $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$	44
Figura 22. Voltamogramas cíclicos obtidos após a eletrodeposição de filme de CoHCF em eletrodo de carbono vítreo. Condições apresentadas na Tabela 3.	47
Figura 23. Formação do filme de AP em eletrodo de carbono vítreo a partir da solução recém preparada de HCl 0,02 mol L ⁻¹ , KCl 0,1 mol L ⁻¹ , K ₃ Fe(CN) ₆ 0,6 mmol L ⁻¹ e FeCl ₃ 0,6 mmol L ⁻¹ (A). Verificação da estabilidade do filme gerado em eletrólito suporte (KCl 0,1 mol L ⁻¹ contendo HCl 0,02 mol L ⁻¹) (B). $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$. 15 ciclos. ...	49
Figura 24. Voltamogramas cíclicos obtidos utilizando eletrodo de carbono vítreo modificado com AP em solução contendo: (a) KCl 0,1 mol L ⁻¹ + HCl 0,02 mol L ⁻¹ e H ₂ O ₂ (b) 1,0 mmol L ⁻¹ , (c) 2,0 mmol L ⁻¹ , (d) 3,0 mmol L ⁻¹ , (e) 4,0 mmol L ⁻¹ e (f) 5,0 mmol L ⁻¹ . $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$. Curva analítica: E = -0,1 V (redução do H ₂ O ₂) (a) e E = 0,95 V (oxidação do H ₂ O ₂) (b).	50
Figura 25. Verificação da estabilidade do eletrodo modificado com AP preparado na ausência (A) e na presença (B) de CTAB. 1º (a) e 60º ciclos de potencial (b) em solução de KCl 0,1 mol L ⁻¹ + HCl 0,02 mol L ⁻¹ (pH = 1,7). $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$	51
Figura 26. Corrente de pico medida em 0,17 V em função dos ciclos de potencial na ausência (a) e na presença de CTAB 1 mmol L ⁻¹ (b) na formação do filme de AP.	52

Figura 27. Formação do filme de AP em eletrodo de carbono vítreo (A). Verificação da estabilidade do filme gerado em eletrólito suporte referente a cada situação (B). Condições experimentais encontradas na Tabela 4. $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$. 15 ciclos.....	56
Figura 28. Voltamogramas cíclicos obtidos utilizando eletrodo modificado com AP em solução contendo: (a) tampão fosfato pH = 7,2 e H_2O_2 (b) 1 mmol L^{-1} , (c) $2,0 \text{ mmol L}^{-1}$ e (d) $3,0 \text{ mmol L}^{-1}$. $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$	58
Figura 29. Voltamogramas cíclicos obtidos utilizando eletrodo modificado com AP em solução contendo: (a) fosfato pH = 5,5 (A) ou pH = 6,4 (B) e H_2O_2 (b) 1 mmol L^{-1} , (c) $2,0 \text{ mmol L}^{-1}$, (d) $3,0 \text{ mmol L}^{-1}$ e (e) $4,0 \text{ mmol L}^{-1}$. $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$	59
Figura 30. Curva amperométrica em solução tampão fosfato pH = 6,9 com adições sucessivas de lactato $0,14 \text{ mmol L}^{-1}$, utilizando o biossensor. $E_{\text{aplicado}} = -0,1 \text{ V}$. Curva amperométrica obtida sob agitação magnética. Quantidade de enzima = 1 U.....	61
Figura 31. Estudo da quantidade de enzima imobilizada na superfície do eletrodo modificado: (a) 1, (b) 2 e (c) 2,5 U. $E_{\text{aplicado}} = -0,1 \text{ V}$. Curvas amperométricas obtidas sob agitação magnética.....	62
Figura 32. Efeito do pH do eletrólito suporte. $E_{\text{aplicado}} = -0,1 \text{ V}$. Vazão = $0,85 \text{ mL min}^{-1}$. Alça de amostragem = $50 \mu\text{L}$. Quantidade de enzima = 1 U.	64
Figura 33. Estudo da vazão de uma solução de lactato $0,28 \text{ mmol L}^{-1}$. $E_{\text{aplicado}} = -0,1 \text{ V}$. Alça de amostragem = $50 \mu\text{L}$. Quantidade de enzima = 1 U.	65
Figura 34. Estudo do volume da amostra de uma solução de lactato $0,28 \text{ mmol L}^{-1}$. $E_{\text{aplicado}} = -0,1 \text{ V}$. Vazão = $0,85 \text{ mL min}^{-1}$. Quantidade de enzima = 1 U.	66
Figura 35. Repetibilidade para a determinação de lactato $0,28 \text{ mmol L}^{-1}$. $E_{\text{aplicado}} = -0,1 \text{ V}$. Vazão = $0,85 \text{ mL min}^{-1}$. Alça de amostragem = $50 \mu\text{L}$. Quantidade de enzima = 1 U.	67

Figura 36. Dependência da corrente em função do tempo para o eletrodo mantido em solução tampão à temperatura ambiente (a) e em baixa temperatura (b).	68
Figura 37. Esquema de um biossensor a base de AP para lactato.	69
Figura 38. Fiagrama obtido com injeções de soluções de lactato: (a) $4,4 \mu\text{mol L}^{-1}$, (b) $8,8 \mu\text{mol L}^{-1}$, (c) $17,5 \mu\text{mol L}^{-1}$, (d) $35 \mu\text{mol L}^{-1}$, (e) $70 \mu\text{mol L}^{-1}$, (f) $140 \mu\text{mol L}^{-1}$, (g) $280 \mu\text{mol L}^{-1}$ e amostras de cerveja (s1, s2 e s3). $E_{\text{aplicado}} = -0,1 \text{ V}$. Vazão = $0,85 \text{ mL min}^{-1}$. pH = 6,9. Quantidade de enzima = 1 U.	70
Figura 39. Fiagrama obtido com injeções de soluções de lactato: (a) $35 \mu\text{mol L}^{-1}$, (b) $70 \mu\text{mol L}^{-1}$, (c) $140 \mu\text{mol L}^{-1}$, (d) $280 \mu\text{mol L}^{-1}$ e amostras de sangue fortificadas com solução de lactato (e) $0 \mu\text{mol L}^{-1}$, (f) $70 \mu\text{mol L}^{-1}$, (g) $140 \mu\text{mol L}^{-1}$ e (h) $280 \mu\text{mol L}^{-1}$. $E_{\text{aplicado}} = -0,1 \text{ V}$. Vazão = $0,85 \text{ mL min}^{-1}$. pH = 6,9. Quantidade de enzima = 1 U.	73
Figura 40. Valores de corrente em função da concentração de lactato (curva analítica) (A) e da concentração de lactato adicionado (método da adição de padrão) (B).	74
Figura 41. Variação da concentração de lactato em função da hora do dia. Resultados obtidos pelo método proposto (●) e com o analisador portátil (■).	75
Figura 42. Variação da concentração de lactato em função da atividade física. Fiagrama obtido com injeções de soluções de lactato: (a) $14 \mu\text{mol L}^{-1}$, (b) $28 \mu\text{mol L}^{-1}$ e amostras de sangue antes (s1, s3) e depois (s2, s4) do esforço físico. $E = -0,1 \text{ V}$. Vazão = $0,85 \text{ mL min}^{-1}$. pH = 6,9. Quantidade de enzima = 1 U.	77

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Alguns biossensores para determinação de lactato utilizando lactato oxidase.	20
Tabela 2. Valores de potenciais de meia-onda para a oxidação do H_2O_2 em diversos eletrodos em diferentes pHs.	36
Tabela 3. Condições experimentais para a deposição eletroquímica do filme de CoHCF.	46
Tabela 4. Condições experimentais para a deposição eletroquímica do filme de AP....	54
Tabela 5. Resultados obtidos para a determinação de lactato em cervejas para o método proposto e para o método espectrofotométrico.....	71
Tabela 6. Comparação método FIA versus método de referência para determinação de lactato em cervejas.....	72
Tabela 7. Comparação método FIA versus o analisador portátil para determinação de lactato em sangue.	76

RESUMO

Neste trabalho são apresentados resultados relacionados a estudos sobre o comportamento eletroquímico do lactato e do peróxido de hidrogênio em diversos eletrodos em meio de diferentes pHs utilizando voltametria cíclica. Também foi investigado o comportamento eletroquímico do peróxido de hidrogênio em eletrodos modificados com filmes de hexacianoferratos utilizando eletrodos de platina e carbono vítreo. A vantagem do uso do CTAB na modificação da superfície de carbono vítreo com Azul da Prússia foi confirmada no que se refere à melhora da sensibilidade e da estabilidade das medidas.

Numa etapa posterior desenvolveu-se um biossensor para a determinação de lactato pelo monitoramento de peróxido de hidrogênio produzido na reação catalisada de lactato com oxigênio na presença da enzima lactato oxidase. Nessa etapa, o trabalho consistiu em imobilizar a enzima lactato oxidase na superfície do eletrodo, previamente, modificado com Azul da Prússia, com o auxílio de Nafion[®].

Após a construção do biossensor e a otimização das condições de análise (pH, quantidade de enzima, volume da amostra e vazão) para obtenção de maior sinal analítico no desenvolvimento do método para a determinação de lactato por análise em fluxo, averiguou-se a repetibilidade das medidas ($C_{\text{lactato}} = 0,28 \text{ mmol L}^{-1}$) obtendo-se um desvio padrão de 2,2% para 18 repetições. A frequência analítica foi estimada em 160 injeções por hora com limite de detecção de $0,84 \mu\text{mol L}^{-1}$ e linearidade até $0,28 \text{ mmol L}^{-1}$ de lactato.

O biossensor foi aplicado na quantificação de lactato em amostras alimentares (cervejas alcoólicas e não alcoólicas) e biológicas (sangue liofilizado e recém coletado). Por fim, realizaram-se estudos envolvendo a variação da concentração de lactato

sanguíneo em função da intensidade de atividade esportiva. Os resultados obtidos pelo método proposto foram comparados com aqueles oriundos do uso de método de referência.

ABSTRACT

Results on the investigation of the electrochemical behavior of lactate and hydrogen peroxide at various electrodic surfaces at different pHs using cyclic voltammetry are presented. Experiments were also carried out with platinum and glassy carbon electrodes modified with hexacyanoferrate films. The advantage of using CTAB in the electrodeposition step of Prussian Blue films onto glassy carbon surfaces was confirmed taking into account both the stability and sensitivity of measurements.

The immobilization of lactate oxidase onto glassy carbon electrodes modified with a Prussian Blue layer using Nafion[®] was performed to fabricate a biosensor for lactate.

The biosensor was used in the development of a FIA amperometric method for the determination of lactate. Under optimal operating conditions (pH = 6.9, E = -0.1 V), the linear response of the method was extended up to 0.28 mmol L⁻¹ lactate with a limit of detection of 0.84 μmol L⁻¹. The repeatability of the method for injections of a 0.28 mmol L⁻¹ lactate solution was 2.2 % (n = 18). The analytical frequency was calculated as 160 injections h⁻¹.

The usefulness of the method was demonstrated by determining lactate in beer (alcoholic and nonalcoholic beers) and blood samples (lyophilized and freshly collected). Finally, the influence of physical exercise on the blood lactate level was studied. Results obtained by using the proposed amperometric detector compared well with the reference method.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Lactato – importância

O lactato é conhecido como um dos mais importantes metabólitos em análise clínica. Sua determinação é importante no controle de diabetes, na análise alimentar e na medicina esportiva (metabolismo do corpo e indicador de treinamento).

Na indústria alimentícia, a determinação de lactato é relevante no controle de aditivos e na fermentação de alguns produtos como vinho, cidra, cerveja e leite no que diz respeito ao sabor, à estabilidade e à qualidade. Nesse sentido, alguns trabalhos envolvendo a determinação de lactato em produtos alimentícios são reportados na literatura [1-13].

Na área clínica, o lactato é um indicador de choques, insuficiência respiratória, doenças cardíacas e desordem metabólica. Níveis de lactato são também importantes na Medicina Esportiva, particularmente para detectar problemas nos tecidos, trombose e as condições físicas de animais e atletas.

Alguns trabalhos são encontrados na literatura [7, 14-19] no que se refere à determinação de lactato em análises clínicas incluindo os com enfoque na Medicina Esportiva [7, 20-23].

O lactato é um composto orgânico produzido naturalmente no corpo humano e também utilizado como fonte de energia para atividades físicas em geral. O lactato é encontrado nos músculos, no sangue e em vários órgãos. A presença de lactato é necessária para que o corpo funcione adequadamente. O nível de lactato está relacionado ao “status” do metabolismo anaeróbico durante a contração do músculo, mas situações patológicas severas podem também causar aumento na produção dessa

substância. O lactato é produzido nos tecidos quando o oxigênio não está disponível e a principal fonte é a quebra de carboidratos (glicogênio). O nível de lactato pode ser usado para indicar a quantidade de oxigênio disponível nos pacientes.

O lactato está presente no corpo humano, em pessoas saudáveis, quando em repouso, e também durante as atividades diárias, em níveis baixos (1 a 3 mmol L⁻¹). Porém, condições de extrema atividade física e “stress” metabólico podem causar um aumento na concentração de lactato até 30 mmol L⁻¹, resultando em situações metabólicas críticas [18, 24-26], podendo ser monitorado em amostras de saliva e sangue.

Por este motivo, novas tecnologias para a dosagem do lactato vêm sendo estudadas em conjunto com testes laboratoriais realizados fora do ambiente clínico convencional, testes estes chamados de “*point-of-care testing*” [27]. Viabiliza-se, desta maneira, a dosagem da concentração sanguínea do lactato em campo, de forma precisa e com uma pequena gota de sangue obtida da ponta de um dos dedos do atleta. Como o resultado é obtido em poucos minutos, a realização do teste, a interpretação dos resultados e a tomada de decisões são facilitadas, ampliando o uso do indicador na Medicina Esportiva.

1.2. Lactato – determinação

Diversas técnicas são reportadas na literatura para a determinação de lactato, incluindo o método clássico baseado na oxidação química do lactato e detecção do acetaldeído por espectrofotometria ou cromatografia gasosa [28, 29]. Outros métodos envolvendo reações enzimáticas com detecção bioluminescente [30], espectrofotométrica [31, 32], fluorimétrica [20, 33-36], eletroquímica [13] ou

combinados com métodos de separação como eletroforese capilar [37, 38] ou com análise por injeção em fluxo [32, 33, 39-42] também são encontrados. Métodos não enzimáticos também merecem destaque e são descritos em alguns trabalhos [43, 44].

Métodos eletroanalíticos para a quantificação de lactato são largamente difundidos e em levantamento realizado com base em artigos encontrados no banco de dados do ISI Web of KnowledgeSM [45] utilizando a palavra chave “*lactate*” observou-se que estes correspondem a mais de 50% dos trabalhos publicados de um total de aproximadamente 15.800 artigos. (*Figura 1*).

Figura 1. Comparação de métodos eletroanalíticos perante outros métodos utilizados para quantificação de lactato.

Em muitos destes trabalhos utilizam-se biossensores (dispositivos nos quais o material de origem biológica é imobilizado junto a um transdutor adequado [46]) e eletrodos seletivos [47-50]. Nesses métodos, normalmente os eletrodos são modificados por enzimas. As enzimas são biomoléculas extremamente importantes devido ao seu poder catalítico e sua seletividade, superior a qualquer catalisador sintético. Algumas

enzimas ou sistemas de enzimas são usados para a construção de biossensores para lactato:

- flavocitocromo b_2 (FC b_2): catalisa a conversão do lactato em piruvato [51, 52]; desvantagem do seu uso: a enzima é cara;
- lactato monooxigenase (LMO): catalisa a reação de lactato com oxigênio formando acetato, CO_2 e H_2O [53, 54]; o progresso da reação é controlado pelo consumo de oxigênio; desvantagem do seu uso: a reatividade do sensor de LMO é inibida por algumas substâncias (fosfato, maleato, oxalato, piruvato);
- lactato oxidase (LOD ou LOX): catalisa a reação de lactato com oxigênio formando piruvato e peróxido de hidrogênio [7, 50, 55-61]; monitoramento do peróxido de hidrogênio; a enzima é específica, não sofre interferências químicas e nem de mudanças de pH; desvantagem do seu uso: variação da concentração de oxigênio;
- lactato desidrogenase (LDH): catalisa a reação de lactato com NAD^+ produzindo piruvato e NADH [48, 62, 63]; monitoramento de NADH; altamente seletiva; maior problema: dificuldade de regenerar a forma oxidada da co-enzima (NAD^+) e oxidação direta do NADH requer potenciais muito positivos (1,1 e 1,3 V(vs. ECS) em eletrodos de carbono vítreo e platina, respectivamente); possíveis interferentes: ácido ascórbico e ácido pirúvico;
- LOD / LDH: sistema enzimático “amplificador” (o produto da primeira reação enzimática é o substrato da segunda); monitoramento do consumo de oxigênio; desvantagem: requer um tempo longo para o ensaio [64];
- citocromo b_2 / LDH: com esse sensor é possível determinar lactato e piruvato; na ausência de NADH o sensor só responde a lactato[65]; possível interferente: piruvato;

- LOD / “*horseradish peroxidase*” (HRP): detecção de peróxido de hidrogênio [41, 66]; possível interferente: ácido ascórbico;
- “*glutamic pyruvic transaminase*” (GPT) / LDH: resposta do eletrodo baseada na oxidação eletrocatalítica, em potenciais menos positivos, do NADH produzido enzimaticamente [40, 47];

Uma desvantagem de alguns desses trabalhos relaciona-se à operação em potenciais muito positivos [59] e uma maneira de contornar este problema baseia-se na utilização de compostos mediadores de transferência de elétrons na preparação dos eletrodos [67-72]. Um outro inconveniente é a interferência de espécies eletroativas encontradas nas amostras reais (ácido ascórbico e ácido úrico). Uma alternativa para esse problema é o uso de membranas apropriadas (polímeros) que podem restringir o acesso de possíveis espécies químicas interferentes com base no (a) tamanho ou (b) na carga elétrica, além da minimização de problemas de envenenamento da superfície dos eletrodos [7, 13, 61, 73-77].

O acetato de celulose, na maioria das vezes, é o caso típico de membrana empregada quando se pretende excluir substâncias químicas devido a suas dimensões, uma vez que a porosidade do filme pode ser controlada adequadamente alterando-se o pH da solução e o tempo de hidrólise. Desta forma, somente espécies relativamente pequenas têm acesso à superfície do eletrodo (ou aos sítios catalíticos).

O controle da passagem de espécies carregadas pode ser feito imobilizando-se na superfície do eletrodo polímeros que possuem sítios aniônicos ou catiônicos dispostos de maneira estruturada no filme. O polímero mais usado nestes casos é o Nafion[®], que devido aos grupos sulfonatos restringe severamente a passagem de ânions, mas é permeável a cátions e espécies eletricamente neutras. Na *Figura 2* apresenta-se de

maneira esquemática o recobrimento de uma superfície eletródica com vistas ao bloqueio à passagem de espécies químicas.

Figura 2. Diagrama esquemático da detecção de L-lactato em microeletrodo de platina. A presença de diferentes camadas permite a detecção seletiva de L-lactato. (adaptado do artigo J. J. Burmeister, M. Plamer and G. A. Gerhardt, *Biosens. Bioelectron.*, **2005**, 20, 1772-1779.)

Neste contexto, um grande número de eletrodos e equipamentos comerciais é encontrado no mercado para a determinação de lactato, desde um simples analisador portátil até aparelhos mais sofisticados, que medem não somente lactato, mas também outros parâmetros (pH, gases, sais, glicose). Apesar disso, há ainda espaço para o aperfeiçoamento da seletividade e a estabilidade a longo prazo destes dispositivos, justificando pesquisas com intuito de desenvolver sensores para análise de lactato.

1.3. Sensores

Um sensor químico é definido como um dispositivo que transforma informações químicas ou bioquímicas em um sinal analítico [78]. A informação codificada no sensor inclui aspectos qualitativos e quantitativos, ambos originados pela reação química do analito. Desta forma, os resultados obtidos podem ser analisados e correlacionados com outros parâmetros no ambiente em que estão inseridos. Estes dispositivos possuem características peculiares que os distinguem de métodos instrumentais de largo porte, os quais, por sua vez, são cada vez mais precisos, sensíveis e seletivos, mas não permitem a obtenção de informações “*in-situ*” e em tempo real. Dados nestas condições experimentais são facilmente obtidos com sensores e, mesmo que as medidas não tenham precisão e exatidão comparáveis às dos métodos instrumentais, em muitas ocasiões têm-se elementos suficientes para tomadas de decisão. Características vantajosas também inerentes ao uso de sensores químicos referem-se à portabilidade, facilidade de automação, possibilidade de miniaturização e baixo custo.

A *Figura 3* apresenta um esquema geral dos principais componentes de um sensor. Este contém três elementos: um elemento sensorial (reconhecedor), um transdutor e um processador. A função do transdutor é de transformar o sinal obtido pelo elemento sensorial em um sinal elétrico [78]. Dentre os sensores químicos, há várias classificações possíveis às quais podem basear-se no tamanho, tipo de aplicação ou mecanismo de transdução da resposta. Exemplos são transdutores eletroquímicos, ópticos, pizoelétricos, térmicos, entre outros.

Figura 3. Esquema geral dos principais componentes de um sensor.

Alguns critérios importantes que devem ser considerados na escolha de um sensor estão resumidos na *Figura 4*.

Figura 4. Alguns aspectos importantes a serem considerados na escolha de um sensor.

No que concerne às técnicas eletroquímicas, verifica-se a existência de milhares de trabalhos sobre o assunto em que são abordados tópicos sobre novos materiais, aplicações em amostras ambientais, biológicas e de interesse industrial, novos métodos

de fabricação, estratégias para melhoria na seletividade e nos limites de detecção, etc [79, 80].

1.4. Biossensores

Um biossensor pode ser definido como um sensor que combina a alta seletividade de um elemento biológico sensível ao analito de interesse com um transdutor que converte o sinal biológico em sinal elétrico proporcional à concentração do analito [46, 81-84] (*Figura 5*). Os biossensores podem ser classificados de acordo com o mecanismo de resposta e do tipo de material biológico imobilizado. A construção de um biossensor baseia-se na comunicação de duas partes: o componente biológico ativo e um transdutor.

Figura 5. Representação esquemática de biossensores. (adaptado do artigo K. R. Rogers, *Anal. Chim. Acta*, **2006**, 568, 222-231.)

Existem múltiplos elementos de reconhecimento e sistemas de transdução [85]. Teoricamente, estes componentes admitem diversas combinações. Na prática, a eleição do material biológico depende das características do composto a analisar. A eleição do transdutor está condicionada pelo tipo de elemento de reconhecimento utilizado, já que

este determina quais serão as variações das propriedades físico-químicas que ocorrerão como consequência da interação.

Muitos desses sensores são baseados em enzimas e um grande número de diferentes procedimentos está disponível para a imobilização das mesmas [86-88]. Apesar de suas limitações em termos da susceptibilidade ao pH, força iônica, inibidores e baixa estabilidade, as enzimas são amplamente usadas na construção de biossensores eletroquímicos.

O primeiro biossensor fabricado consistia em um dispositivo para análise de glicose desenvolvido por Clark and Lyons (1962) [89], no qual a enzima glicose oxidase foi acoplada a um eletrodo para a determinação de oxigênio. Como consequência da reação entre a enzima e a glicose, ocorre uma diminuição da concentração de oxigênio dissolvido na membrana, o qual é detectado pelo eletrodo e esta queda é proporcional à concentração de glicose na amostra. Desde então, foram desenvolvidos eletrodos enzimáticos para a detecção e quantificação de diferentes tipos de substâncias de interesse clínico.

O acoplamento eletrônico entre as enzimas e o eletrodo nos biossensores pode ser efetuado por meio de diferentes mecanismos [90]:

(i) pela eletroatividade do substrato ou produto enzimático (biossensores de primeira geração – *Figura 6*); desvantagem: problemas de interferências devido à necessidade de potenciais muito positivos (superiores a 0,6 V);

Figura 6. Esquema representativo para um biossensor de primeira geração.

(ii) pelo auxílio de mediadores, livres em solução ou imobilizados juntamente com a enzima (biossensores de segunda geração – *Figura 7*); o emprego de mediadores de elétrons tem como função o transporte de elétrons entre a enzima e o eletrodo; desvantagem: dificuldade de imobilização dos mediadores de elétrons; podem apresentar problemas de interferências, uma vez que este arranjo pode facilitar também a transferência de elétrons proveniente de reações redox paralelas à reação entre a enzima e o substrato.

Figura 7. Esquema representativo para um biossensor de segunda geração.

(iii) pela transferência eletrônica direta entre a superfície do eletrodo e o centro ativo da enzima (biossensores de terceira geração – *Figura 8*); a transferência de elétrons eficiente é conseguida por meio de uma diminuição ou remoção da camada protetora de proteínas ao redor do sítio ativo da enzima.

Figura 8. Esquema representativo para um biossensor de terceira geração.

Para que um dispositivo possa ser considerado um biossensor, o elemento biológico, responsável pelo reconhecimento molecular, deve estar em contato direto com o transdutor, ou seja, imobilizado de alguma maneira sobre a sua superfície. O método de imobilização deve ser compatível com a biomolécula que está sendo imobilizada, a superfície do sensor ou matriz na qual está sendo imobilizada e com o meio onde o sensor vai ser utilizado.

1.5. Métodos de imobilização de enzimas na superfície do eletrodo

Vários métodos são utilizados na imobilização da enzima no material suporte para a construção de um biossensor. Entre eles, os mais utilizados são aqueles envolvendo adsorção, ligação covalente, ligação covalente cruzada com um reagente multifuncional e a oclusão em géis ou membranas (*Figura 9*) [81, 83, 91-96].

O método de adsorção (*Figura 9a*) para a imobilização de enzimas (um método físico) sobre materiais inorgânicos apresenta a grande vantagem da simplicidade de execução; no entanto, este processo tem algumas desvantagens, tais como: (a) a lixiviação da enzima durante o processo de medida, uma vez que a enzima se fixa ao substrato, geralmente por ligações fracas (eletrostáticas, hidrofóbicas ou dispersivas) passíveis de serem rompidas durante o uso do biossensor pela interação com o solvente e/ou a variação de pH e temperatura; (b) desnaturação e baixa estabilidade da enzima e (c) o “envenenamento” rápido do eletrodo, devido ao fato da enzima se encontrar bastante exposta ao meio a ser analisado [83, 91-96].

O método da ligação covalente (*Figura 9b*) consiste na formação de rede de ligações entre os grupos funcionais da enzima e os grupos reativos específicos presentes no suporte, sendo, portanto, necessário um conhecimento prévio da estrutura química da

enzima e da natureza do suporte. As principais vantagens deste método são (a) a minimização da lixiviação e (b) uma maior estabilidade do complexo enzima/suporte em relação aos efeitos da variação do pH, da força iônica e do solvente. Entretanto, o método pode apresentar desativação parcial ou total da enzima e esta ocorre durante a imobilização devido à formação de ligações químicas adicionais [83, 91-96].

O terceiro processo é o mais amplamente utilizado e baseia-se na formação de ligações cruzadas (*Figura 9c*) entre os grupos amino do suporte com os grupos amino da enzima, ou na formação de ligações cruzadas intermoleculares com a formação de partículas insolúveis macroscópicas, pela utilização de reagentes bi- ou multifuncionais (glutaraldeído, isocianatos, carbodiimida, entre outros) [91]. As principais vantagens deste método são a simplicidade de execução e a forte interação da enzima com o suporte, diminuindo drasticamente a lixiviação e proporcionando ao eletrodo uma maior estabilidade. Entretanto, o procedimento também apresenta algumas desvantagens pois causa danos à enzima, limita a difusão do substrato, dificulta o controle da reação, exige o uso de grandes quantidades de enzima, levando assim a uma baixa reprodutibilidade no desempenho do eletrodo [96].

O procedimento de imobilização por oclusão em géis (*Figura 9d*) ou membranas orgânicas corresponde ao confinamento do material biológico em uma matriz polimérica ou em uma membrana semipermeável, sendo o sistema revestido por uma membrana polimérica permeável, para reduzir a lixiviação do material biológico. Este tipo de imobilização apresenta a grande vantagem de se poder utilizar qualquer tipo de enzima. No entanto, exibe a desvantagem de lixiviação do material enzimático devido aos diferentes tamanhos de poros nos polímeros, como também problemas de tempo de resposta, pela dificuldade de difusão das espécies envolvidas através das membranas [96].

A microencapsulação (*Figura 9e*) é muito similar ao processo de inclusão, embora neste caso a enzima seja totalmente envolvida pelo sistema. Neste sistema cria-se uma célula artificial delimitada por uma membrana porosa. Moléculas grandes, tais como enzimas, não são capazes de difundir através desta membrana, diferentemente do que ocorre com pequenas moléculas como substratos e produtos [94].

Figura 9. Esquemas das enzimas imobilizadas por (a) adsorção, (b) ligação covalente, (c) ligação cruzada, (d) oclusão e (e) microencapsulação.

1.6. Modificação na superfície do eletrodo

Eletrodos modificados contendo filmes químicos são utilizados em diferentes áreas da química e da ciência de materiais em aplicações eletroanalíticas e

eletrocatalíticas. Eletrodos quimicamente modificados têm atraído um interesse considerável ao longo das últimas três décadas e um dos esforços está relacionado à melhoria da sensibilidade e seletividade nas determinações analíticas.

Os primeiros trabalhos envolvendo a preparação de eletrodos com superfícies modificadas surgiram no início da década de 70. Até então só eram utilizados eletrodos de materiais dito “inertes” tais como carbono, ouro, platina e mercúrio [97].

A escolha do material do eletrodo a ser modificado é muito importante na preparação do eletrodo quimicamente modificado. Este substrato deve apresentar características eletroquímicas apropriadas e também ser adequado para o método de imobilização selecionado. Entre os materiais convencionais estão ouro, platina, carbono vítreo, mercúrio na forma de filme e pasta de carbono. Carbono vítreo reticulado, fibras de carbono, material plástico condutor e vidros condutores, estão incluídos entre os substratos menos usados [97].

O processo de modificação de um eletrodo deve resultar em uma superfície estável e que desempenhe o papel requerido de maneira adequada. Há várias possibilidades para a fixação de espécies químicas de interesse na superfície de eletrodos, mas todas baseiam-se em procedimentos relacionados à adsorção direta no eletrodo, ligação covalente do modificador a algum grupo funcional existente na superfície, imobilização física à base de polímeros ou com alguma matriz condutora à qual o modificador é convenientemente incorporado.

Vários modificadores orgânicos e inorgânicos são usualmente imobilizados em superfícies eletródicas condutoras para preparar eletrodos com propriedades eletrocatalíticas e que possam permitir a imobilização de espécies mediadoras e moléculas biológicas [98, 99].

1.7. Hexacianoferratos

Entre os vários reagentes usados para a modificação de eletrodos, os hexacianoferratos (HCFs) vêm despertando atenção dos eletroquímicos por sua excelente propriedade de transferência de elétrons [100-107]. Desde o trabalho de Neff [108], no qual é reportada a deposição do filme de Azul da Prússia (AP ou do inglês “*Prussian Blue*” - PB) na superfície de um eletrodo de platina, muitos trabalhos envolvendo a deposição do AP e dos seus análogos em superfícies condutoras são encontrados na literatura [101, 107, 109-113], alguns dos quais consistindo em excelentes e abrangentes revisões sobre o tema [101, 102, 105-107].

De uma maneira geral [100, 101, 106, 109], pode-se apresentar a fórmula de um filme de hexacianoferrato como: $A_xM_y[Fe(CN)_6]_z \cdot mH_2O$ (x, y, z, m = números estequiométricos, A = cátion de metal alcalino e M = íon do metal de transição), representando uma classe importante dos compostos de valência mista, no qual o Azul da Prússia ou o hexacianoferrato de ferro (III) (onde o $A = K$ e $M = Fe$ na fórmula genérica anterior) é o protótipo clássico.

O AP apresenta três estados de oxidação, os quais se diferenciam pela sua cor. Assim, o estado de oxidação mais baixo é conhecido como Branco da Prússia (BP), enquanto que o estado de oxidação intermediário é o próprio Azul da Prússia (AP) e o de máxima oxidação é conhecido como Verde de Berlin.

O filme de Azul da Prússia pode ser obtido sobre a superfície de diferentes eletrodos por meio de técnicas eletroquímicas. O filme de AP é insolúvel em meio aquoso e apresenta boa estabilidade química. Este filme apresenta propriedades eletroquímicas como eletrocromismo e atividade eletrocatalítica, ambos fortemente

dependentes das condições de deposição. Algumas dessas propriedades fazem desse composto um bom candidato à aplicação como biossensores.

Porém, um inconveniente ao se trabalhar com eletrodos modificados com Azul da Prússia quando aplicados para finalidades eletroanalíticas é a baixa estabilidade do filme nos potenciais onde o Branco da Prússia é gerado catodicamente [114]. Tais potenciais negativos são requeridos para o monitoramento seletivo do peróxido de hidrogênio nas amostras que contêm espécies reduzidas. Um aspecto importante a ser levado em conta, quando se monitora o analito durante um longo período, é a influência do aumento do pH nas vizinhanças do filme quando o peróxido é reduzido [115]. Por isso, a estabilidade dos eletrodos modificados com filme de AP, durante o monitoramento de H_2O_2 , é aumentada fortemente se as medidas forem executadas em soluções tampão. A incorporação de íons Ru(III) em filmes de hexacianoferratos foi sugerida para minimizar o processo de solubilização [116, 117]. A formação de uma ligação Ru-O-Fe contribui para a imobilização de um material insolúvel na superfície eletródica com conseqüente aumento de estabilidade química e eletroquímica. Também é reportado na literatura que a incorporação de ródio contribui para uma maior estabilidade do filme de Azul da Prússia [118]. Outro procedimento reportado na literatura recentemente é baseado na eletrodeposição de filmes de AP em soluções contendo brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB) [119, 120].

Apesar dos aspectos negativos acima reportados, esses filmes estão sendo freqüentemente utilizados na construção de biossensores baseados em enzimas oxidases [50, 121-135]. Estas enzimas catalisam a reação do seu substrato específico, na presença de oxigênio, formando peróxido de hidrogênio como um dos produtos. Para qualquer biossensor que emprega a enzima oxidase como elemento reconhecedor, a detecção do peróxido de hidrogênio é de grande importância, visto que sua concentração é

diretamente proporcional à concentração do analito de interesse. Entretanto, a detecção amperométrica direta de peróxido de hidrogênio em eletrodos convencionais requer valores de potenciais elevados, mais positivos do que 0,6 V vs. Ag/AgCl [136], dependendo das condições experimentais. Nestes valores de potencial, a presença de outras espécies pode interferir na medida de peróxido.

O uso de hexacianoferratos pode minimizar tais interferências visto que esses materiais provaram ser excelentes mediadores para a redução de peróxido de hidrogênio em potenciais menos positivos [101, 137]. Alguns hexacianoferratos de ferro [50, 125, 129, 132, 135], níquel [121, 131, 138], crômio [124, 126], cobalto [123, 128], paládio [127] e cobre [122, 125, 130] estão sendo usados para o desenvolvimento de biossensores e na maioria dos trabalhos reporta-se o uso desses filmes para a construção de biossensores para glicose [107, 121-125, 127-130, 132, 133, 135].

1.8. Biossensores para determinação de lactato utilizando a enzima lactato oxidase

Métodos enzimáticos envolvendo o uso de kits ou biossensores enzimáticos em determinações de lactato estão substituindo os métodos químicos na maioria dos laboratórios analíticos e clínicos. Nas últimas duas décadas muitos sensores de lactato foram produzidos e muitas propostas foram feitas baseadas na imobilização de diversas enzimas e combinações de enzimas nas superfícies dos eletrodos para a construção desses sensores [47-50].

Conforme apresentado anteriormente, os biossensores para lactato podem ser preparados com enzimas que catalisam a conversão de lactato a acetato (LMO) [53, 54] ou a oxidação do lactato a piruvato (LDH ou LOX) [48, 50]. Outras enzimas (flavocitocromo b_2) [51, 52] e combinações de enzimas (LOD / LDH, citocromo b_2 /

LDH, GPT / LDH, LOD / HRP) [62-64] também podem ser utilizadas. Todas as vantagens e desvantagens dessas enzimas foram reportadas anteriormente (seção 1.2).

Objetivando detecções rápidas e baratas, a enzima LOX vem sendo utilizada em diversos laboratórios na preparação de sensor de lactato. Alguns sensores modificados com LOX são apresentados na *Tabela 1*.

Tabela 1. Alguns biossensores para determinação de lactato utilizando lactato oxidase.

<i>Eletrodo</i>	<i>Deteção</i>	<i>Membranas e/ou Mediadores</i>	<i>Limite de detecção</i>	<i>Faixa linear</i>	<i>Frequência analítica</i>	<i>Estabilidade</i>	<i>Matriz</i>	<i>Ref.</i>
C _v	H ₂ O ₂	poli-L-lisina, poli(4-estirenosulfonato)	0,1 µmol L ⁻¹	< 0,3 mmol L ⁻¹	-	60 dias	soro leite azedo	3
Pt	H ₂ O ₂	celulose, policarbonato	-	-	-	21 dias	saliva	14
Pt	H ₂ O ₂	Nafion [®]	1,2 µmol L ⁻¹	3,0-5400 µmol L ⁻¹	-	30 dias	tecido muscular	23
Pt	H ₂ O ₂	celulose, policarbonato	-	0,01-2,0 mmol L ⁻¹	200 h ⁻¹	40 dias	sangue	24
C _v modif.	H ₂ O ₂	Azul da Prússia, Nafion [®]	< 1 µmol L ⁻¹	< 0,8 mmol L ⁻¹	-	14 dias	-	50
Pt-Ir	H ₂ O ₂	acetato de celulose, poliuretano	0,05 mmol L ⁻¹	< 12 mmol L ⁻¹	-	-	sangue	55
Rh-pasta C	H ₂ O ₂	-	15 µmol L ⁻¹	< 0,2 mmol L ⁻¹	60 h ⁻¹	-	-	56
Pt	H ₂ O ₂	polivinilferrocínio	-	0,05-0,60 mmol L ⁻¹	-	15 dias	-	60
Pt	H ₂ O ₂	Nafion [®] , poliuretano	0,078 mmol L ⁻¹	< 20 mmol L ⁻¹	-	-	tecido cerebral	61
C _v modif.	lactato	sol-gel	0,05 mmol L ⁻¹	0,1-9 mmol L ⁻¹	-	7 dias	-	70
Pt	H ₂ O ₂	polipirrol, politiramina	70 nmol L ⁻¹	< 0,3 mmol L ⁻¹	-	21 dias	soro	76
Pt	H ₂ O ₂	-	0,1 mmol L ⁻¹	< 23 mmol L ⁻¹	-	-	sangue	139
C _v modif.	H ₂ O ₂	sol-gel, nanotubos de C	0,3 µmol L ⁻¹	0,2 a 2,0 mmol L ⁻¹	-	28 dias	soro	140

2. OBJETIVOS

Essa tese tem por objetivo descrever o desenvolvimento de um sensor para determinação de lactato e sua aplicação na determinação desse analito em amostras alimentares e biológicas.

Investigar o comportamento eletroquímico do lactato e peróxido de hidrogênio em diversos eletrodos em diferentes pHs por meio da realização de experimentos voltamétricos e amperométricos. Deseja-se, ainda, verificar o comportamento eletroquímico do peróxido de hidrogênio em eletrodos modificados com filmes de hexacianoferratos utilizando eletrodos de platina e carbono vítreo.

Empregar o biossensor desenvolvido para a determinação de lactato por meio do monitoramento de peróxido de hidrogênio produzido na reação catalisada de lactato com oxigênio na presença da enzima lactato oxidase. Nessa etapa, o trabalho consiste em estudos sobre a imobilização da enzima lactato oxidase na superfície do eletrodo modificado com o auxílio de membranas apropriadas. Após isso, estudos envolvendo a estabilidade do biossensor e a influência de interferentes também serão efetuados.

Quantificar o lactato em amostras reais (cerveja e sangue), tanto pelo método proposto quanto pela metodologia de referência.

Por fim, estudar a variação da concentração de lactato sanguíneo em função da intensidade de atividade esportiva.

3. PARTE EXPERIMENTAL

3.1. Reagentes e soluções

Todos os reagentes indicados abaixo têm grau de pureza PA ou melhor, salvo indicação em contrário.

- *Ácido ascórbico*: Preparou-se a solução a partir do $C_6H_8O_6$ (Merck).
- *Ácido clorídrico*: A solução estoque foi preparada diluindo-se a solução de HCl concentrado (37% - Merck) em água desionizada.
- *Ácido úrico*: A solução utilizada no trabalho foi preparada a partir do $C_5H_4N_4O_3$ (Sigma) em meio de etanol.
- *Ácido sulfúrico*: A solução estoque foi preparada diluindo-se a solução do H_2SO_4 concentrado (95-97% - Merck) em água desionizada.
- *Água*: No preparo de todas as soluções utilizadas no desenvolvimento do trabalho experimental foi empregada água desionizada (Nanopure Infinity, Barnstead - $18\text{ M}\Omega\text{ cm}^{-1}$).
- *Brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB)*: A solução estoque foi preparada dissolvendo-se $C_{19}H_{42}NBr$ (Aldrich) em água desionizada.
- *Cloreto de cobalto*: A solução estoque foi preparada com o sal $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ (98% - Aldrich).
- *Cloreto de cobre*: A solução estoque foi preparada com o sal $CuCl_2 \cdot 2H_2O$ (Merck).
- *Cloreto de potássio*: A solução estoque foi preparada com o sal KCl (Merck).
- *Cloreto de sódio*: A solução estoque foi preparada com o sal NaCl (Merck).
- *Cloreto férrico*: A solução estoque foi preparada com o sal $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ (Merck).

- *Etanol*: Utilizou-se a solução de C_2H_5OH concentrada ($0,790-0,793 \text{ kg L}^{-1}$ – Merck).
- *Ferricianeto de potássio*: A solução estoque foi preparada dissolvendo-se o reagente sólido $K_3Fe(CN)_6$ (Merck) em água desionizada.
- *Fosfato de potássio monobásico*: A solução estoque foi preparada dissolvendo-se o reagente sólido KH_2PO_4 (Merck) em água desionizada.
- *Glicose*: Utilizou-se a solução de $C_6H_{12}O_6$ concentrada (5%) no preparo da solução de trabalho.
- *Glutaraldeído*: Preparou-se a solução estoque diluindo-se a solução concentrada de $C_5H_8O_2$ (25% - Sigma).
- *Hidróxido de sódio*: A solução estoque foi preparada dissolvendo-se o reagente sólido NaOH (Dinâmica) em água desionizada.
- *Kit enzimático*: Soluções contendo tampão glicilglicina, ácido L-glutâmico, NAD, GPT (“*glutamic pyruvic transaminase*”) e LDH.
- *Lactato*: Preparou-se a solução estoque diluindo-se a solução concentrada de $NaC_3H_5O_3$ (50% - Merck) em água desionizada.
- *Lactato oxidase (LOX - E.C. 232-841-6)*: Foi utilizada a enzima proveniente de *Pediococcus species* (29, 37 ou 47 U mg^{-1} - Sigma). A enzima foi dissolvida em tampão fosfato pH 7,2. Sua massa molar é em torno de 80 kDa e seu ponto isoelétrico próximo de 4,6 [141-143].
- *Nafion[®]*: A solução estoque foi preparada a partir da solução alcoólica concentrada (5% - Aldrich) em etanol.
- *Paracetamol*: A solução estoque foi preparada dissolvendo-se o reagente sólido $C_8H_9NO_2$ (Synth) em água.

- *Peróxido de hidrogênio:* A solução estoque foi preparada diluindo-se a solução de H_2O_2 concentrado (30% - Merck) em água desionizada.
- *Solução tampão fosfato:* A solução tampão foi preparada a partir das soluções de KH_2PO_4 e NaOH .
- *Outros:* Demais reagentes utilizados no decorrer dos experimentos foram de grau analítico e no preparo de suas soluções tomou-se sempre o cuidado de seguir um procedimento estabelecido na literatura.

3.2. Construção do eletrodo de referência de Ag/AgCl

Um fio de Ag de aproximadamente 1 mm de diâmetro foi utilizado para a construção do eletrodo de Ag/AgCl. Este fio foi polido com lixa d'água 600 (óxido de silício). Em seguida, foi depositado AgCl sobre o fio de prata mantendo um potencial constante (0,3 V) por alguns segundos em uma solução de NaCl saturada utilizando um eletrodo de Ag/AgCl comercial como referência e um eletrodo de platina como auxiliar. A seguir, o fio foi introduzido em ponta plástica de pipeta contendo solução saturada de NaCl e na extremidade inferior da ponteira de plástico foi fixado sob pressão um pedaço de separador de baterias com o objetivo de permitir o contato eletrolítico [144]. Os eletrodos de referência foram checados medindo-se o potencial contra um eletrodo de referência comercial.

3.3. Preparação do eletrodo modificado com metal-hexacianoferrato (MHCF)

3.3.1. Filmes de cobalto-hexacianoferrato e de cobre-hexacianoferrato em eletrodo de platina

A superfície do eletrodo de platina foi polida com alumina ($\phi = 1 \mu\text{m}$) antes da modificação e em seguida, lavada com água desionizada. Os filmes de CoHCF e CuHCF foram eletrodepositados por voltametria cíclica durante 15 ciclos de varredura ($-0,2$ a $1,1 \text{ V}$ a 100 mV s^{-1}) em uma solução recém preparada de KCl $0,5 \text{ mol L}^{-1}$, $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ 1 mmol L^{-1} e respectivamente CoCl_2 1 mmol L^{-1} ou CuCl_2 1 mmol L^{-1} . Após a deposição do filme, o eletrodo foi colocado em solução de KCl $0,5 \text{ mol L}^{-1}$ e a estabilidade do sinal de corrente foi monitorada com 15 voltamogramas cíclicos consecutivos.

3.3.2. Filme de cobalto-hexacianoferrato em eletrodo de carbono vítreo

A superfície do eletrodo de carbono vítreo foi polida com alumina ($\phi = 1 \mu\text{m}$) antes da modificação e em seguida, lavada com água desionizada. O filme de CoHCF foi eletrodepositado por voltametria cíclica ($-0,2$ a $1,1 \text{ V}$) em diferentes condições experimentais empregando-se 15 ciclos de varredura.

3.3.2.1. Solução recém-preparada

- KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ $0,6 \text{ mmol L}^{-1}$ e CoCl_2 $0,6 \text{ mmol L}^{-1}$ ($v = 50 \text{ mV s}^{-1}$);
- KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ $0,6 \text{ mmol L}^{-1}$ e CoCl_2 $0,6 \text{ mmol L}^{-1}$ ($v = 100 \text{ mV s}^{-1}$);
- HCl $0,02 \text{ mol L}^{-1}$, KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ $3,0 \text{ mmol L}^{-1}$ e CoCl_2 $3,0 \text{ mmol L}^{-1}$ ($v = 50 \text{ mV s}^{-1}$);
- HCl $0,02 \text{ mol L}^{-1}$, KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ $0,6 \text{ mmol L}^{-1}$ e CoCl_2 $0,6 \text{ mmol L}^{-1}$ ($v = 50 \text{ mV s}^{-1}$).

3.3.2.2. *Solução deixada em repouso em diferentes tempos antes da execução dos voltamogramas*

- KCl 0,1 mol L⁻¹, K₃Fe(CN)₆ 0,6 mmol L⁻¹ e CoCl₂ 0,6 mmol L⁻¹ em repouso por 5 minutos antes da execução do experimento ($v = 50 \text{ mV s}^{-1}$);
- KCl 0,1 mol L⁻¹, K₃Fe(CN)₆ 0,6 mmol L⁻¹ e CoCl₂ 0,6 mmol L⁻¹ em repouso por 20 minutos antes da execução do experimento ($v = 50 \text{ mV s}^{-1}$)

Após a deposição do filme, o eletrodo foi colocado em solução de eletrólito suporte e a estabilidade do sinal de corrente foi monitorada aplicando-se 15 ciclos de varredura (-0,2 a 1,1 V). O eletrólito suporte foi KCl 0,1 mol L⁻¹ ou KCl 0,1 mol L⁻¹ com HCl 0,02 mol L⁻¹.

3.3.3. *Filme de ferro-hexacianoferrato em eletrodo de carbono vítreo*

A superfície do eletrodo de carbono vítreo foi polida com alumina ($\phi = 1 \text{ }\mu\text{m}$) antes da modificação e em seguida, lavada com água desionizada. O filme de FeHCF (ou Azul da Prússia) foi eletrodepositado por voltametria cíclica (-0,2 a 1,1 V a 50 mV s⁻¹) em diferentes condições experimentais, sempre em soluções recém preparadas.

3.3.3.1. *Em meio ácido*

- HCl 0,02 mol L⁻¹, KCl 0,1 mol L⁻¹, K₃Fe(CN)₆ 0,6 mmol L⁻¹ e FeCl₃ 0,6 mmol L⁻¹.

3.3.3.2. *Em meio ácido contendo CTAB e variando o eletrólito suporte*

- CTAB 1 mmol L⁻¹, HCl 0,02 mol L⁻¹, KCl 0,1 mol L⁻¹, K₃Fe(CN)₆ 0,6 mmol L⁻¹ e FeCl₃ 0,6 mmol L⁻¹;

- CTAB 1 mmol L⁻¹, HCl 0,02 mol L⁻¹, NaCl 0,1 mol L⁻¹, K₃Fe(CN)₆ 0,6 mmol L⁻¹ e FeCl₃ 0,6 mmol L⁻¹.

3.3.3.3. Em meio ácido contendo CTAB e variando a relação da concentração de KCl e NaCl

- CTAB 1 mmol L⁻¹, HCl 0,02 mol L⁻¹, KCl 0,1 mol L⁻¹, NaCl 0,10 mol L⁻¹, K₃Fe(CN)₆ 0,6 mmol L⁻¹ e FeCl₃ 0,6 mmol L⁻¹;

- CTAB 1 mmol L⁻¹, HCl 0,02 mol L⁻¹, KCl 0,1 mol L⁻¹, NaCl 0,35 mol L⁻¹, K₃Fe(CN)₆ 0,6 mmol L⁻¹ e FeCl₃ 0,6 mmol L⁻¹;

- CTAB 1 mmol L⁻¹, HCl 0,02 mol L⁻¹, KCl 0,1 mol L⁻¹, NaCl 1,00 mol L⁻¹, K₃Fe(CN)₆ 0,6 mmol L⁻¹ e FeCl₃ 0,6 mmol L⁻¹;

- CTAB 1 mmol L⁻¹, HCl 0,02 mol L⁻¹, KCl 0,1 mol L⁻¹, NaCl 3,90 mol L⁻¹, K₃Fe(CN)₆ 0,6 mmol L⁻¹ e FeCl₃ 0,6 mmol L⁻¹.

Após a deposição do filme, o eletrodo foi colocado em solução de eletrólito suporte e a estabilidade do sinal de corrente foi monitorada aplicando-se 15 ciclos de varredura de -0,2 a 1,1 V.

3.4. Imobilização da enzima lactato oxidase na superfície do eletrodo

Alguns procedimentos foram realizados na tentativa de imobilizar a enzima:

Procedimento 1: Sobre a superfície do eletrodo modificado com filmes metal-hexacianoferrato adicionou-se lactato oxidase (20 µL de uma solução 2,2 mg mL⁻¹, pH

= 6,9) e glutaraldeído (10 μL de uma solução 2,5 %). Em seguida, deixou-se o eletrodo em câmara de argônio para evaporação dos solventes.

Procedimento 2: Sobre a superfície do eletrodo modificado com filmes metal-hexacianoferrato adicionou-se lactato oxidase (20 μL de uma solução 2,2 mg mL^{-1} , pH = 7,2). Em seguida, deixou-se o eletrodo em câmara de argônio para evaporação do solvente. O eletrodo foi mergulhado em uma solução de Nafion[®] 2%.

Procedimento 3: Sobre a superfície do eletrodo modificado com filmes metal-hexacianoferrato adicionou-se lactato oxidase (diferentes quantidades). Em seguida, deixou-se o eletrodo em câmara de argônio para evaporação do solvente (água) e posterior adição de um determinado volume de Nafion[®] 0,3% (durante os experimentos esse volume foi variado). Evaporou-se o solvente e novamente gotejou-se a mesma quantidade anterior de Nafion[®]. Após essa última adição, deixou-se o eletrodo em câmara de argônio para evaporação do solvente. Por fim, previamente ao experimento, o eletrodo foi imerso durante 30 min. em solução tampão fosfato pH = 6,9 e após o uso armazenado na geladeira.

3.5. Instrumentação

Na aquisição dos voltamogramas foi empregado um (bi) potenciostato Autolab PGSTAT30. Os experimentos foram realizados em célula eletroquímica convencional e sistema de três eletrodos: eletrodos convencionais (eletrodo de trabalho), platina (eletrodo auxiliar) e Ag/AgCl, NaCl saturado (eletrodo de referência).

Para o ajuste do pH das soluções utilizou-se o pHmetro modelo 713 da Metrohm, utilizando tampões apropriados para a calibração.

Nos estudos envolvendo sistemas em fluxo, trabalhou-se com célula do tipo “wall-jet” construída em acrílico com base em modelos já desenvolvidos e em uso no laboratório, os quais permitem o encaixe do eletrodo de trabalho, eletrodo auxiliar e eletrodo de referência (*Figura 10*). Os eletrodos foram imersos na célula após o preenchimento completo da mesma para evitar bolhas.

Figura 10. Esquema do sistema FIA: (A) amostra, (B) bomba peristáltica, (C) solução transportadora, (D) detector e (L) descarte. Esquema da célula utilizada: (a) entrada do fluxo; (b) descarte; (c) eletrodo auxiliar; (d) eletrodo de trabalho e (e) eletrodo de referência.

O bombeamento da solução carregadora foi efetuado com auxílio de bomba peristáltica (Ismatec, Suíça) e o injetor de amostra utilizado em todos os experimentos de análise em fluxo foi construído no CENA – Centro de Energia Nuclear em Agricultura, em Piracicaba (SP). Este é fabricado em acrílico e composto por uma parte central móvel [145].

3.6. Amostras reais

3.6.1. Cerveja

As amostras de cerveja foram adquiridas em supermercado local e mantidas na geladeira. Após a abertura das latas e previamente aos experimentos, retirou-se o CO₂ das amostras por meio de agitação durante 5 minutos. As amostras foram diluídas para 10 mL de tampão fosfato pH = 6,9.

O lactato nas amostras de cerveja foi determinado usando o método amperométrico por injeção em fluxo proposto. Os resultados foram comparados com os obtidos por espectrofotometria utilizando o kit enzimático comercial de acordo com as instruções inclusas no manual (Boehringer Mannheim / R – Biopharm) [145]. Os espectros foram registrados no espectrofotômetro Hitachi modelo U2001 utilizando cubeta de quartzo de 1,00 cm de caminho óptico e foram obtidos utilizando uma solução de tampão de glicilglicina, ácido L-glutâmico, NAD, GPT (“*glutamic pyruvic transaminase*”) e LDH como branco. A determinação espectrofotométrica é baseada na reação enzimática na qual o L-lactato desidrogenase converte o L-lactato em piruvato e NAD⁺ é reduzido a NADH. A enzima GPT, por sua vez, converte o piruvato a L-alanina, e desloca desse modo o equilíbrio do L-lactato para a produção de piruvato e NADH. Este por sua vez, é monitorado em $\lambda = 340 \text{ nm}$ [146].

3.6.2. Sangue

Utilizou-se como amostra de sangue um padrão certificado da Sero As (Aker, Noruega) (sem certificação para lactato).

As outras amostras de sangue (volume total = 25 µL) foram coletadas do dedo de uma única pessoa sendo que:

- 10 µL foram imediatamente diluídos em 0,5 mL de tampão fosfato (pH = 6,9) para o uso no método proposto;
- 15 µL foram utilizados no método comparativo.

Para a análise em repouso, amostras foram retiradas a cada uma hora a partir das 12:00 até 16:00h. Também foram coletadas amostras antes e depois de uma atividade física de 1 minuto.

O lactato foi analisado pelo método proposto e os resultados foram comparados com os obtidos pelo analisador portátil Accutrend Lactate (Roche, Alemanha), que tem como princípio uma reação enzimática e detecção por fotometria de reflectância ($\lambda = 660$ nm). Quando aplicada na zona reativa, a amostra de sangue passa através da malha de rede protetora até uma camada de fibra de vidro, onde os eritrócitos ficam retidos, de modo que apenas o plasma sangüíneo penetre na zona de detecção. O lactato é determinado pela seguinte reação colorimétrica [147, 148]:

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1. Comportamento eletroquímico do lactato em diversos eletrodos e em meio de diferentes valores de pH

Experimentos voltamétricos foram realizados com o intuito de averiguar o comportamento eletroquímico do lactato em diversos eletrodos e em meio de diferentes pHs. Observou-se que o lactato não é eletroativo em pH 1, 7 e 13 nos eletrodos de carbono vítreo, platina e ouro, não sendo possível determinar diretamente lactato nesses materiais eletródicos.

Uma vez que no grupo de trabalho estavam sendo desenvolvidos experimentos com eletrodo de cobre em meio alcalino, foram realizados estudos sobre o comportamento eletroquímico do lactato com este sensor.

O comportamento eletroquímico do eletrodo de cobre em soluções alcalinas (*Figura 11*) é governado por uma série de reações complexas que ocorrem consecutiva e competitivamente. Camadas de Cu_2O , CuO e $\text{Cu}(\text{OH})_2$, entre outras espécies, podem ser formadas na superfície do eletrodo, dependendo do potencial, pH e velocidade de varredura [149, 150].

Figura 11. Voltamograma cíclico do eletrodo de cobre em meio de NaOH 1 mol L⁻¹. $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$.

Na Figura 11 observa-se que em potenciais mais negativos do que -0,4 V a superfície de cobre não sofre oxidação nessas condições. Na região anódica, observa-se um pequeno pico em -0,42 V (I) e outros dois picos em -0,20 V (II) e -0,08 V (III).

Alguns trabalhos na literatura sugerem que esses processos estão relacionados à formação de óxidos de Cu(I) e Cu(II) de acordo com as seguintes equações [149, 150]:

Em potenciais mais positivos observa-se, conforme a *Figura 11* (IV) e *12a*, um processo reversível ($E = 0,55$ V), o qual corresponde à oxidação do Cu(II) a Cu(III).

A *Figura 12b* apresenta um voltamograma obtido em solução de lactato em meio alcalino em eletrodo de cobre. Após a adição de lactato (*Figura 12b*) observa-se um aumento no sinal de corrente anódica e um desaparecimento na corrente catódica. Isso demonstra que as espécies de Cu(III) geradas eletroquimicamente participam do processo de oxidação anódica de lactato [149, 150].

Figura 12. Voltamogramas obtidos em solução de NaOH 1 mol L⁻¹ antes (a) e depois (b) da adição de lactato (concentração final = 40 mmol L⁻¹), utilizando eletrodo de cobre. $v = 50$ mV s⁻¹.

Com base nos estudos voltamétricos realizados observou-se a potencialidade de desenvolver um sensor para lactato. Para tanto, um experimento amperométrico preliminar (*Figura 13*) foi realizado adicionando-se sucessivamente alíquotas de lactato, resultando em uma curva analítica (*Figura 13*) com coeficiente de correlação igual

0,9996, demonstrando assim uma potencialidade deste eletrodo para aplicação de lactato em amostras de interesse.

Figura 13. Curva amperométrica obtida em solução de NaOH 1molL⁻¹ referente a adições sucessivas de alíquotas de lactato (Concentração em solução = 20 mmol L⁻¹), utilizando eletrodo de cobre e sua respectiva curva analítica. $E_{\text{aplicado}} = 0,6$ V. Curva amperométrica obtida sob agitação magnética.

As espécies de Cu(III) são responsáveis pelo processo de oxidação electrocatalítica do lactato sobre o filme de óxido de cobre gerado na superfície do eletrodo, tornando o uso do mesmo viável e atrativo para a determinação desta substância. Apesar disso, uma desvantagem encontrada quando se trabalha com amostras reais é a não seletividade do eletrodo de cobre, já que este possui inúmeras potencialidades para oxidação de substâncias tais como ácido ascórbico, glicose, entre

outras [149, 150]. Desta maneira, fica inviabilizado o uso de eletrodos de cobre como sensor eletroquímico para lactato.

4.2. Comportamento eletroquímico do H_2O_2 em diferentes eletrodos

O objetivo principal do trabalho consiste na construção de eletrodos modificados em que se incorpora uma enzima denominada lactato oxidase. A determinação de lactato é feita por meio da detecção do peróxido de hidrogênio produzido na reação catalisada de lactato com oxigênio. Portanto, o comportamento eletroquímico do H_2O_2 em diferentes eletrodos foi investigado. A *Tabela 2* apresenta os resultados obtidos em diferentes pHs.

Tabela 2. Valores de potenciais de meia-onda para a oxidação do H_2O_2 em diversos eletrodos em diferentes pHs.

<i>Material do eletrodo</i>	<i>pH = 0,8</i>	<i>pH = 7,2</i>	<i>pH = 13,2</i>
Platina	0,95 V	0,45 V	0,00 V
Ouro	1,10 V	0,85 V	0,30 V
Carbônio vítreo	1,45 V	1,15 V	1,00 V

Os valores de potenciais obtidos para a oxidação de H_2O_2 nos três eletrodos em diferentes pHs estão de acordo com a literatura [136, 151, 152].

No caso dos experimentos voltamétricos em meio de tampão fosfato (pH = 7,2) utilizando eletrodo de platina, observou-se também um sinal catódico em 0,04 V (*Figura 14a*). Com a adição de peróxido de hidrogênio, há um aumento nesse sinal e um pequeno deslocamento do pico para potenciais mais negativos.

Figura 14. Voltamogramas de varredura linear obtidos utilizando eletrodo de platina na ausência (a) e na presença de H_2O_2 : 1 mmol L^{-1} (b), 2 mmol L^{-1} (c), 3 mmol L^{-1} (d) em meio de tampão fosfato $\text{pH} = 7,2$. $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$.

Visto isso, pensou-se em utilizar esse eletrodo para fazer medidas diretas de peróxido, mas verificou-se um deslocamento de potencial de pico e uma queda progressiva no sinal registrado quando ciclos consecutivos eram realizados em uma dada solução contendo peróxido (Figura 15), inviabilizando esse procedimento.

Figura 15. Voltamogramas de varredura linear consecutivos obtidos utilizando eletrodo de platina na presença de H_2O_2 2 mmol L^{-1} : (a) 1º ciclo, (b) 2º ciclo e (c) 3º ciclo em meio de tampão pH = 7,2. $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$.

Devido à impossibilidade de se trabalhar com a superfície eletródica limpa, pensou-se em modificar a superfície do eletrodo com hexacianoferratos, uma vez que esses materiais são excelentes mediadores para a redução de peróxido de hidrogênio em potenciais menos positivos [101, 137].

4.3. Estudos com eletrodos modificados com filmes MHCF para detecção de peróxido de hidrogênio

4.3.1. Co^{2+} ou Cu^{2+} / $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$

4.3.1.1. Eletrodo de platina

Os filmes de CoHCF (Figura 16A) e CuHCF (Figura 16B) foram eletrodepositados por voltametria cíclica a partir de uma solução recém preparada de KCl 0,5 mol L⁻¹, K₃Fe(CN)₆ 1 mmol L⁻¹ e respectivamente CoCl₂ 1 mmol L⁻¹ ou CuCl₂ 1 mmol L⁻¹, executando-se 15 ciclos de varredura (-0,2 a 1,1 V a 100 mV s⁻¹).

Figura 16. Formação dos filmes (A) CoHCF e (B) CuHCF em eletrodo de platina a partir da solução recém preparada de KCl 0,5 mol L⁻¹, K₃Fe(CN)₆ 1 mmol L⁻¹ e respectivamente CoCl₂ 1 mmol L⁻¹ ou CuCl₂ 1 mmol L⁻¹. $v = 100 \text{ mV s}^{-1}$. 15 ciclos.

Usando a fórmula estequiométrica mais provável para as espécies oxidada ($\text{K}\{\text{Co}^{\text{II}}[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{CN})_6]\}$) e reduzida ($\text{K}_2\{\text{Co}^{\text{II}}[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{CN})_6]\}$) do filme de Co, pode-se descrever o processo eletródico da Figura 16A por:

Nos voltamogramas cíclicos obtidos após a eletrodeposição de CoHCF no eletrodo de platina, podem ser identificados dois picos anódicos (0,59 V e 0,72 V vs.

Ag/AgCl) e dois picos catódicos (0,52 V e 0,68 V vs. Ag/AgCl). Estes podem ser atribuídos à existência de duas formas estáveis $K_2\{Co^{II}[Fe^{II}(CN)_6]\}$ e $K\{Co_{1,5}[Fe^{II}(CN)_6]\}$, as quais são eletroativas em diferentes potenciais [153].

No caso da deposição do filme de CuHCF (*Figura 16B*), observam-se três picos correspondentes à oxidação / redução do composto de cobre.

Para a verificação da estabilidade do sinal de corrente dos eletrodos modificados, 15 ciclos de varredura foram efetuados em solução de KCl 0,5 mol L⁻¹ (*Figura 17*).

Figura 17. Verificação da estabilidade dos filmes gerados, (A) CoHCF e (B) CuHCF, em eletrólito suporte (KCl 0,5 mol L⁻¹). $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$. 15 ciclos.

Após a estabilização, experimentos voltamétricos em solução de peróxido de hidrogênio em meio de fosfato (pH = 7,2) foram realizados. A *Figura 18* apresenta adições sucessivas de peróxido de hidrogênio utilizando os dois eletrodos modificados.

Figura 18. Voltamogramas cíclicos obtidos utilizando eletrodos modificados com CoHCF (A) e CuHCF (B) em solução contendo: (a) tampão fosfato (pH = 7,2) e peróxido de hidrogênio: (b) 0,5 mmol L⁻¹, (c) 1,0 mmol L⁻¹, (d) 1,5 mmol L⁻¹, (e) 2,0 mmol L⁻¹ e (f) 2,5 mmol L⁻¹. $\nu = 50 \text{ mV s}^{-1}$.

Diferenças nos voltamogramas apresentados na *Figura 18* foram observadas em relação aos da estabilização (*Figura 17*), pois trabalhou-se em outras condições experimentais (KCl 0,5 mol L⁻¹ e tampão fosfato pH = 7,2). Essa mudança é devida à necessidade de se trabalhar em meio fisiológico.

Um sinal catódico foi observado na região de 0 V (vs Ag/AgCl) devido ao processo de redução de ambos os filmes (CoHCF e CuHCF). Esse processo é descrito na literatura [137], para filmes de Azul da Prússia, pela equação 10:

Com a adição de peróxido de 0,5 – 2,5 mmol L⁻¹ houve um aumento do sinal de corrente na região de 0 V devido a um processo eletrocatalítico envolvendo a reação do peróxido com a espécie reduzida, segundo a equação 11:

Essas adições sucessivas de alíquotas de peróxido de hidrogênio resultaram em duas curvas analíticas (*Figura 19*):

$$I(\mu\text{A}) = 0,2 - 18,9C(\text{mmol L}^{-1}) \quad \text{coeficiente de correlação} = -0,99972 (\text{CoHCF})$$

$$I(\mu\text{A}) = -0,5 - 14,9C(\text{mmol L}^{-1}) \quad \text{coeficiente de correlação} = -0,99919 (\text{CuHCF})$$

Figura 19. Curva de calibração para H₂O₂ obtida a partir dos dados voltamétricos utilizando o eletrodo modificado com CoHCF (a) e CuHCF (b).

Nota-se que o eletrodo modificado com CoHCF apresenta uma maior sensibilidade para a quantificação do peróxido, sendo este o escolhido para o desenvolvimento de um biossensor para detecção de lactato (monitoramento de peróxido de hidrogênio). Estudos posteriores indicaram que o biossensor construído a partir desse eletrodo tinha uma vida útil de apenas algumas medidas. Portanto, com base nesses resultados, descartou-se a utilização dessa superfície eletródica.

4.3.1.2. Eletrodo de carbono vítreo

Inicialmente, com o intuito de averiguar o comportamento eletroquímico do peróxido de hidrogênio em eletrodo de carbono vítreo, experimentos voltamétricos foram realizados em meios de tampão fosfato e solução contendo KCl e HCl (valor de pH inferior a 2) na região de -0,2 V a 1,1 V. Observou-se que, em ambas as condições, o peróxido de hidrogênio não é eletroativo nessa faixa de potencial.

Sabendo-se disso, partiu-se para a modificação do eletrodo com o filme de cobalto-hexacianoferrato (CoHCF). A propriedade química do filme de CoHCF é dependente dos métodos de preparação do mesmo [103, 106, 109, 112, 153, 154]. Nesta etapa, o filme de CoHCF (*Figura 20A*) foi eletrodepositado por voltametria cíclica a partir de uma solução recém preparada de KCl 0,1 mol L⁻¹, K₃Fe(CN)₆ 0,6 mmol L⁻¹ e CoCl₂ 0,6 mmol L⁻¹, executando-se 15 ciclos de varredura (-0,2 a 1,1 V a 50 mV s⁻¹). Para a verificação da estabilidade do sinal de corrente do eletrodo modificado, 15 ciclos de varredura foram efetuados em solução de KCl 0,1 mol L⁻¹ (*Figura 20B*).

Figura 20. Formação do filme de CoHCF em eletrodo de carbono vítreo a partir da solução recém preparada de KCl 0,1 mol L⁻¹, K₃Fe(CN)₆ 0,6 mmol L⁻¹ e CoCl₂ 0,6 mmol L⁻¹ (A). Verificação da estabilidade do filme gerado em eletrólito suporte (KCl 0,1 mol L⁻¹) (B). $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$. 15 ciclos.

De forma similar aos experimentos com eletrodo de platina, nos voltamogramas cíclicos obtidos após a eletrodeposição de CoHCF no eletrodo de carbono vítreo, podem ser identificados dois picos anódicos (0,55 V e 0,71 V vs. Ag/AgCl) e dois picos catódicos (0,48 V e 0,66 V vs. Ag/AgCl). Estes podem ser atribuídos à existência de duas formas estáveis $K_2\{Co^{II}[Fe^{II}(CN)_6]\}$ e $K\{Co_{1,5}[Fe^{II}(CN)_6]\}$, as quais são eletroativas em diferentes potenciais [153].

Após a estabilização, experimentos voltamétricos em solução de peróxido de hidrogênio em meio de KCl 0,1 mol L⁻¹ foram realizados (*Figura 21*).

Figura 21. Voltamogramas cíclicos obtidos utilizando eletrodo de carbono vítreo modificado com CoHCF em solução contendo: (a) KCl 0,1 mol L⁻¹ e (b) H₂O₂ 1 mmol L⁻¹. $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$.

Observa-se, na *Figura 21*, que após a adição de peróxido de hidrogênio, em meio de KCl 0,1 mol L⁻¹, não há mudanças significativas no comportamento eletroquímico do filme.

Após estes estudos, uma série de experimentos voltamétricos foi realizada alterando-se as condições de preparo do filme de CoHCF para detecção de peróxido de hidrogênio, conforme descrito na *Tabela 3*.

Tabela 3. Condições experimentais para a deposição eletroquímica do filme de CoHCF.

	<i>Solução</i>	$[Co^{2+}] / mmol L^{-1}$	$Fe(CN)_6^{3-} / mmol L^{-1}$	$HCl / mol L^{-1}$	$KCl / mol L^{-1}$	$v^* / mV s^{-1}$	<i>Picos / V</i>	<i>Sinal para H_2O_2 / V</i>
a	RP**	0,6	0,6	-	0,1	50	0,55 e 0,71 ^a 0,48 e 0,66 ^c	-
b	5 min.***	0,6	0,6	-	0,1	50	0,55 e 0,71 ^a 0,43 e 0,65 ^c	0,43 ^r 0,71 ^o
c	20min.***	0,6	0,6	-	0,1	50	0,58 ^a 0,41 e 0,65 ^c	0,41 ^r 0,58 ^o
d	RP	0,6	0,6	-	0,1	100	0,59 e 0,71 ^a 0,45 e 0,65 ^c	0,45 , 0,65 ^r 0,71 ^o
e	RP	3,0	3,0	0,02	0,1	50	0,27 , 0,59 e 0,71 ^a 0,17 , 0,49 e 0,66 ^c	-
f	RP	0,6	0,6	0,02	0,1	50	0,56 e 0,71 ^a 0,42 e 0,66 ^c	-

* v = velocidade de varredura ; ** RP = recém preparada; *** em repouso por 5 ou 20 minutos antes da execução do experimento; a anódico; c catódico; r redução; o oxidação.

Na *Figura 22* são apresentados os voltamogramas cíclicos obtidos após a eletrodeposição do filme de cobalto nas condições experimentais encontradas na *Tabela 3*.

Figura 22. Voltamogramas cíclicos obtidos após a eletrodeposição de filme de CoHCF em eletrodo de carbono vítreo. Condições apresentadas na *Tabela 3*.

Conforme comentado anteriormente, pode ser observado por meio dos picos anódicos e catódicos encontrados na *Tabela 3* e na *Figura 22* que, dependendo da condição experimental, filmes diferentes de CoHCF são formados. Nessas condições só foi possível detectar peróxido de hidrogênio em valores de potencial mais positivos do que 0,4 V e não desejáveis.

4.3.2. $Fe^{3+} / Fe(CN)_6^{3-}$

Um outro filme de metal hexacianoferrato muito utilizado para modificar a superfície de eletrodos e aplicado para a detecção de peróxido é o Azul da Prússia (ou o hexacianoferrato de ferro (III)) [115, 137]. Isto acontece porque a forma reduzida do AP (também chamada de Branco da Prússia, “*Prussian White*” - PW) tem um efeito catalítico para a redução de oxigênio molecular e peróxido de hidrogênio [154]. De maneira similar, a forma oxidada do AP (“*Berlin Green*” - BG) tem uma atividade catalítica para a oxidação do peróxido de hidrogênio [155]. O efeito catalítico do AP para o O_2 e H_2O_2 é atribuído à estrutura peculiar do AP.

$Fe^{III}_4[Fe^{II}(CN)_6]_3$ (“insolúvel”) e $KFe^{III}Fe^{II}(CN)_6$ (“solúvel”) são as duas fórmulas apresentadas para o AP. Esta classificação está relacionada unicamente com a incorporação dos íons potássio na estrutura do AP, não tendo nenhuma relação com a verdadeira solubilidade do material, uma vez que ambas as estruturas são essencialmente insolúveis em água e eletroativas [105].

Assim como para o filme de CoHCF, a propriedade química do filme de Azul da Prússia também é dependente do método de deposição do mesmo e diversos procedimentos de preparação do filme são encontrados na literatura [102 103, 107].

O Branco da Prússia apresenta atividade catalítica para a redução de peróxido de hidrogênio em meio ácido. Portanto, neste trabalho, inicialmente, o filme de AP (*Figura 23A*) foi eletrodepositado por voltametria cíclica a partir de uma solução recém preparada de HCl $0,02\text{ mol L}^{-1}$, KCl $0,1\text{ mol L}^{-1}$, $K_3Fe(CN)_6$ $0,6\text{ mmol L}^{-1}$ e $FeCl_3$ $0,6\text{ mmol L}^{-1}$ ($pH < 2$), executando-se 15 ciclos de varredura ($-0,2$ a $1,1\text{ V}$ a 50 mV s^{-1}). Para a verificação da estabilidade do sinal de corrente do eletrodo modificado, 15 ciclos de varredura foram efetuados em solução de KCl $0,1\text{ mol L}^{-1}$ contendo HCl $0,02\text{ mol L}^{-1}$ (*Figura 23B*).

Figura 23. Formação do filme de AP em eletrodo de carbono vítreo a partir da solução recém preparada de HCl 0,02 mol L⁻¹, KCl 0,1 mol L⁻¹, K₃Fe(CN)₆ 0,6 mmol L⁻¹ e FeCl₃ 0,6 mmol L⁻¹ (A). Verificação da estabilidade do filme gerado em eletrólito suporte (KCl 0,1 mol L⁻¹ contendo HCl 0,02 mol L⁻¹) (B). $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$. 15 ciclos.

Observam-se dois pares de picos nos voltamogramas cíclicos registrados na preparação do eletrodo modificado com AP (Figura 23). Utilizando a fórmula $\text{Fe}^{\text{III}}_4[\text{Fe}^{\text{II}}(\text{CN})_6]_3$ para o AP, o primeiro pico corresponde ao par PW / AP (equação 12) e o segundo ao par AP / BG (equação 13) [101, 102, 105, 107], onde A é o ânion do eletrólito.

AP “insolúvel”

PW

AP “insolúvel”

BG

Após a estabilização, experimentos voltamétricos em solução de peróxido de hidrogênio em meio de KCl 0,1 mol L⁻¹ contendo HCl 0,02 mol L⁻¹ foram realizados. A Figura 24 apresenta os voltamogramas cíclicos resultantes de adições sucessivas de peróxido de hidrogênio utilizando o eletrodo modificado e duas curvas analíticas para o

H_2O_2 , sendo uma para a redução ($E = -0,1 \text{ V}$) e a outra para a oxidação ($E = 0,95 \text{ V}$) na superfície do eletrodo.

Figura 24. Voltamogramas cíclicos obtidos utilizando eletrodo de carbono vítreo modificado com AP em solução contendo: (a) KCl 0,1 mol L⁻¹ + HCl 0,02 mol L⁻¹ e H_2O_2 (b) 1,0 mmol L⁻¹, (c) 2,0 mmol L⁻¹, (d) 3,0 mmol L⁻¹, (e) 4,0 mmol L⁻¹ e (f) 5,0 mmol L⁻¹. $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$. Curva analítica: $E = -0,1 \text{ V}$ (redução do H_2O_2) (a) e $E = 0,95 \text{ V}$ (oxidação do H_2O_2) (b).

As duas curvas analíticas resultantes dos voltamogramas da *Figura 24* têm as seguintes características:

$$(I/\mu\text{A}) = 0,16 - 4,61(C/\text{mmol L}^{-1}) \quad \text{coeficiente de correlação} = 0,99991 \text{ (} E = -0,1 \text{ V)}$$

$$(I/\mu\text{A}) = -0,2 + 2,62(C/\text{mmol L}^{-1}) \quad \text{coeficiente de correlação} = 0,99957 \text{ (} E = 0,95 \text{ V)}$$

Observa-se que o filme de Azul da Prússia suporta concentrações elevadas de H_2O_2 . Notam-se excelentes coeficientes de correlação para ambas as situações,

possibilitando construir assim um sensor para determinação de peróxido de hidrogênio baseado neste método de preparação do filme de Azul da Prússia. No caso da redução do peróxido de hidrogênio é possível trabalhar em uma ampla faixa de -0,2 a 0,1 V, possibilitando aumentar assim a seletividade do sensor.

Como a detecção do H_2O_2 em 0,95 V está sujeita a interferência de outras espécies eletroativas, decidiu-se trabalhar na região catódica. O processo eletrocatalítico observado na região catódica da *Figura 24* é descrito pelas equações 10 e 11, onde X = Fe.

O pH da solução é um ponto crítico porque os íons ferro (III) são facilmente hidrolisados, afetando a estabilidade do Azul da Prússia. Com o intuito de tornar o filme mais estável, alguns trabalhos reportados na literatura [120] utilizam o surfactante catiônico, CTAB. Portanto, o filme de AP foi obtido em solução contendo CTAB. Após a deposição do filme, o eletrodo foi colocado em solução de eletrólito suporte (KCl + HCl) e a estabilidade do sinal de corrente foi monitorada durante 60 ciclos de potencial. A *Figura 25* apresenta o 1º (a) e o 60º (b) ciclos de potencial para os filmes de AP obtidos sem (A) e com CTAB (B).

Na *Figura 25* é possível observar um ganho no sinal analítico quando o filme foi preparado na presença de CTAB ($I_{\text{com CTAB}} \sim -60 \mu\text{A}$ e $I_{\text{sem CTAB}} \sim -25 \mu\text{A}$).

Figura 25. Verificação da estabilidade do eletrodo modificado com AP preparado na ausência (A) e na presença (B) de CTAB. 1° (a) e 60° ciclos de potencial (b) em solução de KCl 0,1 mol L⁻¹ + HCl 0,02 mol L⁻¹ (pH = 1,7). $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$.

Valores de corrente de pico obtidos nos voltamogramas consecutivos após estabilização foram medidos em 0,17 V em função dos ciclos de potencial e comparados com os sem CTAB (Figura 26). Observa-se que, após 60 ciclos, na ausência de CTAB, ocorre uma queda no sinal de corrente de 64%, concordante com a literatura [120].

Figura 26. Corrente de pico medida em 0,17 V em função dos ciclos de potencial na ausência (a) e na presença de CTAB 1 mmol L⁻¹ (b) na formação do filme de AP.

Trabalhos encontrados na literatura mostraram a influência do CTAB na modificação do eletrodo somente quando a concentração do CTAB correspondia à primeira concentração micelar crítica (cmc) no meio de interesse [119, 156]. Por isso, nessa tese trabalhou-se com $[\text{CTAB}] = 1 \text{ mmol L}^{-1}$. Nesse caso, na presença de CTAB, o íon metálico (Na^+ ou K^+) pode ser aprisionado nas micelas devido à interação com o Br^- , o contra íon do CTAB. Esse efeito pode então ajudar no transporte / difusão dos íons Na^+ ou K^+ no filme de AP [156], aumentando assim a estabilidade do filme quando comparado ao preparado sem CTAB (*Figuras 25 e 26*).

A estabilidade do filme é afetada pela presença dos íons Na^+ ou K^+ provenientes dos diferentes eletrólitos utilizados [109]. Com isso, na próxima etapa as concentrações dos eletrólitos foram variadas, na presença de ácido e CTAB (*Tabela 4 e Figura 27*).

Tabela 4. Condições experimentais para a deposição eletroquímica do filme de AP.

Situação	$[Fe^{3+}] / mmol L^{-1}$	$[Fe(CN)_6^{3-}] / mmol L^{-1}$	$[HCl] / mol L^{-1}$	$[KCl] / mol L^{-1}$	$[NaCl] / mol L^{-1}$	$[CTAB] / mmol L^{-1}$
a	0,6	0,6	0,02	0,1	-	1,0
b	0,6	0,6	0,02	0,1	0,10	1,0
c	0,6	0,6	0,02	0,1	0,35	1,0
d	0,6	0,6	0,02	0,1	1,00	1,0
e	0,6	0,6	0,02	0,1	3,90	1,0
f	0,6	0,6	0,02	-	0,10	1,0

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

A Figura 27 apresenta os voltamogramas cíclicos para a formação (A) e verificação da estabilidade (B) do filme de AP nas condições apresentadas na Tabela 4.

Figura 27. Formação do filme de AP em eletrodo de carbono vítreo (A). Verificação da estabilidade do filme gerado em eletrólito suporte referente a cada situação (B). Condições experimentais encontradas na Tabela 4. $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$. 15 ciclos.

Observa-se na Figura 27 que quando a concentração de íons potássio é maior (situação a) ou até 10 vezes menor (situação d) que a concentração de íons sódio, o

formato dos voltamogramas registrados muda muito pouco. Nas situações e e f, quando há uma grande quantidade de íons sódio, observa-se um decréscimo ainda maior no sinal de corrente indicando a deposição menos efetiva do filme de AP. Também se pode observar o desaparecimento do sinal de corrente em valores de potenciais mais positivos.

Após a estabilização, experimentos voltamétricos foram realizados, para cada situação da *Tabela 4* (página 54), em solução contendo peróxido de hidrogênio variando de 1 a 5 mmol L⁻¹. Curvas analíticas para a redução e oxidação do peróxido de hidrogênio foram obtidas a partir dos voltamogramas cíclicos resultantes. Por meio das curvas analíticas, percebeu-se que aumentando a quantidade de íons sódio há uma diminuição na linearidade da reta, mas mesmo assim é possível monitorar H₂O₂ em meio ácido utilizando qualquer um dos filmes praticamente com a mesma sensibilidade.

Em todas as condições acima estudadas, o filme de AP foi depositado em meio ácido, mas como se deseja trabalhar em condições não ácidas, o próximo passo foi averiguar o comportamento do filme em meio contendo tampão fosfato em diferentes pHs. Para isso, experimentos voltamétricos em soluções contendo fosfato (pH = 7,2 ou 6,4 ou 5,5), CTAB 1 mmol L⁻¹, K₃Fe(CN)₆ 0,6 mmol L⁻¹ e FeCl₃ 0,6 mmol L⁻¹ foram realizados e nestas condições não foi possível depositar o filme.

Uma alternativa para esse problema foi encontrada: o filme de AP foi eletrodepositado em meio ácido a partir de uma solução recém preparada de CTAB 1 mmol L⁻¹, HCl 0,02 mol L⁻¹, KCl 0,1 mol L⁻¹, K₃Fe(CN)₆ 0,6 mmol L⁻¹ e FeCl₃ 0,6 mmol L⁻¹. A verificação da estabilidade do filme foi efetuada em meio contendo HCl 0,02 mol L⁻¹ e KCl 0,1 mol L⁻¹. A seguir, o monitoramento do peróxido de hidrogênio foi realizado em meio de fosfato (pH = 7,2, 6,4 e 5,5).

A *Figura 28* apresenta os voltamogramas cíclicos obtidos após a adição de peróxido de hidrogênio em meio de tampão fosfato pH = 7,2. Em tampão fosfato, o filme de AP apresenta dois picos anódicos (0,24 V e 0,89 V vs. Ag/AgCl) e dois picos catódicos (0,09 V e 0,81 V vs. Ag/AgCl). Com a adição sucessiva de peróxido de hidrogênio, há um aumento de sinal de corrente em potenciais mais negativos do que 0,1 V. Nessas condições é possível determinar H_2O_2 até $3,0 \text{ mmol L}^{-1}$. Estudos com concentrações de H_2O_2 maiores do que $3,0 \text{ mmol L}^{-1}$ não conduziram a resultados satisfatórios, portanto outras condições experimentais foram investigadas com o objetivo de ampliar a faixa dinâmica de concentração de H_2O_2 .

Figura 28. Voltamogramas cíclicos obtidos utilizando eletrodo modificado com AP em solução contendo: (a) tampão fosfato pH = 7,2 e H_2O_2 (b) 1 mmol L^{-1} , (c) $2,0 \text{ mmol L}^{-1}$ e (d) $3,0 \text{ mmol L}^{-1}$. $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$.

Assim sendo, partiu-se para a realização de experimentos voltamétricos envolvendo H_2O_2 em outras condições (pH = 5,5 e 6,4). A *Figura 29* apresenta os

voltamogramas cíclicos obtidos após a adição de peróxido de hidrogênio em meio de fosfato pH = 5,5 (A) e 6,4 (B).

Figura 29. Voltamogramas cíclicos obtidos utilizando eletrodo modificado com AP em solução contendo: (a) fosfato pH = 5,5 (A) ou pH = 6,4 (B) e H_2O_2 (b) 1 mmol L^{-1} , (c) $2,0 \text{ mmol L}^{-1}$, (d) $3,0 \text{ mmol L}^{-1}$ e (e) $4,0 \text{ mmol L}^{-1}$. $v = 50 \text{ mV s}^{-1}$.

Nas duas condições, o filme de AP apresenta dois picos anódicos (0,22 V e 0,89 V vs. Ag/AgCl) e dois picos catódicos (0,13 V e 0,81 V vs. Ag/AgCl). Com a adição sucessiva de peróxido de hidrogênio, há um aumento no sinal de corrente na região negativa semelhante ao observado na Figura 24. Curvas analíticas foram obtidas a partir dos voltamogramas cíclicos resultantes e em ambas as condições é possível detectar peróxido de hidrogênio praticamente com a mesma sensibilidade, entretanto a relação entre corrente de pico e concentração de H_2O_2 não é linear para concentrações superiores a $4,0 \text{ mmol L}^{-1}$. Como o pH = 6,4 é o mais próximo do encontrado em amostras clínicas, o mesmo foi adotado para os experimentos preliminares com o biossensor.

4.4. Construção do biossensor

4.4.1. Imobilização da lactato oxidase (LOX)

Após a otimização das condições para eletrodeposição do filme de Azul da Prússia e a determinação voltamétrica de peróxido de hidrogênio, partiu-se para a imobilização da enzima lactato oxidase na superfície do eletrodo modificado. Para isso, alguns procedimentos foram adotados na tentativa de imobilizar a enzima:

No *procedimento 1* (eletrodo modificado com filme de AP / LOX + glutaraldeído), a imobilização da enzima no eletrodo modificado não foi eficiente uma vez que resultados satisfatórios no que tange a respostas analíticas para lactato não foram obtidos.

No *procedimento 2* (eletrodo modificado com filme de AP / LOX + Nafion[®]), a enzima foi apenas colocada na superfície do eletrodo e coberta com uma camada de Nafion[®]. Essa tentativa foi eficaz com relação à não libertação da enzima mas não com relação à obtenção de respostas para lactato.

O *procedimento 3* é semelhante ao 2 sofrendo pequenas alterações nas quantidades adicionadas de enzima e de Nafion[®]. Além disso, o biossensor resultante foi imerso durante 30 min. em solução tampão fosfato pH = 6,9 e armazenado na geladeira, previamente aos experimentos. Com o intuito de averiguar a eficiência desse procedimento, um experimento amperométrico preliminar foi realizado utilizando 1 U de enzima, 10 µL de Nafion[®] e adições sucessivas de lactato 0,14 mmol L⁻¹ (*Figura 30*).

Figura 30. Curva amperométrica em solução tampão fosfato pH = 6,9 com adições sucessivas de lactato $0,14 \text{ mmol L}^{-1}$, utilizando o biossensor. $E_{\text{aplicado}} = -0,1 \text{ V}$. Curva amperométrica obtida sob agitação magnética. Quantidade de enzima = 1 U.

Esse procedimento mostrou-se eficiente na construção do biossensor. Portanto, o mesmo foi adotado para os experimentos posteriores.

4.4.2. Quantidade de enzima imobilizada na superfície do eletrodo modificado

A quantidade de enzima imobilizada é de extrema importância para a conversão do lactato em piruvato e peróxido de hidrogênio. Além disso, a LOX é relativamente cara. Portanto, o efeito da quantidade de enzima foi estudado utilizando-se 1, 2 e 2,5 U de LOX em experimentos amperométricos. Observa-se, na *Figura 31*, que quanto maior a quantidade de enzima, maior o sinal analítico. Visto que é possível determinar lactato em todas as condições, escolheu-se trabalhar com a quantidade menor de enzima (1 U)

uma vez que as quantidades de lactato encontradas nas amostras reais são elevadas e além disso minimizam-se os custos na fabricação do sensor.

Figura 31. Estudo da quantidade de enzima imobilizada na superfície do eletrodo modificado: (a) 1, (b) 2 e (c) 2,5 U. $E_{\text{aplicado}} = -0,1$ V. Curvas amperométricas obtidas sob agitação magnética.

4.5. Otimização dos parâmetros para o FIA

Apesar das informações importantes que podem ser obtidas com o auxílio da voltametria cíclica, esta técnica é pouco favorável quando se busca quantificar analitos em baixas concentrações. Isto deve-se ao fato de que, durante a varredura de potencial, ao sinal faradaico se soma a componente capacitiva, que se torna muito significativa

frente às baixas correntes geradas pelo processo faradaico em condições de concentrações reduzidas da espécie eletroativa.

A utilização de métodos de análise em fluxo constitui-se em uma forma de contornar este problema. Além disso, nos procedimentos em FIA, há um aumento na frequência de amostragem, eliminam-se algumas etapas “manuais”, melhoram-se a sensibilidade e reprodutibilidades dos resultados e minimiza-se o consumo de amostras e reagentes. Por isso, no presente trabalho onde determinações analíticas são apresentadas e a importância da sensibilidade é fundamental, partiu-se para sistema de injeção em fluxo para a análise de lactato.

4.5.1. Efeito do pH

A sensibilidade do sensor perante o pH do eletrólito suporte foi investigada por meio de adições de soluções de lactato $0,7 \text{ mmol L}^{-1}$. O maior sinal de corrente observado foi para o pH 6,9 (*Figura 32*) e em meio mais ácido e mais alcalino há um decréscimo no sinal. Os resultados obtidos com o biossensor já eram esperados visto que a enzima é mais ativa em meios neutros. Portanto, o pH 6,9 foi o escolhido para os estudos subsequentes.

Figura 32. Efeito do pH do eletrólito suporte. $E_{\text{aplicado}} = -0,1 \text{ V}$. Vazão = $0,85 \text{ mL min}^{-1}$.

Alça de amostragem = $50 \mu\text{L}$. Quantidade de enzima = 1 U.

4.5.2. Efeito da vazão

O efeito da vazão foi estudado na faixa de $0,5$ a $1,55 \text{ mL min}^{-1}$ e os resultados encontram-se na Figura 33. Os dados mostram um decréscimo no sinal analítico quando se aumenta a vazão. Isso se deve, provavelmente, a uma limitação cinética (reação catalisada do lactato). Levando este fato em consideração e a importância da frequência analítica, a vazão escolhida para os experimentos subsequentes foi de $0,85 \text{ mL min}^{-1}$.

Figura 33. Estudo da vazão de uma solução de lactato 0,28 mmol L⁻¹. $E_{\text{aplicado}} = -0,1$ V.

Alça de amostragem = 50 µL. Quantidade de enzima = 1 U.

4.5.3. Efeito do volume da amostra

O efeito do volume da amostra também foi estudado na faixa de 25 a 100 µL e é apresentado na Figura 34. Não são observadas mudanças significativas quando o volume da amostra injetada é variado. Portanto, optou-se pelo volume de 50 µL uma vez que se deseja trabalhar com volumes reduzidos de amostras.

Figura 34. Estudo do volume da amostra de uma solução de lactato $0,28 \text{ mmol L}^{-1}$.

$E_{\text{aplicado}} = -0,1 \text{ V}$. Vazão = $0,85 \text{ mL min}^{-1}$. Quantidade de enzima = 1 U.

4.5.4. Repetibilidade e frequência analítica

Com as condições otimizadas, averiguou-se a repetibilidade das medidas usando uma solução de lactato $0,28 \text{ mmol L}^{-1}$ em tampão fosfato pH = 6,9 (Figura 35). Obteve-se um desvio padrão de 2,2% para 18 repetições. A frequência analítica foi estimada em 160 injeções por hora.

Figura 35. Repetibilidade para a determinação de lactato $0,28 \text{ mmol L}^{-1}$. $E_{\text{aplicado}} = -0,1 \text{ V}$. Vazão = $0,85 \text{ mL min}^{-1}$. Alça de amostragem = $50 \text{ }\mu\text{L}$. Quantidade de enzima = 1 U .

4.5.5. Linearidade e limite de detecção

Injeções de soluções na faixa de concentração de $4,4$ a $2240 \text{ }\mu\text{mol L}^{-1}$ foram feitas para a construção da curva analítica ($-I(\mu\text{A}) = -6 \times 10^{-3} - 1,36 C_{\text{lactato}}(\text{mmol L}^{-1})$, $R = 0,99978$). A linearidade estendeu-se até $0,28 \text{ mmol L}^{-1}$ de lactato com limite de detecção de $0,84 \text{ }\mu\text{mol L}^{-1}$.

4.5.6. Interferentes

Estudos de possíveis interferentes (ácido ascórbico, ácido úrico e glicose) foram realizados e nenhum sinal analítico foi observado quando soluções contendo 1 mmol L^{-1} das espécies eletroativas foram injetadas. A ausência de resposta para essas moléculas investigadas é justificada pelo fato de os experimentos terem sido executados em potencial próximo a 0 V ($-0,1 \text{ V}$). Demonstra-se assim, a viabilidade do uso do biossensor em amostras reais na eventual presença desses analitos.

4.5.7. Estabilidade e reprodutibilidade

As investigações sobre a estabilidade de resposta durante armazenamento do biossensor foram realizadas durante um período de 24 horas em solução de lactato $0,28 \text{ mmol L}^{-1}$. Para tanto a solução de lactato foi injetada em triplicata para cada período. A *Figura 36* mostra os resultados do uso do biossensor quando armazenado em solução tampão em temperatura ambiente (curva a) e em baixa temperatura (5°C – curva b) entre os experimentos. A influência da temperatura durante o armazenamento do sensor mostrou-se de grande importância uma vez que quando armazenado em temperatura baixa houve uma queda no sinal analítico de apenas 23% após 24 horas enquanto que em temperatura ambiente a queda foi muito mais acentuada (87%). Portanto, pode-se dizer que a enzima mantém quase inteiramente sua atividade por um tempo relativamente longo se o biossensor for mantido em temperaturas baixas. Esta informação é importante pois minimiza-se a necessidade de seguidas etapas de calibração.

Figura 36. Dependência da corrente em função do tempo para o eletrodo mantido em solução tampão à temperatura ambiente (a) e em baixa temperatura (b).

A perda de sensibilidade do biossensor é um inconveniente que pode ser causada pela inativação da enzima ou pelo consumo em meios com concentrações elevadas de lactato. Este último problema está associado ao aumento da concentração de íons OH^- gerados em consequência da redução do peróxido de hidrogênio na superfície do eletrodo, conforme apresentada na *Figura 37*.

Figura 37. Esquema de um biossensor a base de AP para lactato.

Com o intuito de averiguar a reprodutibilidade na fabricação dos biossensores, três dispositivos foram construídos e obteve-se uma variabilidade das medidas de 9%, demonstrando que as diferenças no comportamento do operador para a fabricação dos biossensores não são tão relevantes.

4.6. Determinação de lactato em cervejas utilizando análise por injeção em fluxo

O método amperométrico proposto foi aplicado na análise de lactato em algumas amostras de bebidas alcoólicas e não alcoólicas. Amostras de cerveja foram diluídas de modo que o sinal de corrente correspondente fosse detectável na faixa de concentração trabalhada e a *Figura 38* apresenta o fiagrama obtido pelo método proposto para essas amostras.

Figura 38. Fiagrama obtido com injeções de soluções de lactato: (a) $4,4 \mu\text{mol L}^{-1}$, (b) $8,8 \mu\text{mol L}^{-1}$, (c) $17,5 \mu\text{mol L}^{-1}$, (d) $35 \mu\text{mol L}^{-1}$, (e) $70 \mu\text{mol L}^{-1}$, (f) $140 \mu\text{mol L}^{-1}$, (g) $280 \mu\text{mol L}^{-1}$ e amostras de cerveja (s1, s2 e s3). $E_{\text{aplicado}} = -0,1 \text{ V}$. Vazão = $0,85 \text{ mL min}^{-1}$. pH = 6,9. Quantidade de enzima = 1 U.

A comparação entre os resultados obtidos para a determinação de lactato em cervejas pelos métodos FIA e espectrofotométrico é apresentada na *Tabela 5*. Não há

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

diferença estatística entre os resultados no nível de confiança de 95%, indicando que o sensor amperométrico associado ao sistema FIA consiste em uma metodologia confiável para determinar lactato em amostras de cerveja.

Tabela 5. Resultados obtidos para a determinação de lactato em cervejas para o método proposto e para o método espectrofométrico.

<i>Amostras</i>	<i>Métodos</i>	
	FIA / mmol L ⁻¹	Espectrofométrico / mmol L ⁻¹
1	1,4 ± 0,1	1,65 ± 0,07
2	2,68 ± 0,09	2,60 ± 0,06
3	2,82 ± 0,05	2,8 ± 0,1
4	1,66 ± 0,01	1,56 ± 0,06

Uma tabela comparativa dos dois métodos para a determinação de lactato em cervejas é mostrada a seguir (*Tabela 6*):

Tabela 6. Comparação método FIA versus método de referência para determinação de lactato em cervejas.

<i>Condições</i>	<i>FIA</i>	<i>Referência</i>
Princípio	$\text{lactato} + \text{O}_2 \xrightarrow{\text{LOX}}$ $\text{piruvato} + \text{H}_2\text{O}_2$	$\text{lactato} + \text{NAD}^+ \xrightarrow{\text{LDH}}$ $\text{piruvato} + \text{NADH} + \text{H}^+$ $\text{piruvato} + \text{L-glutamato} \xrightarrow{\text{GPT}}$ $\text{L-alanina} + \text{2-oxoglutarato}$
Técnica	Amperometria / FIA	Espectrofotometria
Volume de amostra	1 mL	0,1 mL
Faixa linear	0,84-280 $\mu\text{mol L}^{-1}$	3,3-3900 $\mu\text{mol L}^{-1}$
Limite de detecção	0,84 $\mu\text{mol L}^{-1}$	3,3 $\mu\text{mol L}^{-1}$
Tempo de reação	Imediata	30 min.

Observa-se que o método proposto quando comparado ao de referência possui algumas vantagens como menor limite de detecção. Além disso, uma maior frequência analítica é obtida com o método proposto pois para a análise de uma amostra pelo método espectrofométrico são necessários aproximadamente 30 min. enquanto que a resposta no biossensor aparece em segundos. Desvantagens estão relacionadas ao maior consumo de reagentes e amostras e faixa linear menos ampla.

4.7. Determinação de lactato em sangue utilizando análise por injeção em fluxo

Inicialmente, o método amperométrico proposto foi aplicado na análise de lactato em amostra de sangue liofilizada. Essa amostra foi diluída 100 vezes. A Figura 39 apresenta o diagrama obtido com o biossensor.

Figura 39. Fiagrama obtido com injeções de soluções de lactato: (a) $35 \mu\text{mol L}^{-1}$, (b) $70 \mu\text{mol L}^{-1}$, (c) $140 \mu\text{mol L}^{-1}$, (d) $280 \mu\text{mol L}^{-1}$ e amostras de sangue fortificadas com solução de lactato (e) $0 \mu\text{mol L}^{-1}$, (f) $70 \mu\text{mol L}^{-1}$, (g) $140 \mu\text{mol L}^{-1}$ e (h) $280 \mu\text{mol L}^{-1}$. $E_{\text{aplicado}} = -0,1 \text{ V}$. Vazão = $0,85 \text{ mL min}^{-1}$. pH = 6,9. Quantidade de enzima = 1 U.

Os resultados obtidos para a concentração de lactato no sangue pela curva analítica ($-I(\mu\text{A}) = -7 \times 10^{-3} - 1,31 C_{\text{lactato}}(\text{mmol L}^{-1})$, $R = 0,99966$) (*Figura 40A*) e pelo método de adição de padrão ($-I(\mu\text{A}) = -80 \times 10^{-3} - 1,59 C_{\text{lactato}}(\text{mmol L}^{-1})$, $R = 0,99966$) (*Figura 40B*) são, respectivamente, $5,2$ e $5,0 \text{ mmol L}^{-1}$.

Figura 40. Valores de corrente em função da concentração de lactato (curva analítica) (A) e da concentração de lactato adicionado (método da adição de padrão) (B).

Os resultados obtidos pelo método FIA (5,2 e 5,0 mmol L⁻¹) foram comparados com aqueles obtidos empregando-se o analisador portátil (10 ± 5 mmol L⁻¹). No caso do analisador comercial, o desvio padrão foi calculado levando em conta 14 medidas independentes de lactato sanguíneo de uma mesma amostra.

Após essa etapa, partiu-se para a análise de lactato em sangue humano recém coletado. O primeiro estudo realizado consistiu na averiguação da variação da concentração de lactato de uma pessoa em repouso durante o período de 12:00 às 16:00h. Os resultados obtidos são apresentados na *Figura 41* e comparados com os obtidos com o analisador portátil. A concentração de lactato sanguíneo situou-se na região de 2 a 3 mmol L⁻¹, valores consistentes com os reportados na literatura para um indivíduo em repouso [18, 24-26]. Observa-se, também, que o desvio padrão dos resultados obtidos com o biossensor proposto é bem menor que os obtidos pelo método comparativo.

Figura 41. Variação da concentração de lactato em função da hora do dia. Resultados obtidos pelo método proposto (●) e com o analisador portátil (■).

A seguir é apresentada uma tabela comparativa dos dois métodos para a determinação de lactato em sangue (*Tabela 7*):

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

Tabela 7. Comparação método FIA versus o analisador portátil para determinação de lactato em sangue.

<i>Condições</i>	<i>FIA</i>	<i>Analisador portátil</i>
Princípio	$\text{lactato} + \text{O}_2 \xrightarrow{\text{LOX}}$ $\text{piruvato} + \text{H}_2\text{O}_2$	$\text{L-lactato} + \text{med.}_{\text{forma I}} \xrightarrow{\text{LOX}}$ $\text{piruvato} + \text{med.}_{\text{red.}}$ $\text{med.}_{\text{red.}} + 2,18\text{-fosfomolibdato} \rightarrow$ $\text{azul de molibdênio} + \text{med.}_{\text{forma II}}$
Técnica	Amperometria / FIA	Fotometria de reflectância
Volume de amostra	10 μL	15 μL
Diluição	1 : 50	sem
Faixa linear	0,84-280 $\mu\text{mol L}^{-1}$	0,8-22 mmol L^{-1}
Limite de detecção	0,84 $\mu\text{mol L}^{-1}$	0,8 mmol L^{-1}
Tempo de análise	18 s	60 s

Observa-se que o método proposto apresenta menor limite de detecção e tempo de resposta quando comparado ao analisador portátil. Apesar do volume de amostra utilizado no método proposto ser menor do que no método de referência, a amostra precisa ser diluída tornando-se uma desvantagem do método FIA. Outro fator negativo é a faixa linear não ser tão estendida quanto para o analisador portátil.

Após essa etapa, estudos sobre a variação da concentração de lactato sanguíneo em função da intensidade de atividade esportiva foram efetuados. Para tanto, coletou-se o sangue antes e imediatamente depois de 1 min. de esforço físico, uma vez que acúmulos rápidos e significativos de lactato sanguíneo ocorrem durante exercícios que duram entre 60 e 180 segundos [157]. Na *Figura 42* é apresentado o diagrama resultante das adições de duas soluções de lactato (a, b) e quatro amostras de sangue (s1,

s2, s3 e s4). Um aumento no sinal analítico é observado quando se compara s1 com s2 e s3 com s4 confirmando a utilidade do biossensor fabricado para monitorar mudanças rápidas da concentração de lactato em amostras de sangue. Nota-se, na *Figura 42*, que a concentração de lactato não retornou ao seu nível inicial (s1) depois de 10 min. de recuperação do indivíduo (s3) e um aumento subsequente foi observado claramente após nova execução de exercício físico (s4). Isso se deve ao fato de que são necessários em torno de 25 min. de repouso para remover a metade do lactato acumulado [157].

Figura 42. Variação da concentração de lactato em função da atividade física. Diagrama obtido com injeções de soluções de lactato: (a) $14 \mu\text{mol L}^{-1}$, (b) $28 \mu\text{mol L}^{-1}$ e amostras de sangue antes (s1, s3) e depois (s2, s4) do esforço físico. $E = -0,1 \text{ V}$. Vazão = $0,85 \text{ mL min}^{-1}$. $\text{pH} = 6,9$. Quantidade de enzima = 1 U.

CONDIÇÕES ÓTIMAS DO MÉTODO PROPOSTO PARA A
DETERMINAÇÃO DE LACTATO

Concentração de Fe(III)	0,6 mmol L ⁻¹
Concentração de Fe(CN) ₆ ³⁻	0,6 mmol L ⁻¹
Concentração de KCl	0,1 mol L ⁻¹
Concentração de HCl	0,02 mol L ⁻¹
Concentração de CTAB	1 mmol L ⁻¹
Voltametria cíclica para deposição do filme	-0,2 a 1,0 V
Número de ciclos para deposição do filme	15
Velocidade de varredura	50 mV s ⁻¹
Quantidade de enzima	1 U
Quantidade de Nafion [®]	10 µL (0,3%)
Eletrólito suporte	tampão fosfato pH = 6,9
Volume da alça de amostragem	50 µL
Vazão da bomba peristáltica	0,85 mL min ⁻¹
Potencial aplicado	-0,1 V
Temperatura	ambiente

5. CONCLUSÕES

No decorrer do trabalho foram apresentados resultados relacionados à fabricação de um biossensor para a determinação de lactato baseado na imobilização da lactato oxidase em filme de Azul da Prússia. A estabilidade do filme de AP foi realçada adicionando-se CTAB à solução de eletrodeposição e uma maior sensibilidade também foi observada.

Esses eletrodos modificados foram utilizados para a determinação amperométrica de lactato via reação com a enzima lactato oxidase por meio do monitoramento de peróxido de hidrogênio em -0,1 V em sistema em fluxo.

Estudos de possíveis interferentes (ácido ascórbico, ácido úrico, glicose e paracetamol) foram realizados e nenhum sinal analítico foi observado quando soluções contendo 1 mmol L⁻¹ das espécies eletroativas foram injetadas. A ausência de resposta para essas moléculas investigadas é justificada pelo fato de os experimentos terem sido executados em -0,1 V. Demonstra-se assim, a viabilidade do uso do biossensor em amostras reais na eventual presença desses analitos.

O detector proposto foi utilizado em sistema FIA para a determinação da concentração do lactato em amostras de cerveja e de sangue e a confiabilidade do método foi satisfatória comparando-se os resultados com os aqueles obtidos usando o método de referência, demonstrando assim a eficiência do dispositivo fabricado para análises rápidas e confiáveis de lactato em cervejas e sangue.

Por fim, realizaram-se estudos sobre a variação da concentração de lactato sanguíneo em função da intensidade de atividade esportiva. Foi observado que durante o esforço físico de 1 min. houve acúmulo significativo na concentração de lactato e que o

mesmo não retornou ao seu nível inicial depois de 10 min. de recuperação do indivíduo. Portanto, o método proposto pode ser utilizado para monitoramento da concentração de lactato em atletas durante exercícios esportivos visto que a dosagem do lactato permite avaliar a capacidade de exercício e monitorar a intensidade de treinamento dos atletas.

6. PERSPECTIVAS FUTURAS

A análise rotineira de lactato e outros analitos em amostras de sangue, por ser uma técnica invasiva, requer materiais especializados para a coleta, além de uma preocupação extra com a estabilidade das amostras em função do tempo. Uma alternativa seria a análise dessas substâncias em saliva e/ou urina, visto que ambas são facilmente coletadas. Portanto, um próximo passo seria determinar a concentração de lactato em saliva e urina utilizando o método proposto. Pretende-se coletar amostras de saliva, sangue e urina em diferentes indivíduos e correlacionar as concentrações encontradas nas mesmas.

Perspectivas futuras poderiam envolver também a construção de biossensores com dimensões micrométricas, permitindo assim análises em micro-volumes e/ou “*in vivo*”.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. R. Pilloton, T. N. Nwosu and M. Mascini, *Anal. Lett.*, **1988**, *21*, 727-740.
2. R. Puchades, M. A. Herrero, A. Maquieira and J. Atienza, *Food Chem.*, **1991**, *42*, 167-182.
3. F. Mizutani, S. Yabuki and Y. Hirata, *Anal. Chim. Acta*, **1995**, *314*, 233-239.
4. F. Mazzei, A. Azzoni, B. Cavalieri, F. Botrè and C. Botrè, *Food Chem.*, **1996**, *55*, 413-418.
5. J. L. F. C. Lima, T. I. M. S. Lopes and A. O. S. S. Rangel, *Anal. Chim. Acta*, **1998**, *366*, 187-191.
6. B. Serra, A. J. Reviejo, C. Parrado and J. M. Pingarrón, *Biosens. Bioelectron.*, **1999**, *14*, 505-513.
7. N. G. Patel, A. Erlenkötter, K. Cammann and G.-C. Chemnitz, *Sens. Actuators B*, **2000**, *67*, 134-141.
8. F. Palmisano, M. Quinto, R. Rizzi and P. G. Zambonin, *Analyst.*, **2001**, *126*, 866-870.
9. E. Mataix and M. D. Luque de Castro, *Anal. Chim. Acta*, **2001**, *428*, 7-14.
10. P. B. Martelli, B. F. Reis, A. N. Araújo, M. Conceição and B. S. M. Montenegro, *Talanta*, **2001**, *54*, 879-885.
11. K. Kriz, L. Kraft, M. Kroo and D. Kriz, *J. Agric. Food Chem.*, **2002**, *50*, 3419-3424.
12. A. M. Herrero, T. Requena, A. J. Reviejo and J. M. Pingarrón, *Eur. Food Res. Technol.*, **2004**, *219*, 556-559.
13. M. M. F. Choi, *Food Chem.*, **2005**, *92*, 575-581.

14. G. Palleschi, M. H. Faridnia, G. J. Lubrano and G. G. Guilbault, *Anal. Chim. Acta*, **1991**, 245, 151-157.
15. R. J. Gfrerer, G. A. Brunner, Z. Trajanoski, L. Schaupp, G. Sendlhofer, F. Skrabal, G. Jobst, I. Moser, G. Urban, T. R. Pieber and P. Wach, *Biosens. Bioelectron.*, **1998**, 13, 1271-1278.
16. G. Ramsay, “*Commercial Biosensors: applications to clinical, bioprocess, and environmental samples*”, John Wiley&Sons, Inc., New York, **1998**.
17. J. Perdomo, H. Hinkers, C. Sundermeier, W. Seifert, O. M. Morell and M. Knoll, *Biosens. Bioelectron.*, **2000**, 15, 515-522.
18. A. Poscia, D. Messeri, D. Moscone, F. Ricci and F. Valgimigli, *Biosens. Bioelectron.*, **2005**, 20, 2244-2250.
19. C. G. J. Schabmueller, D. Loppow, G. Piechotta, B. Schütze, J. Albers and R. Hintsche, *Biosens. Bioelectron.*, **2006**, 21, 1770-1776.
20. Y. Bergqvist, K. Hed and B. Karlberg, *Int. J. Sports Med.*, **1988**, 9, 73-76.
21. G. Volpe, D. Moscone, D. Compagnone and G. Palleschi, *Sens. Actuators B*, **1995**, 24-25, 138-141.
22. M. Ellmerer, L. Scaupp, Z. Trajanoski, G. Jobst, I. Moser, G. Urban, F. Skrabal and P. Wach, *Biosens. Bioelectron.*, **1998**, 13, 1007-1013.
23. M. Wu, Z. Lin, Y. Li and S. Ren, *Sens. Actuators B*, **2000**, 66, 269-271.
24. D. Pfeiffer, F. W. Scheller, K. Setz and F. Schubert, *Anal. Chim. Acta.*, **1993**, 281, 489-502.
25. J. H. Wilmore and D. L. Costill, “*Physiology of sport and exercise*”, Human Kinetics, **1994**.
26. T. W. Rowland, “*Developmental Exercise Physiology*”, Human Kinetics, **1996**.

27. A. J. Tüdös, G. A. J. Besselink and R. B. M. Schasfoort, *Lab on a Chip*, **2001**, *1*, 83-95.
28. J. Savory and A. Kaplan, *Clin. Chem.*, **1966**, *12*, 559-569.
29. M. E. Teaforde and A. Kaplan, *Clin. Chim. Acta*, **1967**, *15*, 133-138.
30. S. Girotti, B. Grigolo, E. Ferri, S. Ghini, G. Carrea, R. Bovara, A. Roda, R. Motta and R. Petilino, *Analyst*, **1990**, *115*, 889-894.
31. G. F. Olson, *Clin. Chem.*, **1962**, *8*, 1-10.
32. C. A. Tumang, E. P. Borges and B. F. Reis, *Anal. Chim. Acta*, **2001**, *438*, 59-65.
33. R. Toftgard, T. Anfält and A. Granéli, *Anal. Chim. Acta*, **1978**, *99*, 383-385.
34. U. Rydevick, L. Nord and F. Ingman, *Int. J. Sports Med.*, **1982**, *3*, 47-49.
35. A. P.-Diamandi, P. A. Siskos and E. P. Diamandis, *Clin. Chim. Acta*, **1983**, *129*, 359-364.
36. K. Zaitsu, M. Nakayama and Y. Ohkura, *Anal. Chim. Acta*, **1987**, *201*, 351-355.
37. Q. Xue and E. Yeung, *J. Chromatogr. A*, **1994**, *661*, 287-295.
38. Q. Dong, R. Dong, M. Jin and W. Jin, *J. Chromatogr. B*, **2002**, *774*, 121-126.
39. T. Yao, Y. Kobayashi and S. Musha, *Anal. Chim. Acta*, **1982**, *138*, 81-85.
40. L. Gorton and A. Hedlund, *Anal. Chim. Acta*, **1988**, *213*, 91-100.
41. U. Spohn, D. Narasaiah, L. Gorton and D. Pfeiffer, *Anal. Chim. Acta*, **1996**, *319*, 79-90.
42. E. A. M. Kronka, A. P. S. Paim, C. A. Tumang, R. Latanze and B. F. Reis, *J. Braz. Chem. Soc.*, **2005**, *16*, 46-49.
43. W. S. Simonides, R. Zaremba, C. van Hardeveld and W. J. van der Laarse, *Anal. Biochem.*, **1988**, *169*, 268-273.
44. T. P.-Ruiz, C. M.-Lozano, V. Tomás and J. Martín, *Analyst*, **1999**, *124*, 1517-1521.

45. <http://isi02.isiknowledge.com/portal.cgi/>, último acesso em janeiro de **2007**.
46. A. J. Bard and L. R. Faulkner, “*Electrochemical methods, fundamentals and applications*”, John Wiley&Sons, Inc., New York, **2001**.
47. M. J. L.-Castñón, A. J. M.-Ordieres and P. T.-Blanco, *Anal. Chim. Acta*, **1997**, *346*, 165-174.
48. M. J. F. Villamil, A. J. Miranda-Ordieres and P. Tuñón-Blanco, *Anal. Chim. Acta*, **1997**, *345*, 37-43.
49. N. F. Shram, L. I. Netchiporouk, C. Martelet, N. J.-Renault, C. Bonnet and R. Cespuglio, *Anal. Chem.*, **1998**, *70*, 2618-2622.
50. R. Garjonyte, Y. Yigzaw, R. Meskys, A. Malinauskas and L. Gorton, *Sens. Actuators B*, **2001**, *79*, 33-38.
51. P. N. Bartlett and D. J. Caruana, *Analyst*, **1994**, *119*, 175-180.
52. J.-W. Mo and W. Smart, *Front. Biosci.*, **2004**, *9*, 3384-3391.
53. M. Mascini, D. Moscone and G. Palleschi, *Anal. Chim. Acta*, **1984**, *157*, 45-51.
54. W. Trettnak and O. S. Wolfbeis, *Anal. Lett.*, **1989**, *22*, 2191-2197.
55. Y. Hu, Y. Zhang and G. S. Wilson, *Anal. Chim. Acta*, **1993**, *281*, 503-511.
56. J. Wang, Q. Chin and M. Pedrero, *Anal. Chim. Acta*, **1995**, *304*, 41-46.
57. N. Ito, T. Matsumoto, H. Fujiwara, Y. Matsumoto, S. Kayashima, T. Arai, M. Kikuchi and I. Karube, *Anal. Chim. Acta*, **1995**, *312*, 323-328.
58. D. Pfeiffer, B. Möller, N. Klimes, J. Szeponik and S. Fischer, *Biosens. Bioelectron.*, **1997**, *12*, 539-550.
59. E. I. Iwuoha, A. Rock and M. R. Smyth, *Electroanalysis*, **1999**, *11*, 367-373.
60. G. Aydin, S. S. Çelebi, H. Özyörük and A. Yildiz, *Sens. Actuators B*, **2002**, *87*, 8-12.

61. J. J. Burmeister, M. Plamer and G. A. Gerhardt, *Biosens. Bioelectron.*, **2005**, *20*, 1772-1779.
62. S. D. Sprules, J. P. Hart, S. A. Wring and R. Pittson, *Anal. Chim. Acta*, **1995**, *304*, 17-24.
63. H. C. Yoon and H.-S. Kim, *Anal. Chim. Acta*, **1996**, *336*, 57-65.
64. F. Mizutani, T. Yamanaka, Y. Tanabe and K. Tsuda, *Anal. Chim. Acta*, **1985**, *177*, 153-166.
65. F. Schubert, D. Kirstein, K. L. Schröder and F. W. Scheller, *Anal. Chim. Acta*, **1985**, *169*, 391-396.
66. R. Kurita, K. Hayashi, X. Fan, K. Yamamoto, T. Kato and O. Niwa, *Sens. Actuators B*, **2002**, *87*, 296-303.
67. J. Kulys, W. Schuhmann and H.-L. Schmidt, *Anal. Lett.*, **1992**, *25*, 1011-1024.
68. J. Kulys, L. Wang and A. Maksimoviene, *Anal. Chim. Acta*, **1993**, *274*, 53-58.
69. M. Boujitita, M. Chapleau and N. El Murr, *Electroanalysis*, **1996**, *8*, 485-488.
70. T.-M. Park, E. I. Iwuoha, M. R. Smyth, R. Freaney and A. J. McShane, *Talanta*, **1997**, *44*, 973-978.
71. C. R. Molina, M. Boujitita and N. El Murr, *Anal. Chim. Acta*, **1999**, *401*, 155-162.
72. A. C. Pereira, D. V. Macedo, A. S. Santos and L. T. Kubota, *Electroanalysis*, **2006**, *18*, 1208-1214.
73. E. Dempsey, J. Wang and M. R. Smyth, *Talanta*, **1993**, *40*, 445-451.
74. F. Palmisano, A. Guerrieri, M. Quinto and P. G. Zambonin, *Anal. Chem.*, **1995**, *67*, 1005-1009.
75. F. Palmisano, D. Centonze, M. Quinto and P. G. Zambonin, *Biosens. Bioelectron.*, **1996**, *11*, 419-425.

76. F. Palmisano, G. E. De Benedetto and C. G. Zambonin, *Analyst*, **1997**, 122, 365-369.
77. S. Suman, R. Singhal, A. L. Sharma, B. D. Malthotra and C. S. Pundir, *Sens. Actuators B*, **2005**, 107, 768-772.
78. A. Hulanicki, S. Glab and F. Ingman, *Pure Appl. Chem.*, **1991**, 63, 1247-1250.
79. E. Bakker and Y. Qin, *Anal. Chem.*, **2006**, 78, 3965-3983.
80. D. Lowinsohn and M. Bertotti, *Quim. Nova*, **2006**, 29, 1318-1325.
81. M. Alvarez-Icaza and U. Bilitewski, *Anal. Chem.*, **1993**, 65, 525A-533A.
82. M. Lambrechts and W. Sansen, “*Biosensors: microelectrochemical devices*”, IOP Publishing LTD, London, **1992**.
83. G. F. Bickerstaff, “*Immobilization of Enzymes and Cells*”, Humana Press, New Jersey, **1997**.
84. K. R. Rogers, *Anal. Chim. Acta*, **2006**, 568, 222-231.
85. M. Mehrvar and M. Abdi, *Anal. Sci.*, **2004**, 20, 1113-1126.
86. G. G. Guilbault and G. O. Neto, “*Immobilised cells and enzymes: a practical approach*”, ed. J. Woodward, IRL Press Limited, Oxford, cap.5, **1985**, 55-74.
87. P. N. Bartlett, “*Biosensor technology: fundamentals and applications*”, eds. R. P. Buck, W. E. Hatfield, M. Umaña and E. F. Bowden, Marcel Dekker, Inc., New York, cap. 7, **1990**, 95-115.
88. G. G. Guilbault, A. A. Suleiman, O. Fatibello-Filho and M. A. Nabirahni, “*Bioinstrumentation and biosensors*”, ed. D. L. Wise, Marcel Dekker, cap. 22, **1991**, 659-692.
89. L. C. Clark and C. Lyons, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **1962**, 102, 29-45.
90. L. Gorton, A. Lindgren, T. Larsson, F. D. Munteanu, T. Ruzgas and I. Gazaryan, *Anal. Chim. Acta*, **1999**, 400, 91-108.

91. I. Chibata, "*Immobilized Enzymes*", Kodansha LTD, Tokyo, caps. 1 e 2, **1978**, 1-73.
92. P. W. Carr and L. D. Bowers, "*Immobilized enzymes in Analytical and Clinical Chemistry*", John Wiley & Sons, New York, **1980**.
93. A. P. F. Turner, I. Karube and G. S. Wilson, "*Biosensors: fundamentals and applications*", Oxford Univeristy Press, New York, **1987**.
94. G. F. Bickerstaff, "*Enzymes in industry and medicine*", Edward Arnold, Great Britain, **1987**, 9-19.
95. S. Wilson and D. R. Thévenot, "*Biosensors: a practical approach*", ed. A. E. G. Cass, IRL Press at Oxford University, New York, cap. 1, **1990**, 1-17.
96. B. Eggins, "*Biosensors: an introduction*", Wiley Teubner, cap. 3, **1996**, 31-50.
97. M. F. B. Souza, *Quim. Nova*, **1997**, 20, 191-195.
98. A. Cox, R. K. Jaworski and P. J. Kulesza, *Electroanalysis*, **1991**, 3, 869-877.
99. A. J. Bard and L. R. Faulkner, *Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications*, **2001**, 2nd edition, John Wiley & Sons, cap. 14.
100. L. M. Siperko and T. Kuwana, *J. Electrochem. Soc.*, **1983**, 130, 396-402.
101. I. L. de Mattos and L. Gorton, *Quím. Nova*, **2001**, 24, 200-205.
102. A. A. Karyakin, *Electroanalysis*, **2001**, 13, 813-819.
103. S.-M. Chen, *J. Electroanal. Chem.*, **2002**, 521, 29-52.
104. A. Eftekhari, *J. Electroanal. Chem.*, **2002**, 537, 59-66.
105. R. Koncki, *Crit. Rev. Anal. Chem.*, **2002**, 32, 79-96.
106. N. R. de Tacconi, K. Rajeshwar and R. O. Lezna, *Chem. Mater.*, **2003**, 15, 3046-3062.
107. F. Ricci and G. Palleschi, *Biosens. Bioelectron.*, **2005**, 21, 389-407.
108. V. D. Neff, *J. Electrochem. Soc.*, **1978**, 125, 886-887.

109. Z. Gao, G. Wang, P. Li and Z. Zhao, *Electrochim. Acta*, **1991**, 36, 147-152.
110. J. Joseph, H. Gomathi and G. P. Rao, *Electrochim. Acta*, **1991**, 36, 1537-1541.
111. S. Bharathi, J. Joseph, D. Jeyakumar and G. P. Rao, *J. Electroanal. Chem.*, **1991**, 319, 341-345.
112. J. Joseph, H. Gomathi and G. P. Rao, *J. Electroanal. Chem.*, **1991**, 304, 263-269.
113. J. Joseph and H. Gomathi, *J. Electroanal. Chem.*, **1997**, 431, 231-235.
114. R. Garjonyte and A. Malinauskas, *Sens. Actuators B*, **1999**, 56, 93-97.
115. A. A. Karyakin, E. E. Karyakina, L. Gorton, *Electrochem. Commun.*, **1999**, 1, 78-82.
116. T. R. I. Cataldi, G. E. De Benedetto and A. Bianchini, *Electroanalysis*, **1998**, 10, 1163-1167.
117. M. S. Oliveira, T. R. C. Paixão and M. Bertotti, *Int. J. Electrochem. Sci.*, **2007**, 2, 248-256.
118. V. M. Ivama, “Desenvolvimento de eletrodos de pasta de C modificados com filmes de Azul da Prússia”, **2002**, dissertação de mestrado, USP-SP.
119. R. Vittal, H. Gomathi, *J. Phys. Chem.*, **2002**, 106, 10135-10143.
120. S. M. S. Kumar, K. C. Pillai, *Electrochem. Commun.*, **2006**, 8, 621-626.
121. S. Milardović, I. Kruhac, D. Iveković, V. Rumenjak, M. Tkalčec and B. S. Grabarić, *Anal. Chim. Acta*, **1997**, 350, 91-96.
122. J. Wang, X. Zhang and M. Prakash, *Anal. Chim. Acta*, **1999**, 395, 11-16.
123. J. Z. Zhang and S. Dong, *Anal. Lett.*, **1999**, 32, 2925-2936.
124. M. S. Lin and W. C. Shih, *Anal. Chim. Acta*, **1999**, 381, 183-189.
125. I. L. de Mattos, L. Gorton, T. Laurell, A. Malinauskas and A. A. Karyakin, *Talanta*, **2000**, 52, 791-799.

126. S. Milardović, Z. Grabarić, M. Tkalčec and V. Rumenjak, *J. of AOAC International*, **2000**, 83, 1212-1217.
127. D. Iveković, S. Milardović and B. S. Grabarić, *Biosens. Bioelectron.*, **2004**, 20, 872-878.
128. M. Florescu and C. M. A. Brett, *Anal. Lett.*, **2004**, 37, 871-886.
129. M. Ferreira, P. A. Fiorito, O. N. Oliveira, Jr. and S. I. C. de Torresi, *Biosens. Bioelectron.*, **2004**, 19, 1611-1615.
130. R. Pauliukaite and C. M. A. Brett, *Electrochim. Acta*, **2005**, 50, 4973-4980.
131. P. A. Fiorito and S. I. C. de Torresi, *J. Electroanal. Chem.*, **2005**, 581, 31-37.
132. S. De Luca, M. Florescu, M. E. Ghica, A. Lupu, G. Palleschi, C. M. A. Brett and D. Compagnone, *Talanta*, **2005**, 68, 171-178.
133. P. A. Fiorito, C. M. A. Brett and S. I. C. de Torresi, *Talanta*, **2006**, 69, 403-408.
134. S. Varma, Y. Yigzaw and Lo Gorton, *Anal. Chim. Acta*, **2006**, 556, 319-325.
135. C. Deng, M. Li, Q. Xie, M. Liu, Y. Tan, X. Xu and S. Yao, *Anal. Chim. Acta*, **2006**, 557, 85-94.
136. V. G. Prabhu, L. R. Zarapkar and R. G. Dhaneshwar, *Electrochim. Acta*, **1981**, 26, 725-729.
137. R. Garjonytė and A. Malinauskas, *Sens. Actuators B*, **1998**, 46, 236-241.
138. C.-X. Cai, K.-H. Xue, Y.-M. Zhou and H. Yang, *Talanta*, **1997**, 44, 339-347.
139. N. Shimojo, K. Fujino, S. Kitahashi, M. Nakao, K. Naka and K. Okuda, *Clin. Chem.*, **1991**, 37, 1978-1980.
140. C. X. Liu, Z. H. Guo, H. Wang, J. F. Xu, L. S. Feng and X. X. Cai, *Rare Metal Mat. Eng.*, **2006**, 35, 83-86.
141. Q. Chen, G. L. Kenausis and A. Heller, *J. Am. Chem. Soc.*, **1998**, 120, 4582-4585.

142. K. Sirkar, A. Revzin and M. V. Pishko, *Anal. Chem.*, **2000**, 72, 2930-2936.
143. E. W. Stein and M. J. McShane, *IEEE Trans. Nanobiosc.*, **2003**, 2, 133-137.
144. J. J. Pedrotti, L. Angnes and I. G. R. Gutz, *Electroanalysis*, **1996**, 8, 673-675.
145. B. F. Reis and H. B. Filho, *Quim. Nova*, **1993**, 16, 570-573.
146. Manual da Boehringer Mannheim / R- Biopharm (Cat. No. 10 139 084 035).
147. http://www.lactate.com/ac_techinfo.html, último acesso em janeiro de **2007**.
148. Manual do Accusport / Accutrend Lactate (Roche Diagnostics GmbH).
149. T. R. L. C. Paixão and M. Bertotti, *J. Electroanal. Chem.*, **2004**, 571, 101-109.
150. T. R. L. C. Paixão, “*Utilização de Eletrodos de Cu e Au em eletroanalítica: detecção amperométrica de etanol em ar exalado e outras aplicações*”, **2004**, dissertação de mestrado, USP-SP.
151. K. Aoki, M. Ishida, K. Tokuda and K. Hasebe, *J. Electroanal. Chem.*, **1988**, 251, 63-71.
152. B.-T. Tay, K.-P. Ang and H. Gunasingham, *Analyst*, **1988**, 113, 617-620.
153. P. J. Kulesza, M. A. Malik, S. Zamponi, M. Berrettoni, R. Marassi, *J. Electroanal. Chem.*, **1995**, 397, 287-292.
154. S.-M. Chen, *Electrochim. Acta*, **1998**, 43, 3359-3369.
155. K. Itaya, N. Shoji, I. Uchida, *J. Am. Chem. Soc.*, **1984**, 106, 3423-3429.
156. J.-M. Zen, P.-Y. Chen, A. S. Kumar, *J. Chinese Chem. Soc.*, **2002**, 49, 915-920.
157. W. Mcardle, F. I Katch and V. L. Katch, “*Fisiologia do Exercício: Energia, Nutrição e Desempenho Humano*”, Guanabara Koogan, 5ª ed., **2003**.

8. CURRICULUM VITAE

8.1. Dados pessoais

Nome: Denise Lowinsohn

Data de nascimento: 19/12/1978

Naturalidade: São Paulo – SP – Brasil

Estado Civil: Solteira

8.2. Formação acadêmica

Ensino Médio:

Fundação Liceu Pasteur, São Paulo (SP), 1996.

Graduação:

Bacharelado em Química pela Universidade de São Paulo, São Paulo (SP), 2000.

Licenciatura em Química pela Universidade de São Paulo, São Paulo (SP), 2005.

Pós-Graduação:

Mestrado em Química (Química Analítica) pelo Instituto de Química – Universidade de São Paulo, São Paulo (SP), 2003.

8.3. *Experiência profissional*

Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo

- Projeto de Estágio

Disciplina obrigatória da grade curricular, QFL0615 - Introdução à Tecnologia ou à Pesquisa Científica I

“Desenvolvimento de método eletroanalítico para determinação de Co(II) em meio de azoteto”

Orientador: Prof. Dr. Mauro Bertotti

Período: Agosto a Dezembro de 1998

- Projeto de Iniciação Científica

“Estudos comparativos sobre a redução eletroquímica de Mo(VI) em eletrodo gotejante de mercúrio, eletrodo de carbono vítreo e microeletrodos de mercúrio”

Orientador: Prof. Dr. Mauro Bertotti

Períodos: Abril de 1999 a Novembro de 2000

Bolsa: Fapesp (Processo 98/13413-0)

- Projeto de Mestrado

“Estabilização de Cu(III) em meio contendo peptídeos: estudos eletroquímicos e aplicações analíticas”

Orientador: Prof. Dr. Mauro Bertotti

Período: Março de 2001 até Março de 2003

Bolsa: Fapesp (Processo 00/14064-0)

- Projeto de Doutorado

“Desenvolvimento de um microsensor para análise de lactato (em amostras de sangue)”

Orientador: Prof. Dr. Mauro Bertotti

Período: Junho de 2003 até o presente

Período: Agosto de 2003 a Maio de 2004

Bolsa: Capes

Período: Junho de 2004 a Novembro de 2006

Bolsa: Fapesp (Processo 03/06869-7)

- Atividade de monitoria

“*QFL1200 - Química Analítica Qualitativa*”

Programa de Aperfeiçoamento de Ensino

Instituto de Química, Universidade de São Paulo (IQ-USP)

Responsável: Jorge C. Masini (Mauro Bertotti)

Período: 2o. semestre de 2002

Disciplina oferecida aos alunos do 1o. ano do curso de Oceanografia

“*QFL3200 – Princípios de Análise Química*”

Programa de Aperfeiçoamento de Ensino

Responsável: Pérola de C. Vasconcellos

Período: 1o. semestre de 2004

Disciplina oferecida aos alunos do 2o. ano do curso de Bacharel em Química Ambiental

“*1ª Escola de Eletroquímica*”

Responsável: Roberto M. Torresi

Período: 04 a 08 de dezembro de 2006

Curso oferecido a estudantes de doutorado, recém doutores e profissionais da indústria.

Escola de Artes, Ciências e Humanidades – USP Leste

- Atividade de monitoria

“ACH1023 – Química Ambiental”

Programa de Aperfeiçoamento de Ensino

Responsável: Andrea Cavicchioli

Período: 1o. semestre de 2006

Disciplina oferecida aos alunos do terceiro semestre no curso de graduação em Gestão Ambiental (diurno e noturno)

8.4. Curso extracurricular

Instrumentação Analítica

23a. Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química

Responsáveis: Mário César Ugulino de Araújo e José Germano Vêras Neto (UFPB)

Período: 23 a 26 de Maio de 2000

Poços de Caldas, MG

8.5. Prêmios

Prêmio Lavoisier – Melhor aluno do curso de Bacharelado em Química (1997/2000) – Concedido pelo Conselho Regional de Química – IV Região

Excelência Acadêmica – Concedido pela Universidade de São Paulo

8.6. *Produção científica*

8.6.1. Trabalhos apresentados em reuniões científicas

- **23a. Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química**

“Estudos Comparativos da Redução Catódica do Mo(VI) em Eletrodos de Mercúrio e Carbono Vítreo” (EQ-141 - painel)

Autores: D. Lowinsohn, Luis Kosminsky e M. Bertotti

23 a 26 de Maio de 2000

Poços de Caldas, MG

- **XII SIBEE – Simpósio Brasileiro de Eletroquímica e Eletroanalítica**

“Estudos sobre a adsorção de Mo(VI) em eletrodos de mercúrio” (p. 214-216 - painel)

Autores: D. Lowinsohn, P. V. de Oliveira e M. Bertotti

22 a 26 de Abril de 2001

Gramado, RS

- **11o. ENQA - Encontro Nacional de Química Analítica**

“Estudos relacionados à determinação coulométrica de sulfito em amostras de vinho”
(EQ-14 – painel e sessão coordenada)

Autores: D. Lowinsohn e M. Bertotti

18 a 21 de Setembro de 2001

Campinas, SP

- **25a. Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química**

“Comportamento eletroquímico do Cu(II) em meio alcalino contendo tetraglicina” (EQ-051 - painel)

Autores: D. Lowinsohn e M. Bertotti

20 a 23 de Maio de 2002

Poços de Caldas, MG

- **XIII SIBEE – Simpósio Brasileiro de Eletroquímica e Eletroanalítica**

“Estudos relacionados à degradação do complexo de Cu(III)/triglicina utilizando eletrodo rotativo disco-anel” (p. 140-142 – painel)

Autores: D. Lowinsohn e M. Bertotti

01 a 05 de Dezembro de 2002

Araraquara, SP

- **26a. Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química**

“Uso de microeletrodo de Pt como sensor amperométrico de ácido ascórbico em frutas” (EQ-061 - painel)

Autores: A. C. Pereira, D. Lowinsohn, T. R. L. C. Paixão e M. Bertotti

26 a 29 de Maio de 2003

Poços de Caldas, MG

- **54th Annual Meeting of the International Society of Electrochemistry (ISE)**

“Electrochemical studies on the formation and decomposition of a Cu(III)/tetraglycine species” (303, p. 76 - painel)

Autores: D. Lowinsohn e M. Bertotti

31 de Agosto a 05 de Setembro de 2003

São Pedro, SP

• **27a. Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química e XXVI Congresso Latinoamericano de Química**

“Comportamento eletroquímico do lactado em eletrodo de cobre” (EQ-045 - painel)

Autores: D. Lowinsohn, T. R. L. C. Paixão e M. Bertotti

30 de Maio a 02 de Junho de 2004

Salvador, BA

• **XIV SIBEE - Simpósio Brasileiro de Eletroquímica e Eletroanalítica**

“Construção de eletrodos de ouro descartáveis com áreas reprodutíveis confeccionados a partir de CDs graváveis” (EAN-30 – sessão coordenada)

Autores: D. Lowinsohn, E. M. Richter, L. Angnes e M. Bertotti

“Matriz de microeletrodos de ouro: caracterização e modificação da superfície por óxidos de molibdênio” (EAN-43 – sessão coordenada)

Autores: D. Lowinsohn, H. E. M. Peres, L. Kosminsky, T. R. L. C. Paixão, T. L. Ferreira, F. J. Ramirez-Fernandez e M. Bertotti

08 a 12 de Agosto de 2004

Teresópolis, RJ

- **13o ENQA - Encontro Nacional de Química Analítica e 1º CIAQA - Congresso Ibero-Americano de Química Analítica**

“Distribuição e quantificação de ácido ascórbico “in-situ” em frutas utilizando microeletrodo de Pt” (639 – painel e sessão coordenada)

Autores: T. R. L. C. Paixão, D. Lowinsohn e M. Bertotti

12 a 16 de setembro de 2005

Niterói, RJ

- **XV SIBEE - Simpósio Brasileiro de Eletroquímica e Eletroanalítica**

“Utilização do eletrodo de ouro modificado com monocamadas auto-organizável para detecção amperométrica em fluxo de paracetamol” (ETA-40, p. 136 – sessão coordenada)

Autores: V. A. Pedrosa, D. Lowinsohn e M. Bertotti

04 a 07 de dezembro de 2005

Londrina, PR

- **XVII SIBAE - Congresso da Sociedade Ibero-Americana de Eletroquímica**

“Utilização de filmes de metal-hexacianoferratos para desenvolvimento de biossensor para detecção de lactato” (C-33 – painel)

Autores: D. Lowinsohn, T. R. L. C. Paixão e M. Bertotti

03 a 07 de abril de 2006

La Plata, ARG

- **XVI SIBEE - Simpósio Brasileiro de Eletroquímica e Eletroanalítica**

“Determinação de lactato em cervejas utilizando um biossensor à base de Azul da Prússia e lactato oxidase” (EA – 225 – painel)

Autores: D. Lowinsohn e M. Bertotti

“Estudo da estabilidade do complexo Ni(III)/Gly-Gly-His gerado eletroquimicamente”
(EQ – 242 – painel)

Autores: Maria V. Alipázaga, D. Lowinsohn, M. Bertotti e N. Coichev

15 a 19 de abril de 2007

Águas de Lindóia, SP

8.6.2. Artigos em periódicos publicados

- *“Determination of sulphite in wine by coulometric titration”*

D. Lowinsohn and M. Bertotti, *Food Additives and Contaminants* **2001**, 18, 773-777.

- *“Coulometric titrations in wine samples: studies on the determination of S(IV) and the formation of adducts”*

D. Lowinsohn and M. Bertotti, *Journal of Chemical Education* **2002**, 79, 103-105.

- *“Comparative studies on the electrochemical behavior of Mo(VI) at mercury and glassy carbon electrodes”*

D. Lowinsohn and M. Bertotti, *Electroanalysis* **2002**, 14 (9), 619-626.

- “*Studies on the stability of the electrochemically generated Cu(III)–triglycine complex*”

D. Lowinsohn, M. V. Alipázaga, N. Coichev and M Bertotti, *Electrochimica Acta* **2004**, 49 (11), 1761-1766.

- “*Sulfite induced autoxidation of Ni(II) and Co(II) tetraglycine complexes. Spectrophotometric and rotating ring-disc voltammetric studies*”

D. Lowinsohn, M. V. Alipázaga, N. Coichev and M Bertotti, *Dalton Transactions* **2004**, 2, 267-272.

- “*Indirect FIA amperometric determination of sulphite based on the autocatalytic generation of Cu³⁺ complexes*”

D. Lowinsohn, M. V. Alipázaga, N. Coichev and M Bertotti, *Microchimica Acta* **2004**, 144 (1-3), 57-62.

- “*Design and fabrication of a microelectrode array for iodate quantification in small sample volumes*”

D. Lowinsohn, H. E. M. Peres, L. Kosminsky, T. R. L. C. Paixão, T. L. Ferreira, F. J. Ramirez-Fernandez and M. Bertotti, *Sensors and Actuators B* **2006**, 113 (1), 80-87.

- “*Disposable gold electrodes with reproducible area using recordable CDs and toner masks*”

D. Lowinsohn, E. M. Richter, L. Angnes and M. Bertotti, *Electroanalysis* **2006**, 18 (1), 89-94.

- “*Use of an electrochemically etched platinum microelectrode for ascorbic acid mapping in oranges*”

T. R. L. C. Paixão, D. Lowinsohn and M. Bertotti, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2006**, 54, 3072-3077.

- “*FIA determination of paracetamol in pharmaceutical drugs by using gold electrodes modified with a 3-mercaptopropionic acid monolayer*”

V. A. Pedrosa, D. Lowinsohn and M. Bertotti, *Electroanalysis* **2006**, 18 (9), 931– 934.

- “*Sensores eletroquímicos: considerações sobre mecanismos de funcionamento e aplicações no monitoramento de espécies químicas em ambientes microscópicos*”

D. Lowinsohn and M. Bertotti, *Química Nova* **2006**, 29 (6), 1318-1325.

- “*Autoxidation of Ni(II) and Co(II) tetra, penta and hexaglycine complexes accelerated by oxy sulfur radicals*”

L. B. Carvalho, M. V. Alipázaga, D. Lowinsohn, M. Bertotti and N. Coichev, *Journal of the Brazilian Chemical Society* **2006**, 17(7), 1400-1408.

- “*Flow injection analysis of blood L-lactate by using an amperometric Prussian Blue-based biosensor as amperometric detector*”

D. Lowinsohn and M. Bertotti, *Analytical Biochemistry* **2007**, 365, 260-265.

8.6.3. Artigo em periódico submetido para publicação

- “*A biosensor based on immobilization of lactate oxidase in a hexacyanoferrate film for FIA determination of lactate in beer samples*”

D. Lowinsohn and M. Bertotti, enviado para Microchimica Acta.