

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA**

MARÍLIA NIEDJA SANTOS DA COSTA ANDRADE

**DESENVOLVIMENTO DE UM BIOSENSOR PARA ÁCIDO LÁTICO A BASE
DE NANOMATERIAIS ELETRÓDICOS**

**MACEIÓ
2013**

MARÍLIA NIEDJA SANTOS DA COSTA ANDRADE

**DESENVOLVIMENTO DE UM BIOSSENSOR PARA ÁCIDO LÁTICO A BASE
DE NANOMATERIAIS ELETRÓDICOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas, como requisito parcial para à obtenção do grau de Mestre em Ciências.

Orientadora: Prof.Dr.a.Fabiane Caxico de Abreu Galdino

**MACEIÓ
2013**

Catálogo na fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central
Divisão de Tratamento Técnico

Bibliotecária Responsável: Helena Cristina Pimentel do Vale

A553d Andrade, Marília Niedja Santos da Costa.
Desenvolvimento de um biossensor para ácido láctico a base de nanomateriais eletródicos / Marília Niedja Santos da Costa Andrade. – 2012.
70 f. : il., graf.

Orientadora: Fabiane Caxico de Abreu Galdino.
Dissertação (mestrado em Química e Biotecnologia) – Universidade Federal de Alagoas. Instituto de Química e Biotecnologia. Maceió, 2012.

Bibliografia. f. 66-70.

1. Ácido láctico. 2. Biossensor. 3. Eletroanalítica. I. Título.

CDU: 544.6



UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
INSTITUTO DE QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA E
BIOTECNOLOGIA





BR 104 Km14, Campus A. C. Simões
Cidade Universitária, Tabuleiro dos Martins
57072-970, Maceió-AL, Brasil
Fone: (82) 3214-1144
Email: ppgqb.ufal@gmail.com


FOLHA DE APROVAÇÃO

Membros da Comissão Julgadora da defesa de Dissertação da mestranda Marília Niedja Santos da Costa Andrade, intitulada: **“Desenvolvimento de um Biossensor para Ácido Lático a Base de Nanomateriais Eletródicos”**, apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas em 12 de dezembro de 2013, às 14h00, na sala de Reuniões do IQB.

COMISSÃO JULGADORA


Prof.^a Dr.^a Fabiane Caxico de Abreu Galdino
Orientadora - PPGQB/IQB/UFAL


Prof. Dr. Hugo Juarez Vieira Pereira
PPGQB/IQB/UFAL


Prof.^a Dr.^a Maria Aline Barros Fidelis de Moura
PPGCF/UFAL

DEDICATÓRIA

A minha mãe, minha fonte inesgotável de inspiração

AGRADECIMENTOS

A Deus, pois sem ele nada seria possível.

A Universidade Federal de Alagoas e ao Instituto de Química e Biotecnologia, por toda estrutura, em especial ao Aldir por sempre está disponível a me ajudar e a Cida por manter tudo sempre limpo, antes do meu dia de trabalho.

À professora Dra. Fabiane Caxico de Abreu Galdino por tornar possível a realização desse trabalho, pela orientação, compreensão, contribuição para o meu crescimento e amadurecimento.

A todos do laboratório de Eletroquímica que contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho, de forma direta ou indiretamente, em especial a Andrea Claudia e Camila Calado por compartilhar comigo seu conhecimento e amizade.

A todos os alunos de iniciação científica, Elvis Max, Samaysa Lins, Laine Menezes, Ygor Mendes, Jéssica Julianne, Marílya Palmeira e Carol Candido por toda ajuda, carinho, força e descontração. Vocês foram meus verdadeiros companheiros nessa etapa da minha vida, serei eternamente grata.

Ao Grupo de Óptica e Materiais (OPTMA) do Instituto de Física, em especial ao professor Eduardo Fonseca e a técnica Ana Ribeiro pelas análises de Microscopia Eletrônica de Varredura.

A todos os professores que me acompanharam até hoje, através de seus ensinamentos e incentivos, em especial a professora Josiane Luna, minha grande amiga e incentivadora.

Ao meu esposo Victor por estar ao meu lado em todos os momentos, pelo apoio, incentivo, atenção, ensinamentos e especialmente pelo amor, carinho e amizade.

Aos meus pais Maria e Mário por tudo que eu sou hoje e ao meu irmão Mário Alberto pelo apoio constante e minha cunhada Jordana. As minhas tias, primas e primos em especial ao Williams e Ana Bella que me transmitem tanta alegria.

As minhas amigonas Edgleide e Jennifer Lorraneque acreditam nos meus sonhos e estão sempre dispostas a me escutar sempre que preciso me fazendo forte nos momentos de fraqueza e transmitido muito felicidade.

Ao CNPq, pelo auxílio concedido durante o desenvolvimento deste trabalho.

RESUMO

A determinação de ácido láctico é de interesse no diagnóstico clínico, na indústria de alimentos, na biotecnologia e na medicina do esporte. Nesse sentido objetivou-se desenvolver novos biossensores para determinar a concentração de ácido láctico, a base de nanotubos de carbono e nanocompósitos. Foram realizados estudos de acoplamento molecular utilizando o programa autodock Vina, e visualizados no programa Pymol. Todo o estudo eletroquímico do biossensor foi realizado utilizando-se a técnica de voltametria de pulso diferencial em um sistema com três eletrodos: eletrodo de carbono vítreo modificado com nanomateriais, como eletrodo de trabalho, platina como eletrodo auxiliar e Ag|AgCl|Cl⁻ (saturado), como eletrodo de referência. O experimento foi realizado em solução tampão fosfato (pH 7,0). Os biossensores foram preparados a partir da imobilização das enzimas lactato oxidase ou desidrogenase e imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV) foram realizadas para verificar a morfologia do material modificado no eletrodo. Os resultados de acoplamento molecular demonstraram que as enzimas tiveram maior afinidade com o nanotubos de carbono de paredes múltiplas. A partir das imagens de MEV na resolução de 100x e 1000x, observaram-se mudanças morfológicas na superfície dos nanocompósitos na presença das enzimas lactato desidrogenase e lactato oxidase. Os estudos eletroanalíticos demonstraram que o biossensor modificado com nanotubos de carbono funcionalizados com grupos NH₂, glutaraldeído e a enzima lactato desidrogenase obteve os melhores resultados, com baixos limites de detecção. Este estudo demonstrou que é possível utilizar o biossensor a base de nanotubos de carbono e enzimas lactato desidrogenase ou oxidase para determinar ácido láctico.

Palavras-chave: Ácido láctico. Biossensor. Eletroanalítica

ABSTRACT

The determination of lactic acid is of interest in clinical diagnosis, in the food industry, biotechnology and sports medicine. In this sense it was aimed to develop new biosensors for determining the concentration of lactic acid, the basis of carbon nanotubes and nanocomposites. Were realized docking modelling studies using the autodockVina program and viewed in the Pymol program. All electrochemical study of the biosensor was performed using the technique of differential pulse voltammetry on a system with three electrodes: glassy carbon electrode modified with nanomaterials as working electrode, platinum as auxiliary electrode and Ag|AgCl|Cl⁻ (saturated) as reference electrode. The experiment was performed in phosphate buffer solution (pH 7.0). The biosensors were prepared by immobilizing the enzyme lactate oxidase or dehydrogenase and scan electron microscopy (SEM) images were taken to check the morphology of the modified material in the electrode. The results of docking modelling demonstrated that the enzymes had a higher affinity for multi-walled carbon nanotube. From the SEM images in resolution of 100x and 1000x, we observed morphological changes on the surface of the nanocomposites in the presence of the enzyme lactate dehydrogenase and lactate oxidase. The electroanalytical studies demonstrated, that the biosensor modified with carbon nanotubes functionalized with NH₂ groups, glutaraldehyde and the enzyme lactate dehydrogenase obtained the best results, with low detection limits. This study demonstrated that it is possible to use the biosensor-based carbon nanotubes with enzymes lactate dehydrogenase or oxidase, for lactic acid determination.

Key Word: Lactic acid. Biosensor. Electroanalytical

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estrutura do ácido láctico.....	18
Figura 2 – Nicotinamida adenina dinucleotídeo ligada ao sítio ativo da enzima lactato desidrogenase.	19
Figura 3 – Estrutura tetramérica da LDH com quatro cadeias M idênticas	21
Figura 4 – Estrutura nicotinamida adenina dinucleotídeo.....	22
Figura 5 – Representação do complexo tetramérico da LOX com cada monômero retratado em diferentes cores	23
Figura 6 – Principais métodos de imobilização de enzimas	24
Figura 7 – Representação esquemática das estruturas dos nanotubos de carbono (a) SWCNT e (b) MWCNT	27
Figura 8 – Esquema de um biossensor com transdutor eletroquímico.....	28
Figura 9 – Estruturas no formato PDB a partir do Protein Data Bank a) receptor e b) ligante.....	30
Figura 10 – Tela do tridimensional de procura (Grid) do software Vina	31
Figura 11 – Tela do programa PyMOL	32
Figura 12 – Sinal de excitação em voltametria cíclica.....	34
Figura 13 – Esquema de preparo do biossensor de NTC	37
Figura 14 – Esquema de preparo do biossensor de NTC+nAuSiO ₂	38
Figura 15 – Esquema de preparo do biossensor de NTC+nSiO ₂	38
Figura 16 – Esquema de preparo do biossensor de NTC-NH ₂	39
Figura 17 – Esquema de preparo do biossensor de NTC-NH ₂ + glutaraldeído	40
Figura 18 – Esquema de preparo do biossensor de NTC-NH ₂ + nAuSiO ₂	40
Figura 19 – Sistema com os três eletrodos para análises eletroquímicas.....	41
Figura 20 – Estrutura da lactato desidrogenase interagindo com SWNT (a) e MWNT (b) e lactato oxidase interagindo com SWNT (c) e MWNT (d) ...	43
Figura 21 – Visualização das interações do MWNT e SWNT com os resíduos de OXI, através do programa pymol.....	43
Figura 22 – Visualização das interações do SWNT (a) e MWNT (b) com os resíduos de LDH, através do programa pymol.....	44
Figura 23 – Sítios ativos das enzimas lactato desidrogenase interagindo com SWNT (a) e MWNT (b) e lactato oxidase interagindo com SWNT (c) e MWNT (d).....	44

Figura 24 – Imagem de MEV de NTC, a) ampliação 100x; b) ampliação 1000x.....	45
Figura 25 – Imagem de MEV da enzima LDH imobilizada em NTC, a) ampliação 100x; b) ampliação 1500x	45
Figura 26 – Imagem de MEV da enzima LOX imobilizada em NTC , a) ampliação 100x; b) ampliação 1000x	46
Figura 27 – Figura – Imagem de MEV do NTC+nAuSiO ₂ , a) ampliação 100x; b) ampliação 1500x	46
Figura 28 – Imagem de MEV da enzima LDH imobilizada em NTC+nAuSiO ₂ , a) ampliação 100x; b) ampliação 1500x.	47
Figura 29 – Imagem de MEV da enzima LOX imobilizada em NTC+nAuSiO ₂ , a) ampliação 100x; b) ampliação 1000x.....	47
Figura 30 – Imagem de MEV do NTC+SiO ₂ , a) ampliação 100x; b) ampliação 1500x	48
Figura 31 – Imagem de MEV da imobilização da LDH no NTC+SiO ₂ , a) ampliação 100x; b) ampliação 1500x.....	48
Figura 32 – Imagem de MEV da imobilização da LOX no NTC+SiO ₂ , a) ampliação 100x; b) ampliação 1500x.....	49
Figura 33 – Micrografia de NTC-NH ₂ , a) ampliação 100x; b) ampliação 1500x.....	49
Figura 34 – Imagem de MEV de NTC-NH ₂ + LDH a) ampliação 100x; b) ampliação 1000x	50
Figura 35 – Imagem de MEV de NTC-NH ₂ + LOX a) ampliação 100x; b) ampliação 1000x	50
Figura 36 – Imagem de MEV de NTC-NH ₂ + Glutaraldeído, a) ampliação 100x; b) ampliação 1500x	51
Figura 37 – Imagem de MEV de NTC-NH ₂ + Glutaraldeído + LDH a) ampliação 100x; b) ampliação 1500x	51
Figura 38 – Imagem de MEV de NTC-NH ₂ + Glutaraldeído + LOX a) ampliação 100x; b) ampliação 1500x	52
Figura 39 – Imagem de MEV de NTC-NH ₂ + nAuSiO ₂ a) ampliação 100x; b) ampliação 1500x	52
Figura 40 – Micrografia de NTC-NH ₂ + nAuSiO ₂ + LDH a) ampliação 100x; b) ampliação 1500x	53
Figura 41 – Micrografia de NTC-NH ₂ + nAuSiO ₂ + LOX a) ampliação 100x; b) ampliação 1500x	53

Figura 42 - (a) Voltamogramas de Pulso Diferencial obtidos para ácido láctico em tampão fosfato pH 7, utilizando biossensor de CV modificado com NTC e enzima LDH e sua (b) curva de calibração	54
Figura 43 – (a) Voltamogramas de Pulso Diferencial obtidos para ácido láctico em tampão fosfato pH 7, utilizando biossensor de CV modificado com NTC+nSiO ₂ e enzima LDH e sua (b) curva de calibração	55
Figura 44 – (a) Voltamogramas de Pulso Diferencial obtidos para ácido láctico em tampão fosfato pH 7, utilizando biossensor de CV modificado com NTC+nAuSiO ₂ e enzima LDH e sua (b) curva de calibração	56
Figura 45 – (a) Voltamogramas de Pulso Diferencial obtidos para ácido láctico em tampão fosfato pH 7, utilizando biossensor de CV modificado com NTC funcionalizado com NH ₂ e enzima LDH e sua (b) curva de calibração	58
Figura 46 – (a) Voltamogramas de Pulso Diferencial obtidos para ácido láctico em tampão fosfato pH 7, utilizando biossensor de CV modificado com NTC funcionalizado com NH ₂ , glutaraldeído e enzima LDH e sua (b) curva de calibração	59
Figura 47 – (a) Voltamogramas de Pulso Diferencial obtidos para ácido láctico em tampão fosfato pH 7, utilizando biossensor de CV modificado com NTC funcionalizado com NH ₂ , nAuSiO ₂ e enzima LDH e sua (b) curva de calibração	59
Figura 48 – (a) Voltamogramas de Pulso Diferencial obtidos para ácido láctico em tampão fosfato pH 7, utilizando biossensor de CV modificado com NTC funcionalizado com grupos NH ₂ e enzima LOX e sua (b) curva de calibração	60
Figura 49 – (a) Voltamogramas de Pulso Diferencial obtidos para ácido láctico em tampão fosfato pH 7, utilizando biossensor de CV modificado com NTC funcionalizado com grupos NH ₂ , glutaraldeído e enzima LOX e sua (b) curva de calibração	60
Figura 50 – (a) Voltamogramas de Pulso Diferencial obtidos para ácido láctico em tampão fosfato pH 7, utilizando biossensor de CV modificado com NTC funcionalizado com grupos NH ₂ , nAuSiO ₂ e enzima LOX e sua (b) curva de calibração	61

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Resultados do acoplamento molecular entre os receptores 3LDH e 2ZFA e os ligantes SWNT e MWNT.....	42
Tabela 2 – Comparativo entre biossensor de ácido láctico modificados com nanatubos de carbonos, nanocompósitos e enzimas LDH e LOX	62

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ALA – Alanina
ARG – Arginina
ASN – Asparagina
ASP – Aspartato
CLAE – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
GLN – Glutamina
GLU – Glutamato
GLY – Glicina
HIS – Histidina
ILE – Isoleucina
 K_m – Constante de Michaelis-Menten
LDH – Lactato Desidrogenase
LEU – Leucina
LOX – Lactato Oxidase
LYS – Lisina
MET – Metionina
MEV - Microscopia Eletrônica de Varredura
MWCNT – Nanotubos de carbono de parede múltiplas
 NAD^+ – Dinucleótido de Nicotinamida Adenina Oxidado
NADH – Dinucleótido de Nicotinamida Adenina Reduzido
 $nAuSiO_2$ – Nano Ouro Sílica
NPs – Nanopartículas
 $nSiO_2$ – Nano Sílica
NTC – Nanotubos de carbono
NTC-NH₂ – Nanotubos de carbono funcionalizado com grupos amina
PDB - *Protein Data Bank*
PRO – Prolina
SER – Serina
SWCNT – Nanotubos de Carbono de Parede Simples
TF – Tampão Fosfato
THR – Treonina
TYR – Tirosina

V_0 – Velocidade Inicial

VAL – Valina

VC – Voltametria Cíclica

$V_{\text{máx}}$ – Velocidade Máxima

VPD – Voltametria de Pulso Diferencial

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	OBJETIVOS	17
2.1	Objetivo geral	17
2.2	Objetivos específicos	17
3	REVISÃO DE LITERATURA	18
3.1	Ácido láctico	18
3.2	Enzimas	19
3.2.1	Lactato desidrogenase	20
3.2.2	Lactato oxidase	22
3.2.3	Imobilização enzimática	23
3.3	Nanomateriais	26
3.3.1	Nanotubos de carbono (NTC)	26
3.4	Biossensor	28
3.5	Acoplamento molecular	29
3.5.1	Autodok vina	30
3.5.2	Pymol	32
3.6	Métodos voltamétricos	32
3.6.1	Voltametria cíclica	33
3.6.2	Voltametria de pulso diferenciado	34
4	METODOLOGIA	35
4.1	Estudos de acoplamento molecular	35
4.1.1	Obtenção das sequências	35
4.1.2	Interações entre a enzima e NTC	35
4.2	Preparo da limpeza padrão dos eletrodos de carbono vítreo	35
4.2.1	Preparo da dispersão dos NTC	36
4.3	Síntese da nanosílica	36
4.3.1	Síntese de nanopartículas de ouro	36
4.4	Preparo dos reagentes enzimáticos e soluções	37
4.5	Preparo do biossensor no eletrodo de carbono vítreo	37
4.5.1	Preparo do biossensor com NTC	37
4.5.2	Preparo do biossensor com NTC+nAuSiO ₂	38
4.5.3	Preparo do biossensor com NTC+nSiO ₂	38

4.5.4	Preparo do biossensor com NTC-NH ₂	39
4.5.5	Preparo do biossensor com NTC-NH ₂ + glutaraldeído	39
4.5.6	Preparo do biossensor com NTC-NH ₂ +nAuSiO ₂	40
4.6	Estudos eletroquímicos	40
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	42
5.1	Estudo de acoplamento molecular	42
5.2	Microscopia eletrônica de varredura	45
5.2.1	NTC como material suporte	45
5.2.2	NTC+nAuSiO ₂ como material suporte	46
5.2.3	NTC+SiO ₂ como material suporte.....	47
5.2.4	NTC-NH ₂ como material suporte	49
5.2.5	NTC-NH ₂ + glutaraldeído como material suporte	50
5.2.6	NTC-NH ₂ + nAuSiO ₂ como material suporte.....	52
5.3	Estudos eletroquímicos	54
5.3.1	Modificação do eletrodo com NTC, NTC+nSiO ₂ , NTC+nAuSiO ₂ e LDH	54
5.3.2	Modificação do eletrodo com NTC, NTC+nSiO ₂ , NTC+nAuSiO ₂ e LOX	57
5.3.3	Modificação do eletrodo com NTC-NH ₂ , NTC-NH ₂ +glutaraldeído, NTC-NH ₂ +nAuSiO ₂ e LDH	57
5.3.4	Modificação do eletrodo com NTC-NH ₂ , NTC-NH ₂ +glutaraldeído, NTC-NH ₂ +nAuSiO ₂ e LOX	59
5.3.5	Comparações entre os biossensores	62
6	CONCLUSÃO	64
	REFERÊNCIAS	66

1 INTRODUÇÃO

A determinação do ácido láctico vem recebendo atenção no diagnóstico clínico, na indústria de alimentos, na biotecnologia e na medicina do esporte (HUANG et al., 2008; PARRA et al., 2006). O aumento de sua concentração no sangue é um indicador sensível de desordens médicas humanas (LI et al., 2008). Além do mais pode ser usado como um indicador do processo fermentativo em alimentos (PARRA et al., 2006).

O ácido láctico pode ser analisado utilizando métodos de CLAE, cromatografia de exclusão iônica ou kits de testes enzimáticos. Porém, estes métodos são muitas vezes demorados, dispendiosos e requer equipamento laboratorial e pessoal qualificados. Assim, o desenvolvimento de biossensores para a determinação de ácido láctico em amostras reais, é de grande interesse porque oferece várias vantagens, tais como a elevada especificidade, de resposta rápida, de baixo custo e para executar análise *in situ* (MONOSÍKet al., 2012).

Um biossensor pode ser definido como um sensor que combina a alta seletividade de um elemento biológico sensível ao analítico de interesse, ligado a um transdutor que converte o sinal biológico em sinal elétrico proporcional à concentração do analito (ROSATTO et al., 2001; TURNER et al., 1988).

O elemento biológico mais utilizado em biossensores para determinação de ácido láctico são as enzimas lactato desidrogenase e a lactato oxidase. A primeira catalisa a oxidação do lactato em piruvato em presença da forma oxidada da coenzima nicotinamida adenina dinucleótido(NAD⁺) e o NADH reduzido pode ser detectado. Já a segunda, converte o lactato a piruvato e peróxido de hidrogênio, e neste caso o H₂O₂ é detectado amperometricamente (ROMERO et al., 2008; PEREIRA et al., 2007).

Para imobilizar essas enzimas no eletrodo de trabalho faz-se necessário sua imobilização. Os nanotubos de carbono (NTC) abriram o caminho para o estudo direto de proteínas através da eletroquímica, visto que enzimas e proteínas redox possuem um sítio ativo protegido numa cadeia polipeptídica hidrofóbica, tendo seus centros redox eletricamente isolados e inacessíveis na superfície do eletrodo, tornando difícil o estudo eletroquímico direto de enzimas e proteínas a partir de eletrodos convencionais, como carbono vítreo, ouro e platina (FENG et al., 2008). A combinação de NTC que apresentam diversas propriedades interessantes com

nanocompósitos que podem gerar mudanças significativas nas propriedades da matriz, como também devido sua área superficial elevada resultando em um nanocompósito com características únicas, pode interferir positivamente na imobilização e na catálise (ESTEVEZ et al., 2004).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Desenvolver novos biossensores para determinar a concentração de ácido láctico, a base de nanotubos de carbono e de nanocompósitos.

2.2 Objetivos Específicos

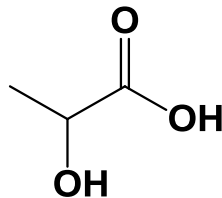
- ✓ Verificar a interação entre nanotubos de carbono e as enzimas lactato oxidase e lactato desidrogenase através de estudos de acoplamento molecular;
- ✓ Modificar a superfície de eletrodos de carbono vítreo com nanotubos de carbono sem e com funcionalização com grupos amina, nanoourosílica, nanosílica e glutaraldeído;
- ✓ Avaliar nanomateriais eletródicos tais como nanocompósitos e nanotubos de carbono a base da enzima lactato desidrogenase ou oxidase;
- ✓ Identificar o nanomaterial eletródico que melhor imobiliza as enzimas lactato desidrogenase ou oxidase.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Ácido láctico

O ácido láctico (ácido 2-hidróxiopropanóico) é um composto orgânico que apresenta fórmula molecular $C_3H_6O_3$ e sua estrutura é apresentada na Figura 1. Sua determinação é de grande interesse no diagnóstico clínico, na indústria de alimentos principalmente em laticínios e vinho, na biotecnologia ou na medicina do esporte. (HUANG et al., 2008; PARRA et al., 2006).

Figura 1 – Estrutura do ácido láctico



Fonte: Autora, 2013

O ácido láctico é um metabólito formado a partir de ácido pirúvico nos músculos devido ao suprimento inadequado de oxigênio. O nível de ácido láctico dá uma indicação do estado de oxigenação do tecido. O aumento da concentração de lactato no sangue é um indicador sensível de desordens médicas humanas (Li et al., 2008). Podendo ser indicativos de vários estados patológicos, incluindo t insuficiências respiratórias e cardíacas (HUANG et al., 2008), a determinação da sua concentração no sangue é essencial para o diagnóstico das condições do paciente durante o tratamento intensivo e processos de operação cirúrgica. Também é útil em medicina desportiva, em particular para estimar as condições físicas dos atletas (PARRA et al., 2006).

O ácido láctico é um produto final do metabolismo bacteriano no biofilme dental (MINAH & LOESCHE, 1977). Desta forma a determinação da concentração de ácido láctico na placa dental podem ser parâmetros importantes na determinação do risco de cárie de um paciente.

Nos gêneros alimentícios, O ácido láctico é produzido pela fermentação bacteriana e é um componente essencial à fabricação de queijo, iogurte, produtos de carne fermentados, leite, manteiga, etc. (MARTELLI et al., 2001), pode ser usado como um indicador do processo fermentativo e está relacionado com a frescura, a

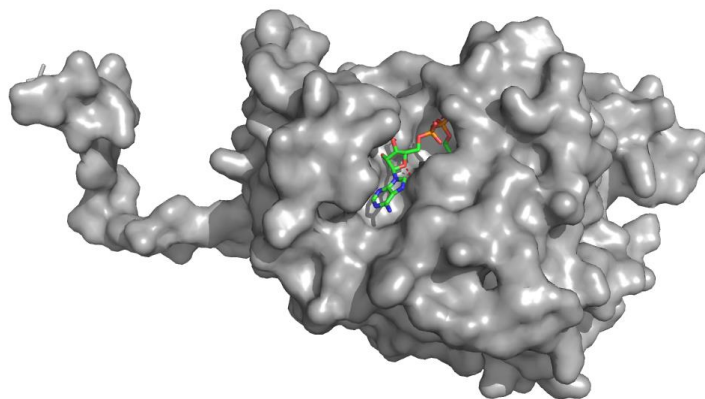
estabilidade e a qualidade de armazenagem de vários produtos, tais como molhos de tomate, frutos, sumos, vinho e do leite (PARRA et al., 2006).

3.2 Enzimas

As enzimas são proteínas – com exceção de um grupo de moléculas de RNA catalítico – que catalisam as reações dos sistemas biológicos. Possuem um alto grau de especificidade para os seus respectivos substratos, aceleram as reações químicas e atuam em soluções aquosas com temperaturas e pH ótimo (NELSON & COX, 2011). Algumas enzimas necessitam de um componente químico adicional, denominado cofator, ou seja, íons inorgânicos ou uma coenzima, molécula orgânica ou metalorgânica complexa (NELSON & COX, 2011).

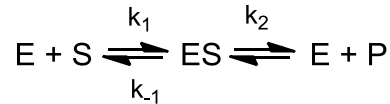
As reações catalisadas por enzimas ocorrem confinada em uma região da enzima, denominado sítio ativo, a Figura 2 mostra o sítio ativo da enzima lactato desidrogenase. O substrato liga-se ao sítio ativo, através dos grupos da cadeia lateral dos resíduos de aminoácidos, formando um complexo com ele, normalmente por interações não covalentes e leva a formação das espécies do estado de transição – estado onde ocorrem as melhores interações entre a enzima e o substrato – formando assim o produto (CAMPBELL&FARRELL, 2007).

Figura 2 – Nicotinamida adenina dinucleotídeo ligada ao sítio ativo da enzima lactato desidrogenase.



Fonte: White et al.(1976) Enzima tirado do banco de dados PDB 3ldh e modificada no Pymol pela própria autora.

Grande parte das características das reações catalisadas por enzimas podem ser entendida por um simples modelo proposto por Leonor Michaelis e Maude Menten, através da reação abaixo:



onde E, S e P representam enzima, substrato e produto respectivamente, ES é um complexo transitório da enzima com o substrato (RARVEY & FERRIER, 2012). O papel da enzima é acelerar a interconversão entre S e P, ou seja qualquer enzima que catalise a reação $S \rightarrow P$ pode catalisar a reação $P \rightarrow S$. Além do mais, a enzima não reage no processo, nem o ponto de equilíbrio é afetado. Porém, a reação atinge o equilíbrio de forma mais rápida, quando uma enzima apropriada estiver presente (NELSON & COX, 2011).

A equação de Michaelis-Menten ou equação da velocidade da reação de um substrato catalisada por uma enzima:

$$v_0 = \frac{V_{m\acute{a}x}[S]}{K_m + [S]}$$

Essa equação define a relação quantitativa entre a velocidade inicial (V_0) a velocidade máxima ($V_{m\acute{a}x}$) e a concentração inicial de substrato $[S]$, todas relacionadas pela constante de Michaelis, K_m (NELSON & COX, 2011). O K_m é característico de cada enzima e seu substrato específico, e reflete a afinidade entre eles, portanto um K_m numericamente pequeno indica alta afinidade, já para um K_m numericamente grande, uma menor afinidade (RARVEY & FERRIER, 2012).

Em muitas oxidações biológicas, um composto perde dois elétrons e dois prótons (ou seja dois átomos de hidrogênio). Essas reações são chamadas comumente de desidrogenações e essas enzimas que catalisam são chamadas de desidrogenase. Em algumas oxidações biológicas, mas não em todas, um átomo de carbono é covalentemente ligado a um átomo de oxigênio. As enzimas que catalisam essas oxidações geralmente são chamadas de oxidases (NELSON & COX, 2011).

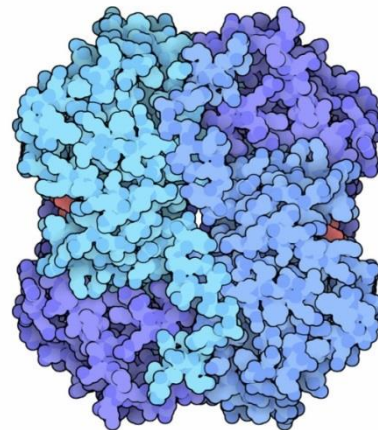
3.2.1 Lactato desidrogenase

Na classe das oxidorreduções, a lactato desidrogenase (LDH) é uma enzima que catalisa a interconversão de piruvato e lactato com a nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD^+) como coenzima.

A LDH foi umas das primeiras enzimas para qual se encontrou isoenzimas (NELSON & COX, 2011). Existem dois tipos principais de LDH, que são codificadas

por genes diferentes: LDH-A ou M (de músculo) e LDH-B ou H (de coração) existe também uma terceira forma a LDH-C ou X produzida em esperma. A combinação entre as eles formam cinco isoenzimastetramérica diferentes, tais como: LDH-1 ou B₄; LDH-2 ou A₁B₃; LDH-3 ou A₂B₂; LDH-4 ou A₃B₁ e LDH-5 ou A₄ (LAUGHTON et al., 2000). A Figura 3 mostra, a partir de entrada PDB da 3ldh, a estrutura tetramérica da LDH com quatro cadeias M idênticas.

Figura 3 – Estrutura tetramérica da LDH com quatro cadeias M idênticas



Fonte: *Protein Data Bank* (PDB) GOODSELL, 2008

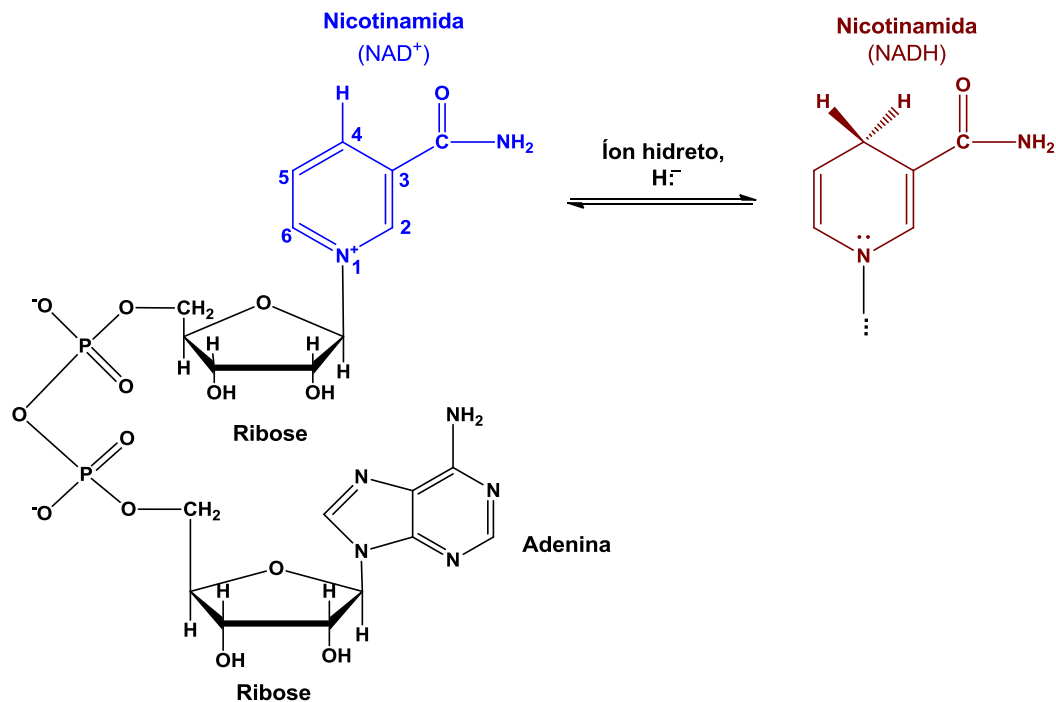
As formas M e H apesar de apresentarem estrutura e forma semelhantes, elas possuem propriedades catalíticas distintas, apresentando valores de V_{max} e K_m significativamente diferentes (GOODSELL, 2008). A forma M, encontrada principalmente em músculos esqueléticos, favorece melhor a conversão de piruvato a lactato, sendo usada nos músculos que precisam realizar o exercício anaeróbico. Já a forma H converte melhor a reação inversa, de lactato para piruvato. Essa conversão é a principal forma do coração, que possui uma fonte constante de oxigênio para poder facilmente usar lactato como fonte de energia aeróbia (NELSON & COX, 2011; GOODSELL, 2008; STAMBAUGH & POST, 1965).

No *Protein Data Bank* (PDB) estão depositadas diversas estruturas cristalográficas de LDH como a de *Homo sapiens sapiens* (READ, 2001), a de *P. falciparum* (DUNN, 1996), a de *Bacillus stearothermophilus* (PIONTEK, 1990) e de *Squalus acanthias* (WHITE, 1976).

A enzima LDH necessita de um componente químico adicional, denominado coenzima, que agem como carreadores transitórios de átomos ou grupos funcionais específicos. A nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD) é uma coenzima que

participa de diversas reações de oxidorredução e é responsável pela transferência de íons hidretos (H^-). A Figura 4 mostra a estrutura do NAD composta por três partes: um anel nicotinamida – que contém o sítio no qual ocorrem as reações de oxidação e redução – um anel de adenina e dois grupos de açúcares fosfatados unidos. A forma da NAD oxidada é NAD^+ e na forma reduzida é NADH (CAMPBELL & FERRELL, 2008; NELSON & COX, 2011).

Figura 4 – Estrutura nicotinamida adenina dinucleótido



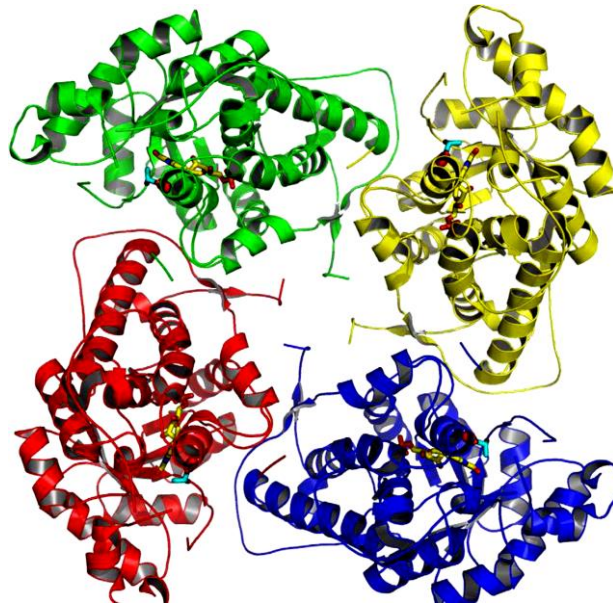
Fonte: Adaptado de CAMPBELL & FARRELL, 2007; CAMPBELL & FARRELL, 2008

As desidrogenases dependentes do NAD^+ vêm sendo utilizadas para análise de diversos analitos em amostras de alimentos (RAHMAN et al., 2009) e clínicas (PEREIRA et al., 2007; PIANO et al., 2010)

3.2.2 Lactato oxidase

Na classe das oxidorredutases, a lactato oxidase (LOX) na presença de oxigênio, catalisa a oxidação do lactato a piruvato e peróxido de hidrogênio. Sua estrutura forma um tetrâmero que pode ser visualizados na Figura 5 (FURUICHI et al., 2008)

Figura 5 – Representação do complexo tetramérico da LOX com cada monômero retratado em diferentes cores



Fonte: FURUICHI et al., 2008

No Protein Data Bank (PDB) estão depositadas algumas estruturas da LOX de *Aerococcus Viridans* (LEIROS et al., 2006; MORIMOTO et al., 2007; FURUICHI et al., 2007).

3.2.3 Imobilização enzimática

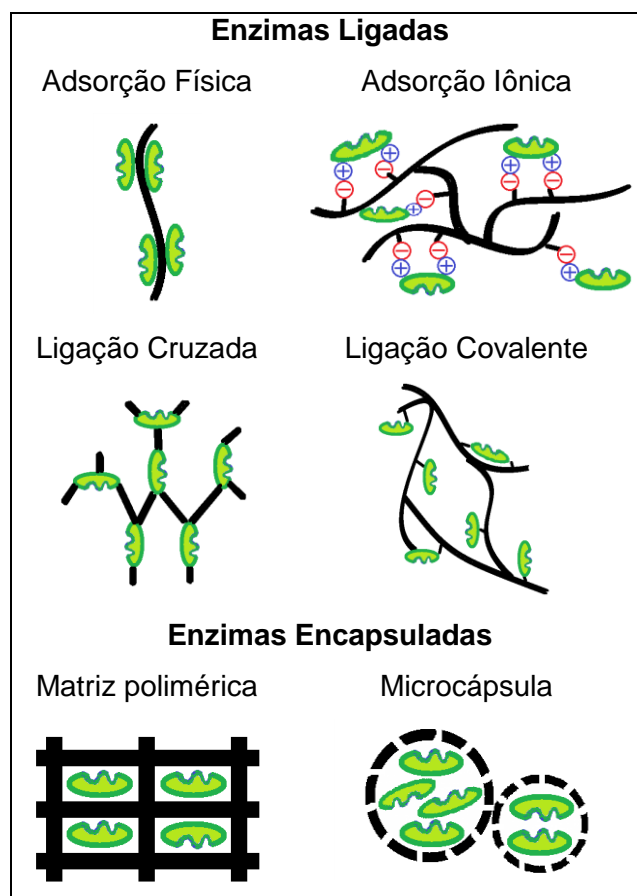
O termo imobilização é definido como movimentos não livres de enzimas ou células na parte aquosa de um sistema, devido a sua retenção dentro ou na superfície de um agente imobilizador, de maneira que sua atividade catalítica não seja afetada negativamente (TAMPION e TAMPION, 1988; CARDOSO, 2009). Dessa forma, as enzimas vêm sendo utilizadas em uma diversidade de biossensores, sendo elas imobilizadas na superfície de eletrodos.

A imobilização é uma ferramenta de grande importância, pois criado de forma eficiente pode melhorar diversas propriedades da enzima, como por exemplo, sua estabilidade, atividade, especificidade, seletividade e redução de interferentes (MATEO et al., 2007). Espera-se que a enzima imobilizada apresente atividade catalítica superior, e para isso, faz-se necessário que seu sítio ativo não seja modificado, mantendo sua estrutura nativa.

A utilização de enzimas livres, em reações bioquímicas, pode ser considerada uma desvantagem, pois esta aplicação é muitas vezes dispendiosa e normalmente a enzima em solução é utilizada uma única vez, tornando o seu descarte inviável economicamente.

A necessidade da reutilização de enzimas conduziu o estudo de diversos métodos para imobilização enzimática. Alguns métodos baseiam-se nas ligações físicas e/ou químicas entre a biomolécula e o suporte. Sua escolha dependerá do transdutor utilizado e o que promova a menor perda de atividade catalítica. Dentre os métodos, os mais utilizados são: adsorção física – através de interações hidrofóbicas e de van de Waals – e química – através de ligação covalente e iônica – imobilização por confinamento em matriz ou microcápsula cruzada, Figura 6 (CARDOSO, 2009).

Figura 6 – Principais métodos de imobilização de enzimas



Fonte: modificado de Cardoso (2009)

O procedimento de adsorção de um biocatalizador é um dos métodos mais antigo e fácil, podendo ser aplicado em enzimas isoladas. Neste método a enzima é imobilizada em suporte sólido por meio de forças de adsorção relativamente fracas,

tais como forças de Van der Waals, interações iônicas e ligação de hidrogênio. Uma das vantagens da imobilização por adsorção é a simplicidade do processo e como as forças de ligação são fracas e a conformação da enzima sofre pouca perturbação, tornando as perdas de atividade enzimática geralmente baixa. No entanto a enzima pode sofrer lixiviação durante o processo, ocasionando pequenas mudanças nos parâmetros de reação, como uma variação da concentração do substrato, do solvente, da temperatura, ou pH (FABER, 2011).

Na imobilização por adsorção iônica as cargas opostas presentes tanto na enzima quanto na superfície do suporte, une-as por meio de atrações eletrostáticas. Esse método é mais eficiente do que a adsorção física.

Na imobilização por ligação covalente, um resíduo de aminoácido está envolvido na ligação, levando a formação irreversível de uma ligação química estável entre a enzima e um suporte insolúvel em água, ou pela fixação em uma matriz ou pela formação de ligações cruzadas em uma matriz, que contém a enzimas e vários agentes bifuncionais. Nesse processo de imobilização diminui significativamente a lixiviação da enzima, mas pode ocasionar perda na atividade enzimática, devido a alterações na estrutura da enzima ou até mesmo acesso dificultado para o substrato interagir com o sítio ativo (DALLA-VECCHIA et al., 2004).

Os grupos funcionais da enzima que estão envolvidos na ligação covalente são nucleofílicos, por exemplo, o N-terminal e os grupos carboxila-, sulfidril-, hidroxila- e as funções fenólicas. O processo de imobilização covalente compreende duas etapas, primeiramente o suporte deve ser ativado com um grupo reativo, também chamado de espaçador e por fim a ligação com a enzima é estabelecida. Este tipo de imobilização é recomendado para enzimas isoladas, uma vez que as células viáveis geralmente não sobrevivem às drásticas condições reacionais requeridas para a formação de ligações covalentes (FABER, 2011).

Na imobilização por ligação cruzada pode ser formada tanto pela reticulação entre as enzimas ou até mesmo por outra proteína inativa, por exemplo, albuminas, resultando em agregados com estrutura tridimensional complexa (FABER, 2011). O glutaraldeído é um dos reagentes bifuncionais mais utilizados para esse tipo de imobilização (PEREIRA et al., 2007). Os grupos reativos envolvidos na reticulação das enzimas não são apenas grupos amino livres, mas também grupos sulfidril e hidroxil (FABER, 2011).

3.3 Nanomateriais

O Iniciativa Nacional de Nanotecnologia define a nanotecnologia como a ciência, engenharia e tecnologia realizada em nanoescala, que é de cerca de 1 a 100 nanômetros. E o estudo e aplicação de coisas extremamente pequenas provêm da nanociência e nanotecnologia que pode ser utilizada em todos os outros campos da ciência, tais como química, biologia, física, ciência dos materiais e engenharia (www.nano.gov). A nanociência vem sendo destacada como uma das mais importantes fronteiras para a pesquisa e o desenvolvimento da ciência moderna (MARTIN & KOHLI, 2002).

As nanopartículas (NPs) fazem parte de uma nova classe de materiais que possuem propriedades únicas. As NPs possuem uma diversidade de tamanho e formas, com distintas propriedades. Devido a essa variedade, um conceito geral é aplicado: as propriedades das NPs estão intimamente relacionadas ao seu tamanho em nanoescala e estrutura em escala atômica (KLABUNDE & RICHARDS, 2009). Já os nanocompósitos são materiais híbridos onde pelo menos um entre seus componentes possuem dimensões nanométricas. Ou seja, um dos componentes serve de matriz, na qual as partículas do segundo material se encontram dispersas. Um nanocompósito pode ser sintetizado a partir de componentes de natureza inorgânica/inorgânica, inorgânica/orgânica ou ainda orgânica/orgânica (ESTEVEES et al., 2004)

As nanopartículas podem gerar mudanças significativas nas propriedades da matriz, devido sua área superficial elevada. Essa alteração esta relacionada com a interação química específica entre as cargas e o polímero, podendo influenciar na dinâmica molecular do mesmo (ESTEVEES et al., 2004). Resultando em um nanocompósito com características únicas.

O desenvolvimento de diferentes nanopartículas e nanocompósitos vem trazer uma série de aplicações biotecnológicas e biomédicas (MARTIN & KOHLI, 2002).

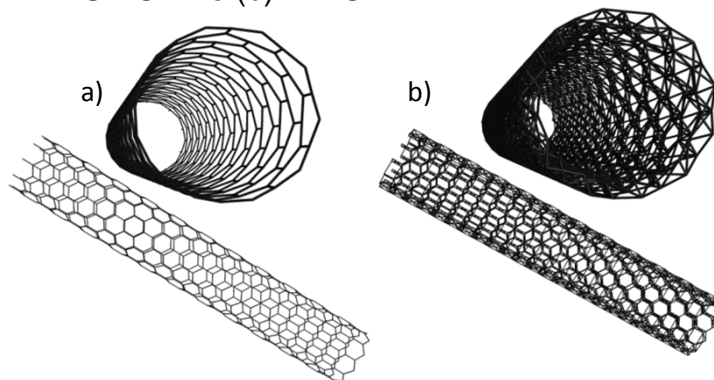
3.3.1 Nanotubos de carbono (NTC)

Eletrodos baseados em nanotubos de carbono (NTC) vêm sendo utilizado, por apresentar uma excelente eletrocatalise. O enrolamento de uma ou várias folhas

de grafeno – que possui arranjos hexagonais de carbono – originam pequenos cilindros ocos, com dimensões nanométricas, denominados NTC (ZARBIN, 2007; HERBST et al., 2004).

Tendo em vista sua estrutura, os NTC podem ser divididos dois grupos: os nanotubos de carbono de parede simples (SWCNT – *single-walled carbon nanotubes*) que podem ser visualizados como uma única folha de grafeno enrolada sobre si, para formar um tubo cilíndrico com diâmetro variando entre 1-5 nm, (Figura 7a) e o segundo grupo, formado pelos nanotubos de carbono de parede múltiplas (MWCNT – *multi-walled carbon nanotubes*) constituído por uma série de camadas concêntricas de grafeno, separadas entre si por uma distância de aproximadamente 0,3 nm, totalizando normalmente um diâmetro variando de 10 a 50 nm, (Figura 7b) (ZARBIN, 2007; HERBST et al., 2004; KLABUNDE & RICHARDS, 2009).

Figura 7 – Representação esquemática das estruturas dos nanotubos de carbono (a) SWCNT e (b) MWCNT



Fonte: Autora, 2013 a partir do Pymol

Os NTC apresentam diversas propriedades interessantes, como alta condutividade, excelente resistência e rigidez, é quimicamente inerte e por ser um material na escala nano, possui uma área superficial muito grande (~10-20 m²/g para os MWCNT). Essas propriedades únicas são devido à sua estrutura distinta (SWCNT ou MWCNT) que é composto por ligações C-C, mais estreitamente relacionados com as de grafite (ZARBIN, 2007; FENG et al., 2008).

Devidos às suas propriedades eletrônicas e estruturais, eletrodos baseados em NTC abrem o caminho para o estudo direto de proteínas através da eletroquímica. Visto que, enzimas e proteínas redox possuem um sítio ativo acobertado numa cadeia polipeptídica hidrofóbica, portanto seus centros redox estão

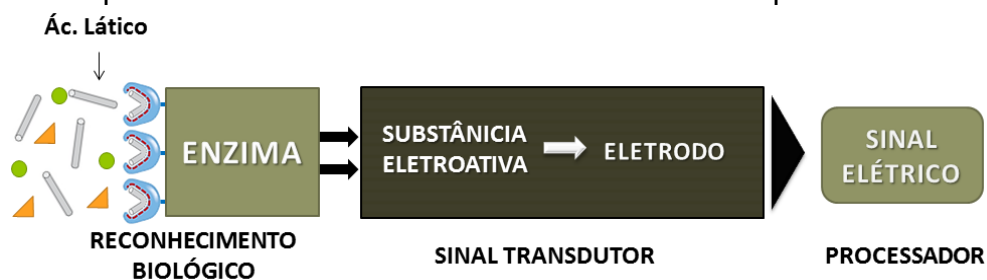
eletricamente isolados e inacessíveis para a superfície do eletrodo, tornando difícil o estudo eletroquímico direto de enzimas e proteínas, a partir de eletrodos convencionais, como carbono vítreo, ouro e platina (FENG et al., 2008).

3.4 Biossensor

Os biossensores eletroquímicos fazem parte de uma subclasse dos sensores químicos que combinam a sensibilidade, indicado pelos baixos limites de detecção, e elevada especificidade dos processos de reconhecimento biológico (RONKAINEN et al., 2010).

Um biossensor pode ser definido como um sensor que combina um elemento de reconhecimento biológico sensível ao analítico de interesse – proteínas, enzimas, anticorpos, ácidos nucleicos, células, tecidos ou receptores – que reagem seletivamente com este analito produzindo um sinal elétrico proporcional a concentração do analito que está sendo estudado; um transdutor ou dispositivo detector que produz um sinal e um processador que coleta, amplifica e exibe o sinal, Figura 8 (RONKAINEN et al., 2010; SU et al., 2010; ROSATTO et al., 2001; TURNER et al., 1988).

Figura 8 – Esquema de um biossensor com transdutor eletroquímico



Fonte: Autora, 2013

Os biossensores eletroquímicos apresentam diversas vantagens, pois são economicamente mais viáveis do que outros métodos, possui uma resposta rápida e a possibilidade de automação (BRETT, 1993). Seu potencial de aplicação é amplo podendo ser utilizado no monitoramento de vários analitos.

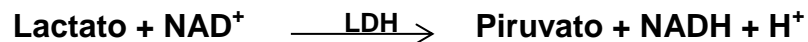
Baixo custo e facilidade de uso são determinantes no desenvolvimento de versões comercializáveis para o público em geral. Na prática, eletrodos sólidos são os mais adequados para fins comerciais. Biossensores enzimáticos para a

determinação de ácido láctico foram desenvolvidos suportados em diversos materiais como grafite, ouro, etc (HERRERO et al., 2004; SUMAN et al., 2005; PARRA et al., 2006; WU et al., 2005).

Um monitoramento eficiente e rápido de ácido láctico é fundamentalmente importante em análises clínicas, em processos biotecnológicos e para a indústria alimentícia. Nos últimos anos diversos biossensores enzimáticos amperométricos foram apresentados na literatura suportados principalmente em eletrodos de grafite (MULCHANDANI et al., 1995; NANSOO et al., 1996; HERRERO et al., 2004; SHU & WU, 2001).

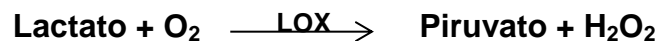
Os biossensores para determinação de ácido láctico utilizam-se principalmente as enzimas lactato desidrogenase (LI et al., 2008; PEREIRA et al., 2007; LIMA et al., 1998; CAI et al., 2010; PIANO et al., 2010) e a lactato oxidase (MONOSÍK et al., 2012; MARTELLI et al., 2001; CHUN-XIU et al., 2009; HUANG et al., 2008; ZANINI et al., 2011; ROMERO et al., 2008; SUMAN et al., 2005; PARRA et al., 2006)

O biossensor baseado na enzima lactato desidrogenase catalisa a oxidação do lactato em piruvato em presença da forma oxidada da coenzima NAD⁺.



Nesta reação catalítica o NADH reduzido pode ser detectado amperometricamente (PEREIRA et al., 2007).

Já no biossensor que utiliza a lactato oxidase o lactato é convertido a piruvato e peróxido de hidrogênio,



e neste caso o H₂O₂ é detectado amperometricamente (ROMERO et al., 2008; PEREIRA et al., 2007).

3.5 Acoplamento molecular

Acoplamento molecular ou *docking* é um procedimento computacional que tenta prever as ligações de um ligante com seu alvo macromolecular (receptor), possibilitando assim prever se ligantes ainda não testados experimentalmente podem interagir com a macromolécula. (TROTT & OLSON, 2010; PACHECO, 2009).

A complexidade do problema de *docking* requer métodos computacionais com potencial para investigar efetivamente um grande número de soluções possíveis, até que a solução “ótima” seja encontrada (MORGON & COUTINHO, 2007).

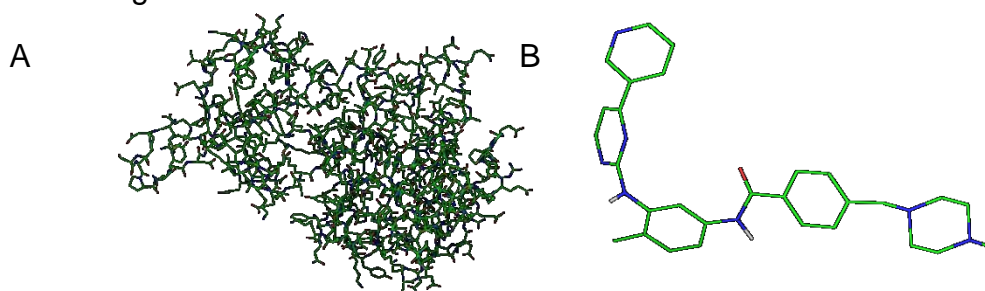
A partir do início da década de 80, os primeiros algoritmos de *docking* começaram a ser desenvolvidos, portanto vários métodos têm sido implementados, tornando uma área da pesquisa bastante ativa. Os métodos de *docking* se diferenciam, principalmente em relação ao grau de flexibilidade das moléculas biológicas interagentes e nos métodos de otimização empregados na investigação da hipersuperfície de energia (MORGON & COUTINHO, 2007).

3.5.1 Autodokvina

Programa de acesso livre para instituições acadêmicas e é utilizado para fazer acoplamento molecular o AutoDockVina foi projetado e implementado pelo Dr. OlegTrott no Laboratório de Gráficos Molecular The ScrippsResearchInstitute.

No ensaio de *docking* utiliza-se um receptor e um ligante (Figura 9), que podem ser encontrados a partir do Protein Data Bank (PDB) <<http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>> ou até mesmo construídas utilizando programas.

Figura 9 – Estruturas no formato PDB a partir do Protein Data Bank a) receptor e b) ligante



Fonte: Autora, 2013 a partir do Pymol

O AutoDockVina combina algumas vantagens de funções potenciais baseados em conhecimento e pontuação empíricas, ou seja ele extrai informação empírica de ambas as preferências conformacionais do complexo receptor-ligante e a partir de medições experimentais de afinidade (TROTT & OLSON, 2010).

As funções empíricas para o cálculo de energia livre de ligação utilizam uma função cujos coeficientes foram pré-otimizados tomando-se como base resultados

experimentais de estruturas receptor-ligante e suas respectivas constante de dissociação. Estas funções reproduzem dados experimentais associados à energia livre de ligação. No programa AutoDock possui termos individuais que incluem efeitos de solvatação e estimam a perda dos graus de liberdade conformacionais do ligante na ligação com o receptor (MORGON & COUTINHO, 2007)

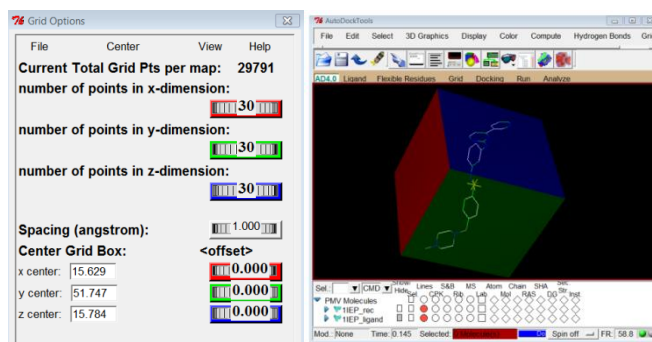
Existem três aplicações importantes das funções de pontuação em acoplamento molecular, em primeiro é a determinação do modo e do local de ligação entre um ligante e uma proteína (receptor). Com base em uma proteína alvo, o acoplamento molecular pode gerar centenas de milhares de orientações/conformações de supostos ligantes ligados no sítio ativo em torno da proteína e a função de pontuação é usada para classificar essas orientações/conformações dos ligantes avaliando as ligações de cada um dos supostos complexos (HUANG et al., 2010).

Já as funções baseadas em conhecimento procuram utilizar as informações derivadas do número cada vez maior de estruturas determinadas experimentalmente, que descrevem a geometria de interação receptor-ligante. Obtêm-se, a partir de uma análise estatística das geometrias de interação átomo-átomo, “pseudo-potenciais” relativamente simples, que descrevem as geometrias preferenciais de interação receptor-ligante. Bem como os métodos empíricos, essas funções tentam obter implicitamente efeitos da ligação que são difíceis de modelar explicitamente entre o receptor e ligante (MORGON & COUTINHO, 2007).

Vina foi projetado para ser compatível com o formato de arquivo de estrutura: PDBQT, que pode ser visto como uma extensão do formato de arquivo PDB. Isto torna mais fácil de usar o Vina com o software auxiliar existente desenvolvido para o AutoDock, como o AutoDock Tools para o preparo desses arquivos, escolha do espaço de busca e visualização dos resultados (TROTT & OLSON, 2010).

Para realização do acoplamento molecular define-se um espaço tridimensional de procura (Grid) onde o ligante poderá ligar-se com a estrutura da proteína (Figura 10). Neste local deve envolver a zona catalítica se existir, mas não deve ser grande demais, pois o ligante talvez não encontre as zonas de ligação.

Figura 10 – Tela do tridimensional de procura (Grid) do software Vina

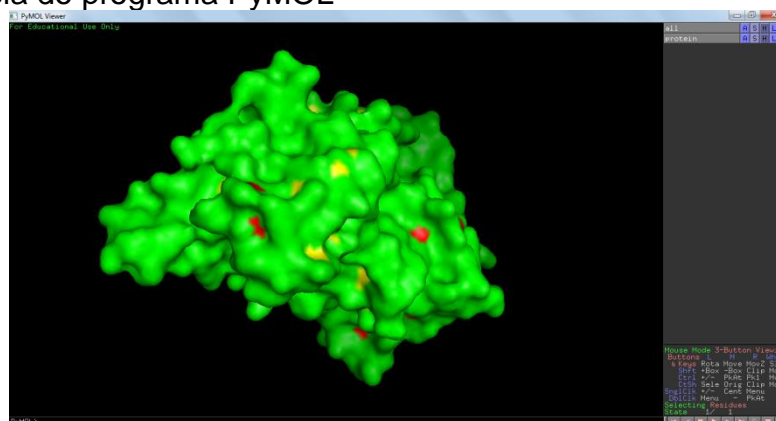


Fonte: Autora, 2013 a partir do Pymol

3.5.2 Pymol

O PyMOL é uma ferramenta para visualização molecular em estruturas 3D até o nível atômico, (Figura 11).

Figura 11 – Tela do programa PyMOL



Fonte: Autora, 2013 a partir do Pymol

O programa PyMOL foi desenvolvido por Warren Lyford DeLano e comercializado por DeLanoScientific LLC. Este software é disponível para uso educacional e pode ser baixado a partir de <<http://www.pymol.org>>.

3.6 Métodos voltamétricos

Os métodos eletroanalíticos abrangem um conjunto de técnicas, tais como as voltamétricas que é baseada na medida da corrente em uma célula eletroquímica, na qual a velocidade de oxidação ou redução do analito é limitada pela velocidade

de transferência de massa do analito para a superfície do eletrodo. Resultando em voltamograma de corrente em função do potencial aplicado (SKOOG et al., 2008).

A célula eletroquímica normalmente é composta por três eletrodos que se apresentam imersos em uma solução contendo um eletrólito em excesso – que não se reduz ou oxida na faixa de potencial utilizado na medida – e o analito. Os três eletrodos dividem-se em: eletrodo de trabalho que contem dimensões pequenas para facilitar sua polarização e cujo potencial varia de forma controlada, a fim de que nele desenvolvam-se as reações eletroquímicas desejadas; eletrodo de referência que deve manter um potencial fixo durante o experimento e o eletrodo auxiliar que é responsável pela condução de corrente entre a fonte geradora de sinal e o eletrodo de trabalho (KILLNER, 2007)

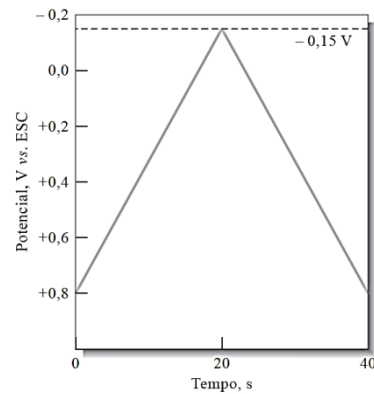
Os métodos voltamétricos vêm sendo utilizadas em diversas áreas do conhecimento como medicina, bioquímica, biologia molecular, química ambiental e físico-química (BRAININA, 1987; SOUZA et al., 2003). Pois uma de suas vantagens é a possibilidade de utilizar amostras sem a necessidade de tratamentos prévios, além disso, apresenta baixos limites de detecção semelhantes a técnicas tradicionais utilizadas na análise de compostos orgânicos e inorgânicos em matrizes ambientais, biológicas e em alimentos (SOUZA et al., 2003).

3.6.1 Voltametria cíclica

A voltametria cíclica (VC) é uma técnica eletroanalítica utilizada com freqüência na análise qualitativa. Nela encontra ampla aplicabilidade no estudo de reações redox, na detecção de intermediários de reação e na observação e no acompanhamento de reações envolvendo produtos formados nos eletrodos (SKOOG et al., 2008).

Para a corrente ser medida na VC, um pequeno eletrodo estacionário em uma solução mantida em repouso é excitada na forma de uma onda triangular, como mostra na Figura 12. Esta onda triangular produz a varredura no sentido direto (de +0,8 V a -0,15 V) e depois no sentido inverso (-0,15 V a +0,8 V). Em ambas as direções à velocidade de varredura se mantiveram constante. Um experimento envolvendo VC pode empregar um ciclo inteiro, um ciclo parcial ou ainda vários ciclos. (SKOOG et al., 2008).

Figura 12 – Sinal de excitação em voltametria cíclica



Fonte: Skoog, 2008

3.6.2 Voltametria de pulso diferenciado

Na voltametria de pulso diferenciado, pulsos de igual amplitude são aplicados sobre uma rampa linear de potencial, e a corrente é medida antes do pulso ser aplicado e no final do pulso. Estas correntes são subtraídas, já que a primeira é a contribuição da corrente capacitiva e a segunda é a contribuição da corrente faradaica e que contra o potencial da rampa linear, gerando um voltamograma de pulso diferenciado, com a forma de uma curva gaussiana (SOUZA et al., 2003).

4 METODOLOGIA

4.1 Estudos de acoplamento molecular

4.1.1 Obtenção das sequências

Os arquivos estruturais das enzimas lactato desidrogenase e oxidase, no formato PDB, foram obtidos através do download direto do *Protein Data Bank* <<http://www.pdb.org/pdb/home/home.do>> a partir da pesquisa utilizando os termos “LactateDehydrogenase” e “Lactate Oxidase”. Os arquivos estruturais dos MWCNT e SWCNT foram criados a partir de programas de engenharia computacional.

4.1.2 Interações entre a enzima e NTC

A partir dos arquivos obtidos, estudou-se a interação de cada enzima com os diferentes NTC, utilizando o programa autodockVina (*molecular docking and virtual screening program*) e visualizados no programa PyMOL (Molecular Graphics System).

4.2 Preparo da Limpeza Padrão dos Eletrodos de Carbono Vítreo

O eletrodo de carbono vítreo foi submetido à limpeza mecânica de polimento com alumina e lavagem com água milliQ. Posteriormente os eletrodos foram levados ao ultrassom por 30 s em etanol P.A. para retirar partículas residuais.

Para comprovar a limpeza do eletrodo foi utilizado a técnica de VC. Para isto utilizou-se uma faixa de -0,3 a 0,6 V e velocidade de 50 mV/s em solução de ferricianeto de potássio ($K_3[Fe(CN)_6]$)/ ferrocianeto de potássio ($K_4[Fe(CN)_6].3H_2O$) $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, para verificar a área eletroativa dos eletrodos.

4.2.1 Preparo da dispersão dos NTC

4.2.1.1 NTC

Pesou-se 1 mg de MWCNT e dispersou em um eppendorf contendo 1 mL de N,N-dimetilformamida (DMF).

4.2.1.2 NTC+nAuSiO₂

Pesou-se 1 mg de MWCNT e 0,2 mg de nAuSiO₂ e dispersou em um eppendorf contendo 1 mL de N,N-dimetilformamida (DMF).

4.2.1.3 NTC-NH₂

Pesou-se 1 mg de MWCNT-NH₂ e dispersou em um eppendorf contendo 1 mL de álcool etílico e 10 µL de nafion.

4.2.1.4 NTC-NH₂+nAuSiO₂

Pesou-se 1 mg de MWCNT-NH₂ e 0,2 mg de nAu-SiO₂ e dispersou em um eppendorf contendo 1 mL de álcool etílico e nafion, ambos permaneceram no ultrassom por 2 horas.

4.3 Síntese da nanosílica

4.3.1 Síntese de nanopartículas de ouro

As nanopartículas de ouro em sílica (nAuSiO₂) foram sintetizadas segundo Oliveira (2011) e fornecida pelo grupo de pesquisa do laboratório de Catálise e Reatividade Química do Instituto de Química e Biotecnologia da Universidade de Alagoas.

4.4 Preparo dos reagentes enzimáticos e soluções

O reagente enzimático da enzima lactato desidrogenase foi preparada a partir da mistura de 160 μL de enzima LDH(LDH >24 KU/L)e 40 μL coenzima NAD^+ ($\text{NAD} > 4 \text{ mmol/L}$) obtidos do kit enzimático Lactato – K084 (401 kB) – Bioclin[®] e para a lactato oxidase foi utilizado diretamente o reagente enzimático do próprio kit Lactato (LOX> 6.000 U/L)– Biotécnica[®].

O tampão fosfato (TF) pH 7 foi preparado a partir de sais KH_2PO_4 e Na_2HPO_4 (0,1 mol/L).

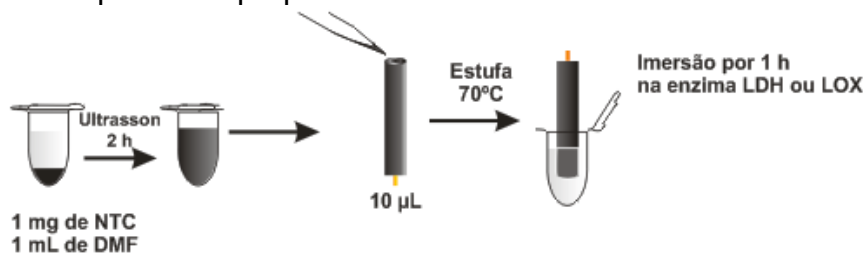
A solução padrão (1×10^{-3} mol/L) de ácido láctico foi preparada pela diluição do ácido láctico de concentração 11,38 mol/L em tampão fosfato pH 7.

4.5 Preparo do biossensor no eletrodo de carbono vítreo

4.5.1 Preparo do biossensor com NTC

O preparo do biossensor com NTC está apresentado na Figura 13 na qual se adicionou 1 μL de NTC disperso, preparado segundo o item 4.2.1.1, e logo após permaneceu na estufa por 5 minutos a 70°C , esse procedimento foi repetido 10 vezes até totalizar 10 μL na superfície do eletrodo de carbono vítreo, depois o eletrodo foi lavado cuidadosamente com água milliQ e depois permaneceu inseridos em um eppendorf contendo 200 μL de solução de reagente enzimático de lactato desidrogenase ou lactato oxidase (Item 4.4), por 1 hora sob refrigeração, com temperatura de aproximadamente $4^\circ\text{C} \pm 1$.

Figura 13 – Esquema de preparo do biossensor de NTC

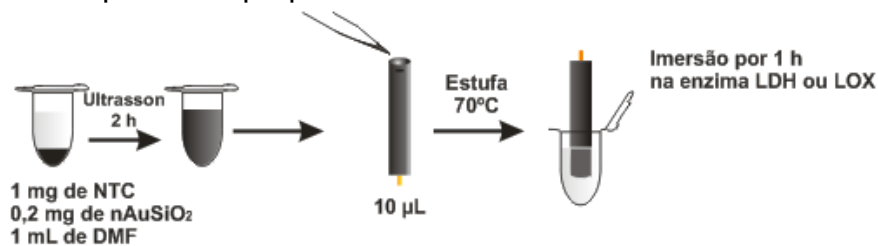


Fonte: Autora, 2013

4.5.2 Preparo do biossensor com NTC+nAuSiO₂

Para o preparo do biossensor de NTC+nAuSiO₂ está apresentado na Figura 14 seguiu o mesmo procedimento do item 4.5.1, porém a dispersão utilizada foi a preparada com nAuSiO no item 4.2.1.2.

Figura 14 – Esquema de preparo do biossensor de NTC+nAuSiO₂

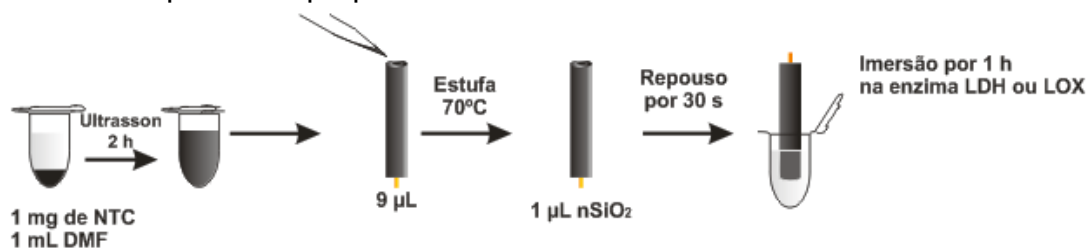


Fonte: Autora, 2013

4.5.3 Preparo do biossensor com NTC+nSiO₂

O preparo do biossensor com NTC+nSiO₂ está apresentado na Figura 15 na qual se adicionou 1 µL de NTC disperso, preparado segundo o item 4.2.1.1, e logo após permaneceu na estufa por 5 minutos a 70°C, esse procedimento foi repetido 10 vezes até totalizar 9 µL na superfície do eletrodo de carbono vítreo e por último foi adicionado 1 µL de nSiO₂, depois o eletrodo foi lavado cuidadosamente com água milliQ e depois permaneceu inseridos em um eppendorf contendo 200 µL de solução de reagente enzimático de lactato desidrogenase ou lactato oxidase, por 1 hora sob refrigeração, com temperatura de aproximadamente 4°C±1.

Figura 15 – Esquema de preparo do biossensor de NTC+nSiO₂

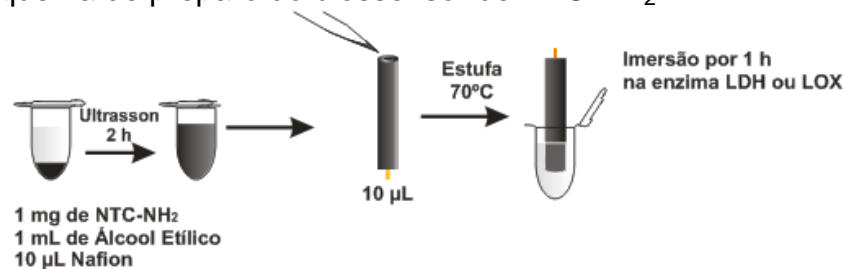


Fonte: Autora, 2013

4.5.4 Preparo do biossensor com NTC-NH₂

Para o preparo do biossensor com NTC-NH₂ (Figura 16) adicionou 1 µL de NTC-NH₂ disperso, preparado segundo o item 4.2.1.3, e logo após permaneceu na estufa por 2 minutos a 70°C, esse procedimento foi repetido 10 vezes até totalizar 10 µL na superfície do eletrodo de carbono vítreo, depois o eletrodo foi lavado cuidadosamente com água milliQ e depois permaneceu inseridos em um eppendorf contendo 200 µL de solução de reagente enzimático de lactato desidrogenase ou lactato oxidase (Item 4.4), por 1 hora sob refrigeração, com temperatura de aproximadamente 4°C±1.

Figura 16 – Esquema de preparo do biossensor de NTC-NH₂

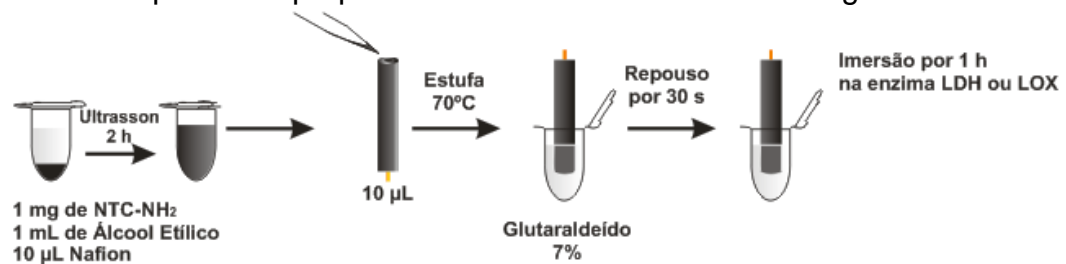


Fonte: Autora, 2013

4.5.5 Preparo do biossensor com NTC-NH₂ + glutaraldeído

Para o preparo do biossensor de NTC-NH₂ + glutaraldeído está apresentado na Figura 17a dispersão utilizada foi a preparada com NTC-NH₂ no item 4.2.1.3.e logo após permaneceu na estufa por 2 minutos a 70°C, esse procedimento foi repetido 10 vezes até totalizar 10 µL na superfície do eletrodo de carbono vítreo, depois o eletrodo foi lavado cuidadosamente com água milliQ e depois permaneceu inseridos em um eppendorf contendo 200 µL de Glutaraldeido 7% (preparado a partir da diluição, em água Milli-Q[®], de solução de glutaraldeído a 50%).por 30 segundos e lavado cuidadosamente com água milliQ e inseridos em um eppendorf contendo 200 µL solução de reagente enzimático de lactato desidrogenase ou lactato oxidase (Item 4.4), por 1 hora sob refrigeração, com temperatura de aproximadamente 4°C±1.

Figura 17 – Esquema de preparo do biossensor de NTC-NH₂ + glutaraldeído

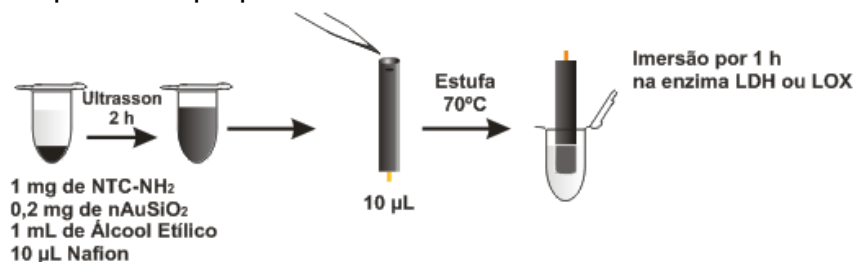


Fonte: Autora, 2013

4.5.6 Preparo do biossensor com NTC-NH₂+nAuSiO₂

A preparação do biossensor de NTC-NH₂+nAuSiO₂ está apresentado na Figura 18 onde seguiu o mesmo procedimento do item 4.5.4, porém a dispersão utilizada foi a preparada com NTC-NH₂+nAuSiO₂(item 4.2.1.4)

Figura 18 – Esquema de preparo do biossensor de NTC-NH₂+nAuSiO₂

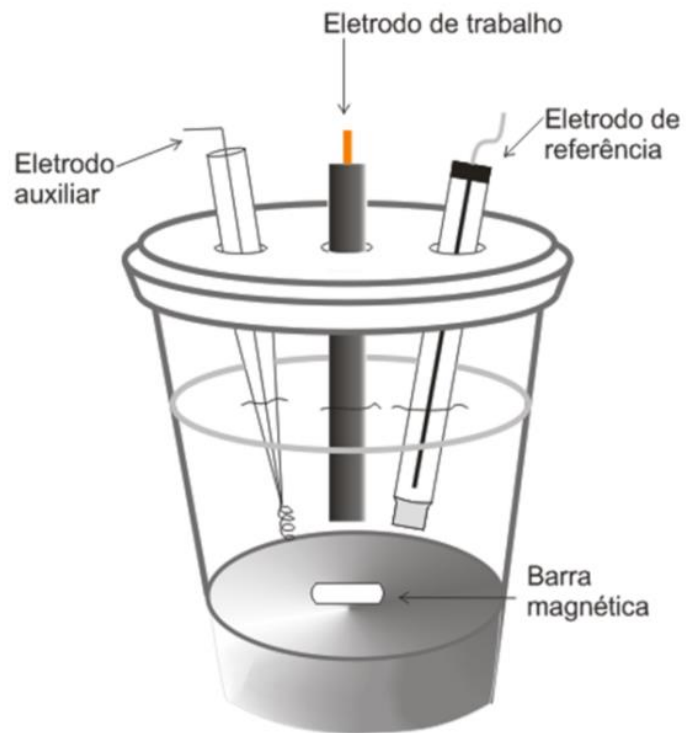


Fonte: Autora, 2013

4.6 Estudos eletroquímicos

Os estudos eletroquímicos do biossensor foram realizados utilizando as técnicas de voltametria cíclica (VC) e voltametria de pulso diferencial (VPD) em um sistema com três eletrodos, Figura 19: eletrodo de carbono vítreo modificado, como eletrodo de trabalho, platina como eletrodo auxiliar e Ag|AgCl|Cl⁻ (saturado) como eletrodo de referência. O experimento foi realizado em solução de tampão fosfato (pH 7,0) em temperatura ambiente. As medidas eletroquímicas foram realizadas em PGSTAT (AUT73222) da Autolab® e o pH foi medido em pHmetro MARCONI MAPA200. Os dados foram tratados através do programa OriginPro 8.

Figura 19 – Sistema com os três eletrodos para análises eletroquímicas



Fonte: Autora, 2013

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Estudo de acoplamento molecular

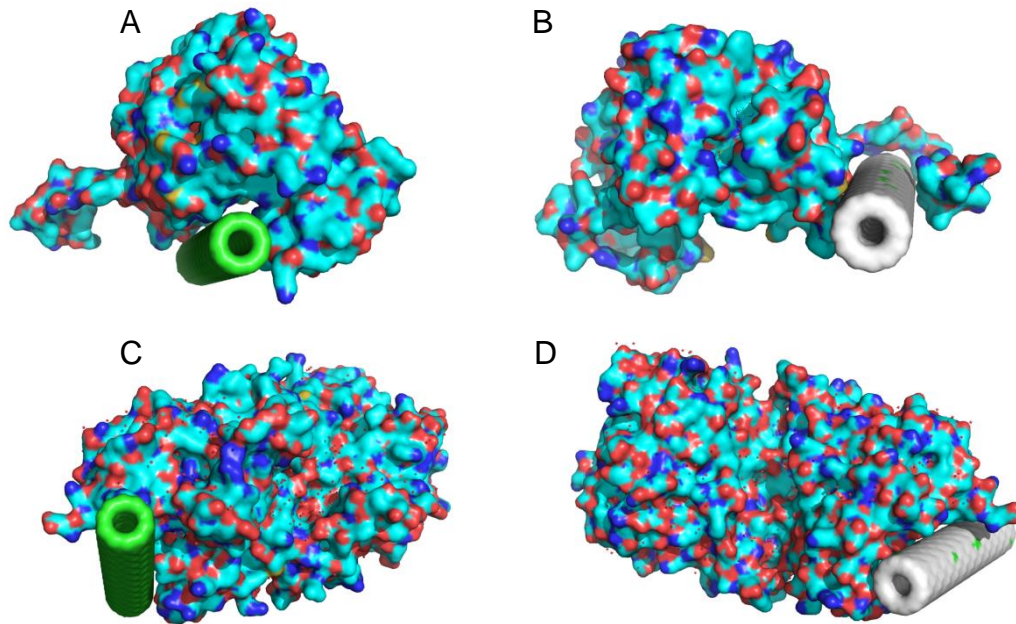
Através do download direto do Protein Data Bank, foram utilizados os arquivos, no formato PDB, da lactato desidrogenase (3LDH) e oxidase (2ZFA) e os resultados obtidos através do acoplamento molecular desses arquivos utilizados como receptor e como ligante os nanotubos de carbono (SWNT e MWNT), estão expressos na Tabela 1:

Tabela 1 – Resultados do acoplamento molecular entre os receptores 3LDH e 2ZFA e os ligantes SWNT e MWNT.

Enzima NTC	Afinidade (kcal/mol)	Tempo
2ZFA + SWNT	-21,8	1h 50min
2ZFA + MWNT	-37,1	18h 20min
3LDH + SWNT	-20,7	2h 30min
3LDH + MWNT	-34,9	15 horas

Podemos observar através da tabela acima, que tanto a lactato desidrogenase quanto a oxidase, tem afinidade com os nanotubos de carbono (Figura 20), principalmente o de paredes múltiplas (MWNT), apresentando as maiores afinidades (-37,1 e -34,9 kcal/mol) e maiores tempos de acoplamento, respectivamente. Enquanto que os de paredes simples (SWNT) apresentaram valores menores iguais a -21,8 e -20,7 kcal/mol, respectivamente e um menor tempo de acoplamento. Entre eles, a lactato oxidase interagindo com os nanotubos de paredes múltiplas (2ZFA + MWNT) foi o que obteve maior afinidade (-37,1 kcal/mol), comprovando que o MWNT é um ótimo material para imobilizar as enzimas estudadas.

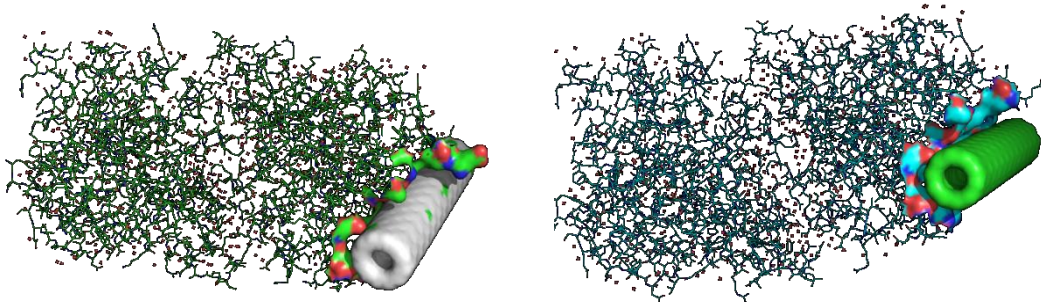
Figura 20 – Estrutura da lactato desidrogenase interagindo comSWNT (a) e MWNT (b)e lactato oxidase interagindo com SWNT (c) e MWNT (d)



Fonte: Autora, 2013

Os nanotubos de carbono de paredes múltiplas interagiu próximo aos resíduos de aminoácidos de ALA-217, ASN-39, ASP-156, GLN-153, GLU-160, GLY-36, HIS-35, LEU-99, LYS-104, SER-125, THR-128, TYR-124, TYR-40, TYR-8, VAL-177 da lactato oxidase. Já para os nanotubos de carbono de paredes simples os resíduos foram ALA-217, ALA-96, ASP-156, GLN-153, GLU-160, GLY-126, GLY-36, HIS-35, ILE-157, LEU-99, PHE-, 29, SER-125, SER-218, THR-128, TYR-124,,TYR-40, TYR-8, VAL-177, Figura 21.

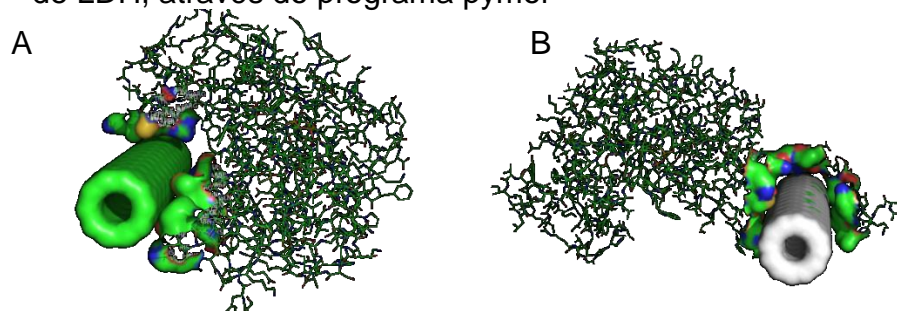
Figura 21– Visualização das interações do MWNT e SWNT com os resíduos de OXI, através do programa pymol



Fonte: Autora, 2013

Já para a lactato desidrogenase, os nanotubos de carbono de paredes múltiplas ficou mais próximo dos resíduos de aminoácidos de ALA-76, ARG-18, GLN-15, HIS-68, HIS-74, ILE-8, LEU-11, LEU-7, LEU-71, LYS-4, LYS-60, LYS-77, MET-64, PRO-17, SER-70, THR-13 como mostra na Figura 22a. E os nanotubos de carbono de paredes simples os resíduos foram ALA-209, ARG-173, ARG-267, ASP-256, CYS-185, HIS-269, HIS-74, ILE-188, LEU-186, LEU-265, LYS-210, LYS-263, LYS-43, MET-42, PHE-72, TRP-190, TRP-207, Figura 22b.

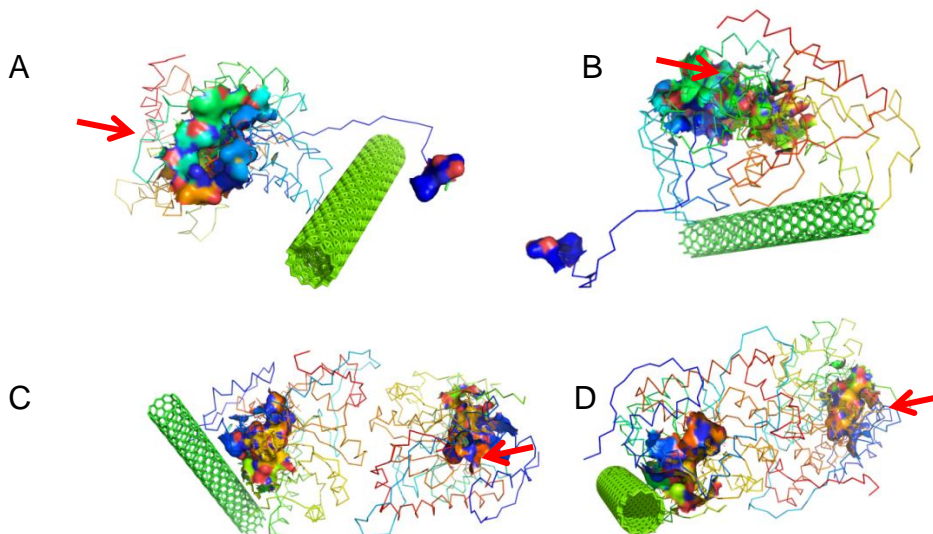
Figura 22 – Visualização das interações do SWNT(a) e MWNT(b) com os resíduos de LDH, através do programa pymol



Fonte: Autora, 2013

Já com relação aos sítios ativos das enzimas, podemos observar na Figura 23 que para ambas interações, os sítios ficaram livres para catálise, possibilitando a utilização de nanotubos de carbono como material suporte para imobilização das enzimas lactato desidrogenase e oxidase.

Figura 23 – Sítios ativos das enzimas lactato desidrogenase interagindo com SWNT (a) e MWNT (b) e lactato oxidase interagindo com SWNT (c) e MWNT (d)



Fonte: Autora, 2013

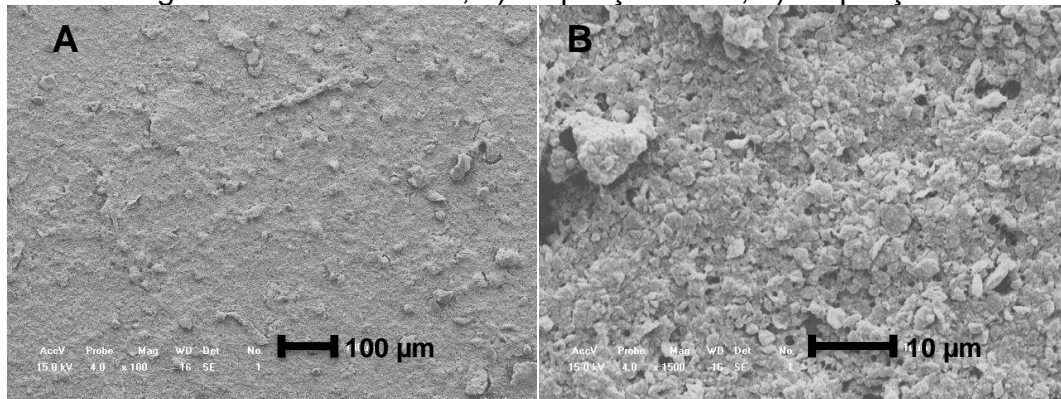
5.2 Microscopia eletrônica de varredura

A morfologia dos materiais suportes utilizados na elaboração dos biossensores foi obtida por microscopia eletrônica de varredura (MEV).

5.2.1 NTC como material suporte

Pode-se observar na Figura 24 que a superfície, apenas com NTC na resolução de 100x e 1000x, apresenta-se porosa, com irregularidade e formação de aglomerados com distintos tamanhos (Figura 24a).

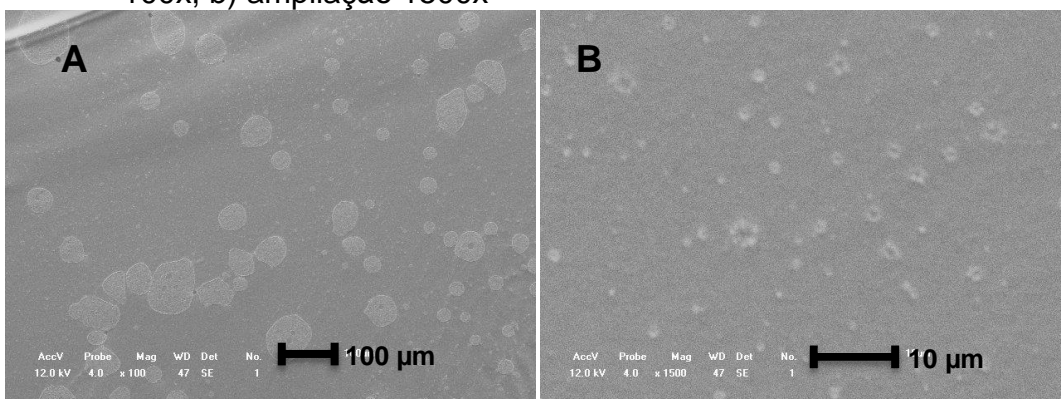
Figura 24 – Imagem de MEV de NTC, a) ampliação 100x; b) ampliação 1000x



Após a imobilização da enzima lactato desidrogenase na superfície do NTC, é possível observar na imagem com resolução de 100x e 1500x,

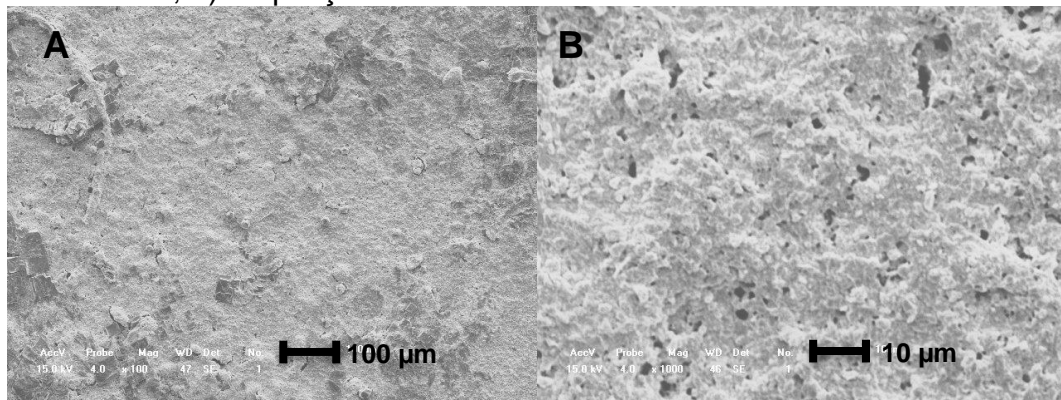
Figura 25a, mudança morfológica na superfície, a qual foi recoberta com a enzima, apresentando-se lisa e homogênea.

Figura 25 – Imagem de MEV da enzima LDH imobilizada em NTC, a) ampliação 100x; b) ampliação 1500x



Já na Figura 26a imobilização da enzima lactato oxidase no NTC, na resolução de 100x e 1000x observa-se uma melhor aderência à superfície do NTC, apesar da enzima ter aderido a esta superfície, não houve formação de uma superfície lisa. No entanto, as mudanças morfológicas tornaram essa superfície mais homogênea e mais organizada comparado com a superfície do NTC sem a enzima.

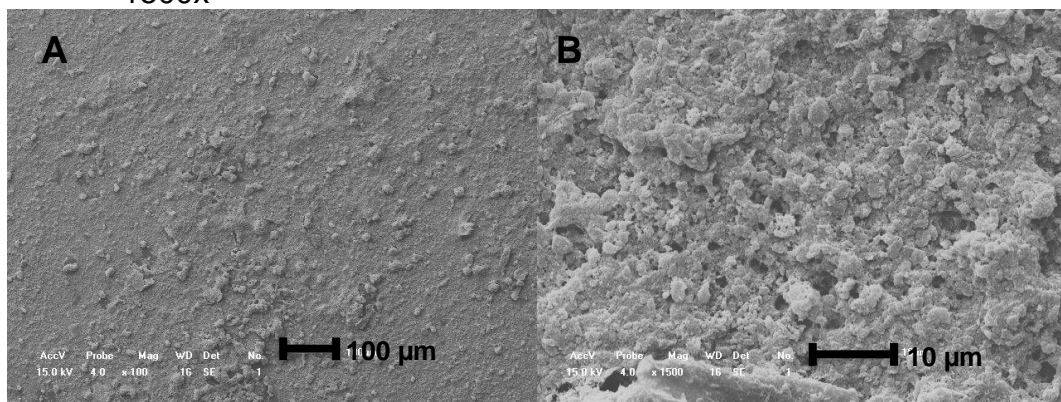
Figura 26 – Imagem de MEV da enzima LOX imobilizada em NTC , a) ampliação 100x; b) ampliação 1000x



5.2.2 NTC+nAuSiO₂ como material suporte

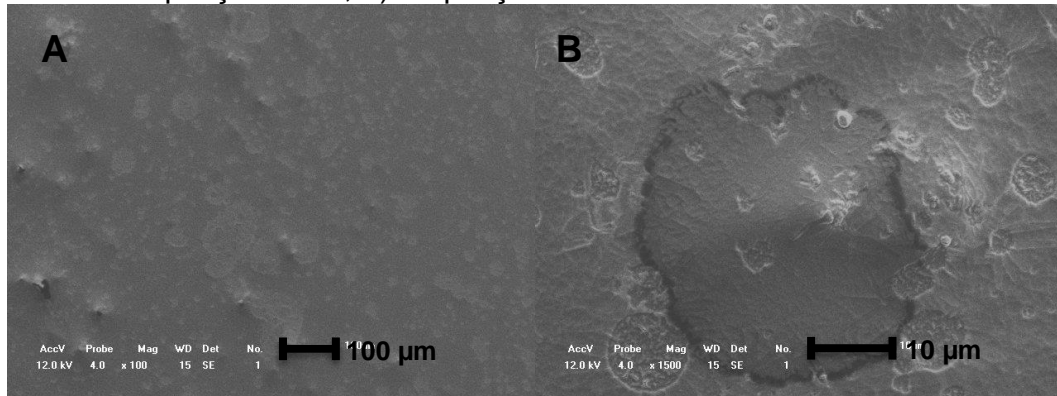
A superfície com o NTC+nAuSiO₂, na resolução de 100x e 1500x, apresenta-se porosa e com irregularidades, como de aglomerados de diferentes tamanhos (Figura 27).

Figura 27 – Imagem de MEV do NTC+nAuSiO₂, a) ampliação 100x; b) ampliação 1500x



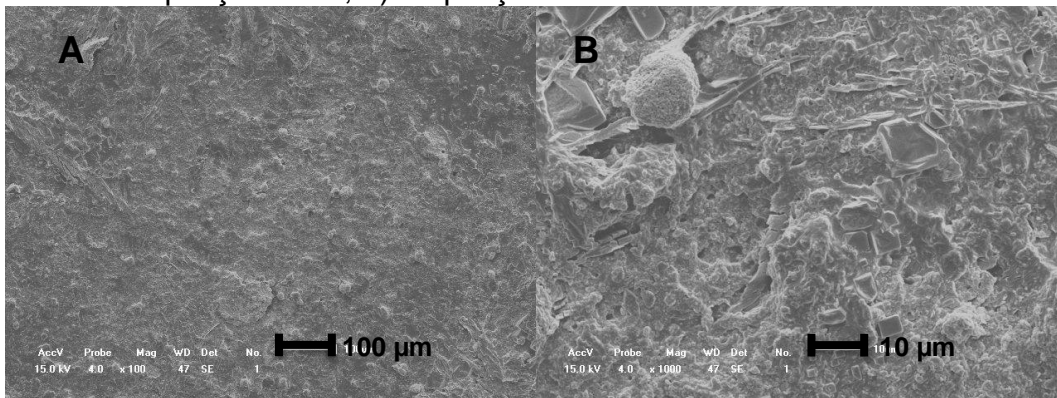
Após a imobilização da enzima lactato desidrogenase, observa-se mudança morfológica na superfície do NTCnAuSiO₂, na resolução de 100x e 1500x, tornando a superfície mais lisa e uniforme (Figura 28).

Figura 28 – Imagem de MEV da enzima LDH imobilizada em NTC+nAuSiO₂, a) ampliação 100x; b) ampliação 1500x.



No entanto na Figura 29a enzima lactato oxidase aderiu à superfície do NTCnAuSiO₂, na resolução de 100x e 1000x, apesar de não deixar a superfície lisa, deixou a superfície mais organizada, pois diminui a porosidade do NTCnAuSiO₂ comparado com ele sem a enzima.

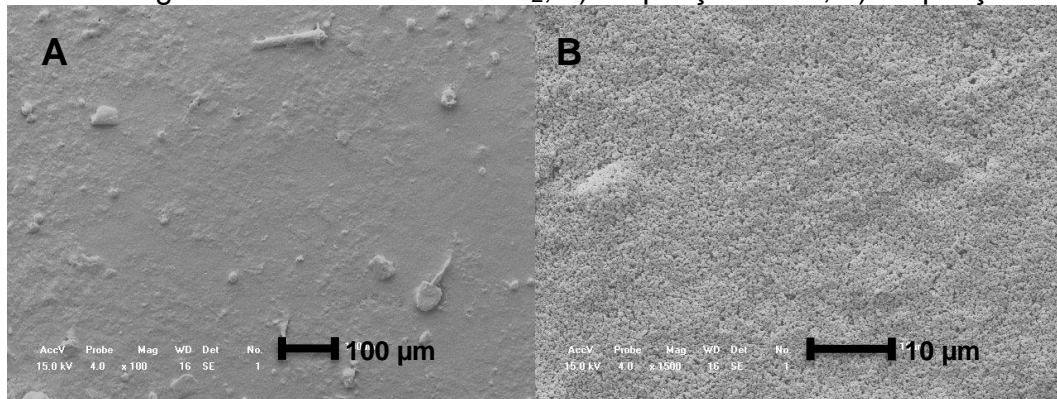
Figura 29 – Imagem de MEV da enzima LOX imobilizada em NTC+nAuSiO₂, a) ampliação 100x; b) ampliação 1000x



5.2.3 NTC+SiO₂ como material suporte

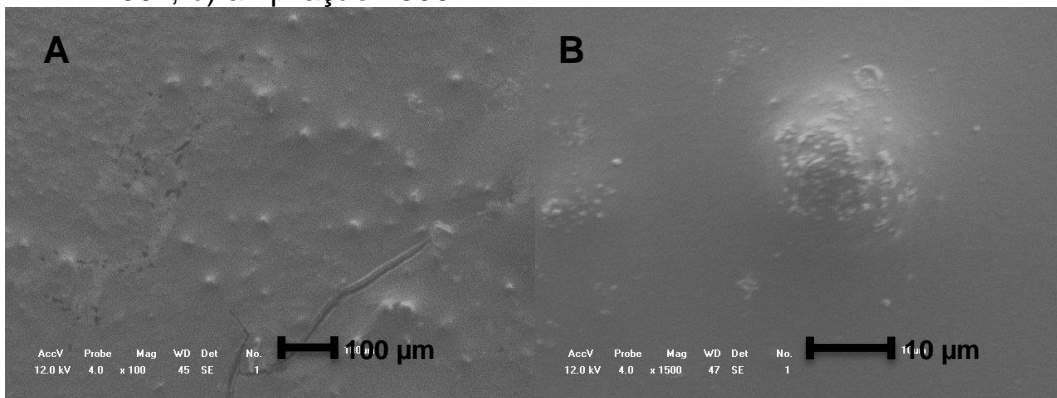
Na Figura 30 podemos observar a superfície do NTC+SiO₂, nas resoluções de 100x e 1500x a presença de poros pequenos e uniformes, resultando uma maior homogeneidade na superfície, comparada com o NTC e o NTC+nAuSiO₂ ambos sem a enzima.

Figura 30 – Imagem de MEV do NTC+SiO₂, a) ampliação 100x; b) ampliação 1500x



Devido a imobilização com a LDH, observou-se que a superfície com NTC+SiO₂, na resolução de 100x e 1500x, teve seus poros recobertos, resultando em uma superfície lisa e com presença de aglomerados de tamanhos maiores (Figura 31).

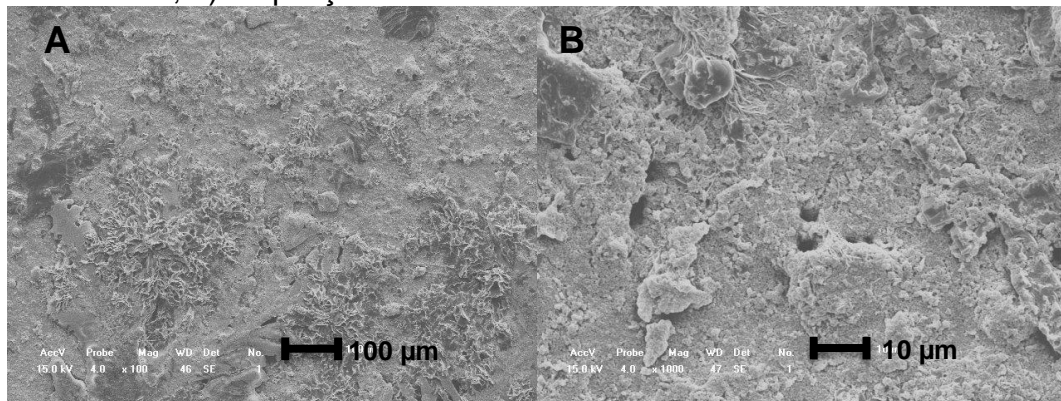
Figura 31 – Imagem de MEV da imobilização da LDH no NTC+SiO₂, a) ampliação 100x; b) ampliação 1500x



Fonte: Autora, 2013

No caso da superfície de NTC+SiO₂ imobilização com a LOX, na resolução de 100x e 1500x, observa-se na Figura 32 a presença de aglomerados de diferentes tamanhos, resultando em uma superfície heterogênea, com morfologia totalmente distinta da superfície NTC+SiO₂.

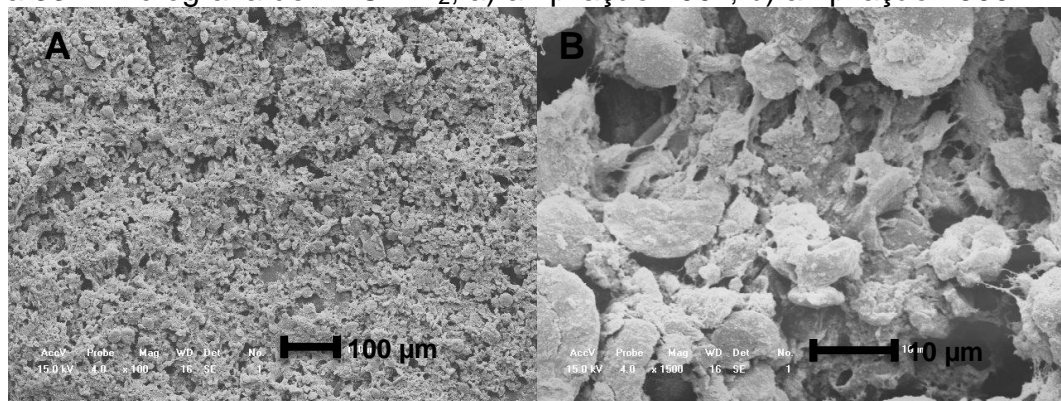
Figura 32 – Imagem de MEV da imobilização da LOX no NTC+SiO₂, a) ampliação 100x; b) ampliação 1500x



5.2.4 NTC-NH₂ como material suporte

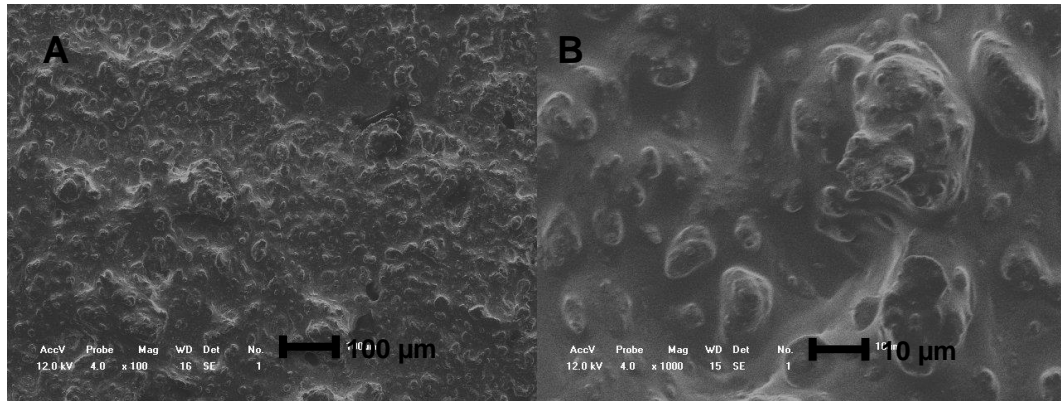
A utilização do NTC-NH₂ como material suporte, apresentou uma superfície homogênea, com grande porosidade e formação de grandes aglomerados de tamanhos uniformes, na resolução de 100x e 1500x (Figura 33).

Figura 33 – Micrografia de NTC-NH₂, a) ampliação 100x; b) ampliação 1500x



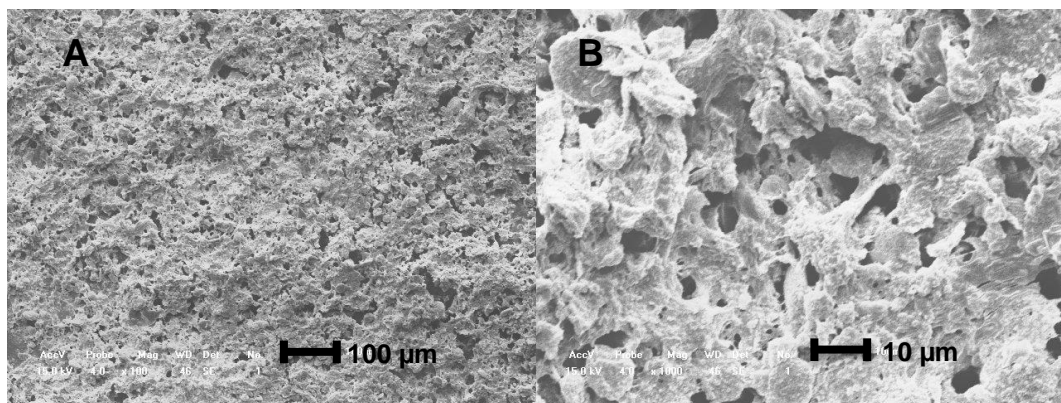
Quando a enzima LDH é imobilizada na superfície de NTC-NH₂ observa-se, na resolução de 100x e 1000x (Figura 34), que a mesma recobre os poros, provavelmente formando uma película na superfície do NTC-NH₂, mantendo-a menos rugosa e alterando sua morfologia.

Figura 34 – Imagem de MEV de NTC-NH₂ + LDH a) ampliação 100x; b) ampliação 1000x



Já a enzima LOX, na resolução de 100x e 1000x, interpenetra melhor na superfície de NTC-NH₂, aderindo esse material. Pode-se observar também a diminuição dos poros, em comparação com o NTC-NH₂ (Figura 35).

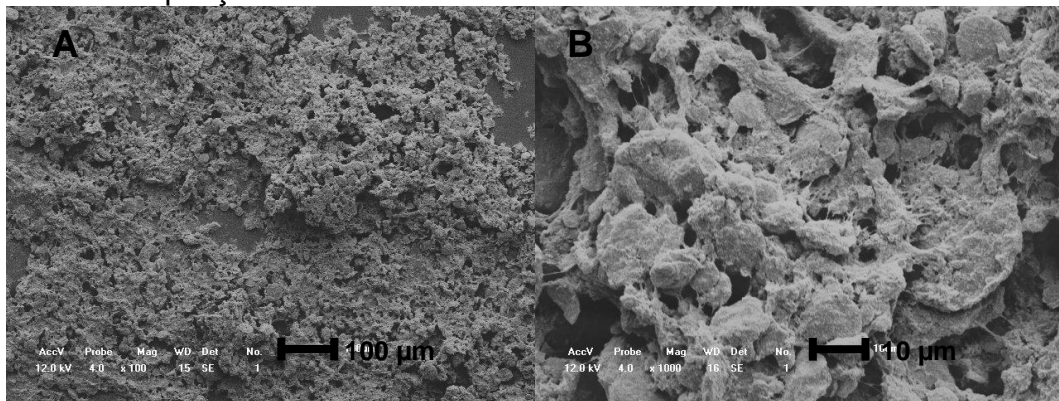
Figura 35 – Imagem de MEV de NTC-NH₂ + LOX a) ampliação 100x; b) ampliação 1000x



5.2.5 NTC-NH₂ + glutaraldeído como material suporte

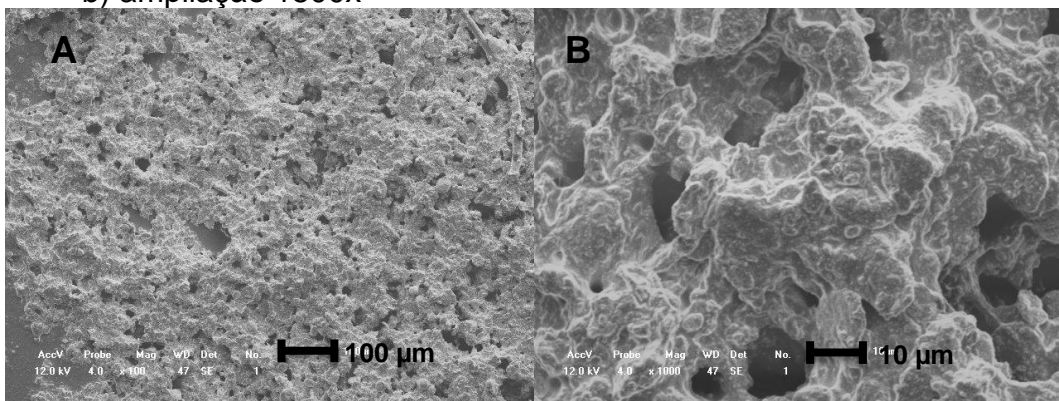
A utilização do NTC-NH₂ junto com o glutaraldeído, alterou morfológicamente a superfície do NTC-NH₂ (ver figura antes) resolução de 100x e 1000x. O glutaraldeído permitiu uma maior aglomeração na superfície do NTC-NH₂ (Figura 36), diminuindo os poros.

Figura 36 – Imagem de MEV de NTC-NH₂ + Glutaraldeído, a) ampliação 100x; b) ampliação 1500x



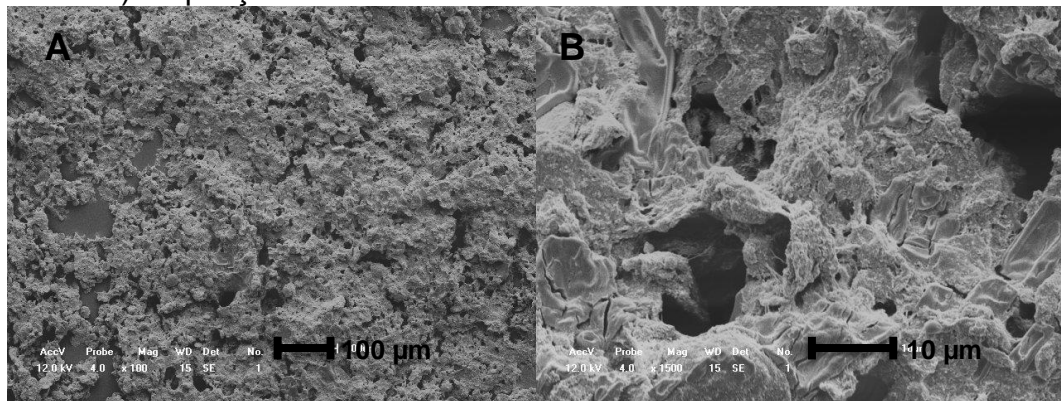
A figura na resolução de 100x e 1000x observa-se que a enzima LDH imobilizada na superfície de NTC-NH₂ com glutaraldeído, apresentou maior interpenetração na superfície, em comparação as citadas anteriormente (Figura 37) mantendo a superfície menos rugosa e alterando sua morfologia.

Figura 37 – Imagem de MEV de NTC-NH₂ + Glutaraldeído + LDH a) ampliação 100x; b) ampliação 1500x



Bem como, a Figura 38 na resolução de 100x e 1000x observa-se que a enzima LOX imobilizada na superfície de NTC-NH₂ com glutaraldeído, apresentou também interpenetração na superfície, alterando sua morfologia de maneira semelhante a LDH.

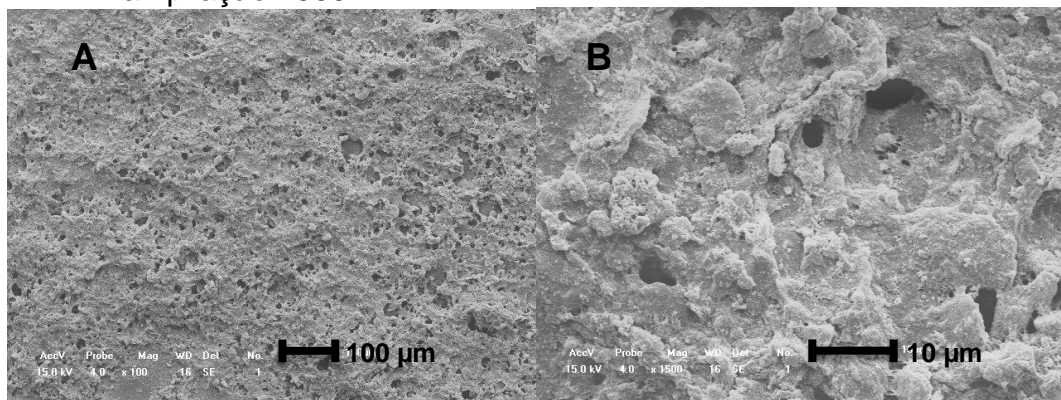
Figura 38 – Imagem de MEV de NTC-NH₂ + Glutaraldeído + LOX a) ampliação 100x; b) ampliação 1500x



5.2.6 NTC-NH₂ + nAuSiO₂ como material suporte

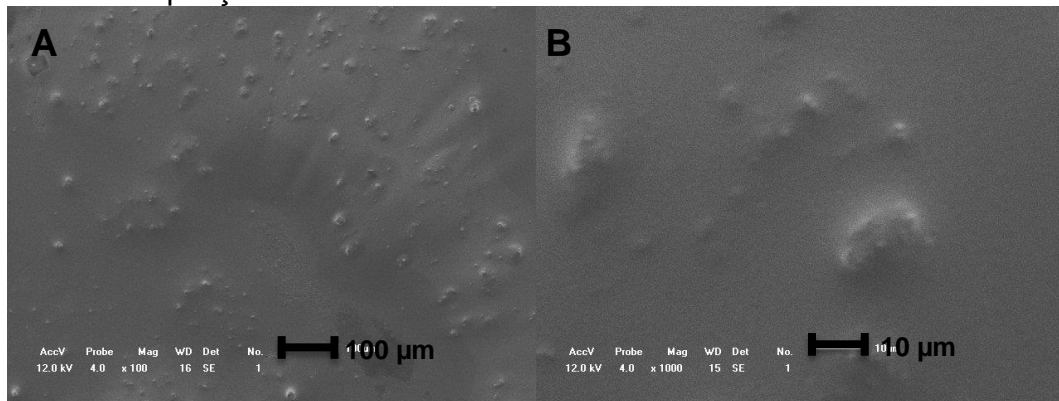
A superfície com o NTC-NH₂ + nAuSiO₂, na resolução de 100x e 1500x, apresenta-se com superfície irregulares, como de aglomerados de diferentes tamanhos (Figura 39).

Figura 39 – Imagem de MEV de NTC-NH₂+ nAuSiO₂ a) ampliação 100x; b) ampliação 1500x



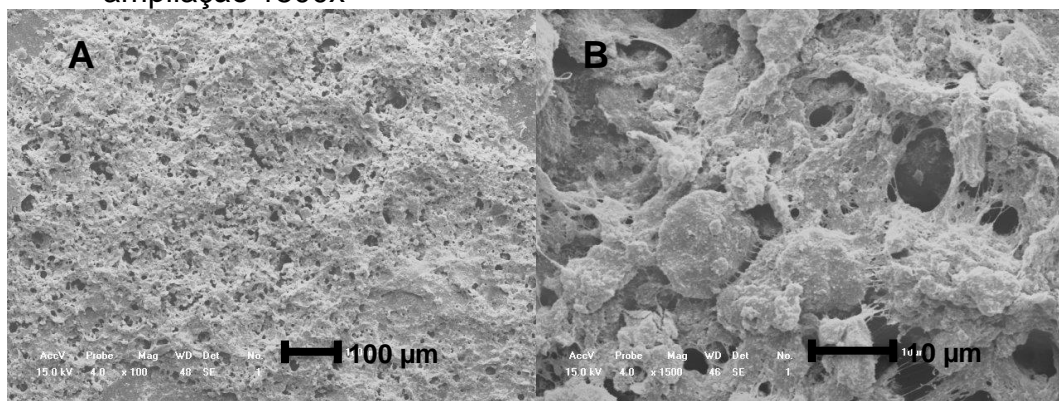
Após a imobilização da enzima lactato desidrogenase, na superfície do NTC-NH₂+ nAuSiO₂ observou-se mudança morfológica na superfície do deste material, na resolução de 100x e 1500x (Figura 40), tornando a superfície mais lisa e uniforme. Com provável formação de películas sobre a superfície.

Figura 40 – Micrografia de NTC-NH₂+ nAuSiO₂ + LDH a) ampliação 100x; b) ampliação 1500x



Já a enzima LOX immobilizada, na superfície do NTC-NH₂+ nAuSiO₂, na resolução de 100x e 1000x, interpenetra melhor na superfície desse material. Pode-se observar também o aumento dos poros, em comparação com o NTC-NH₂+ nAuSiO₂ (Figura 41).

Figura 41 – Micrografia de NTC-NH₂+ nAuSiO₂ + LOX a) ampliação 100x; b) ampliação 1500x



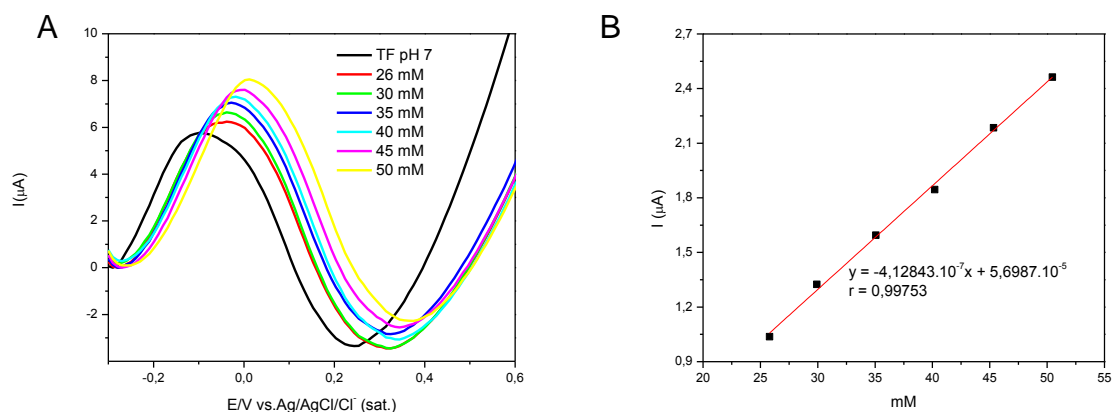
Para todas as imagens de MEV de NTC, NTC+nAuSiO₂, NTC+nSiO₂, NTC-NH₂, NTC-NH₂+glutaraldeído e NTC-NH₂+ nAuSiO₂ demonstraram mudanças morfológicas na superfície após processo de imobilização das enzimas lactato oxidase ou desidrogenase, sendo as superfícies com a presença da lactato desidrogenase, as que apresentaram as maiores alterações.

5.3 Estudos eletroquímicos

5.3.1 Modificação do eletrodo com NTC, NTC+nSiO₂, NTC+nAuSiO₂ e LDH

As análises voltamétricas obtidas através da técnica de VPD utilizando um eletrodo de carbono vítreo modificado com NTC e LDH, como eletrodo de trabalho, está representada na Figura 42a, na qual é possível verificar a presença de um pico anódico (I_{pa}) que sofre deslocamento para potenciais mais próximos de zero e aumento de intensidade de corrente em função do aumento da concentração de ácido láctico. Através da curva de calibração, (Figura 42b), obteve-se a faixa linear de 7,05-50mM, coeficiente de correlação de 0,99753, e limites de detecção e quantificação de 2,11 mM e 7,05 mM, respectivamente.

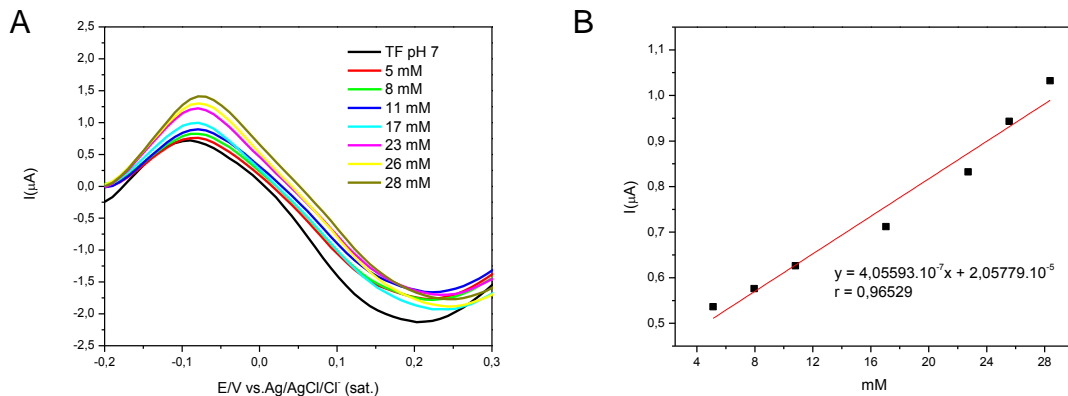
Figura 42 – (a) Voltamogramas de Pulso Diferencial obtidos para ácido láctico em tampão fosfato pH 7, utilizando biossensor de CV modificado com NTC e enzima LDH e sua (b) curva de calibração



O biossensor modificado com NTC+nSiO₂ e LDH (Figura 43) apresentou um pico anódico, I_{pa} , que teve sua intensidade crescente em função da concentração de ácido láctico e manteve seu potencial em torno de -0,1 V. Desta forma, verificou-se que a presença de nSiO₂ dificultou o processo de transferência de elétrons, visto que não apresentou deslocamento do potencial de pico anódico para valores mais próximos de zero, além de apresentar uma intensidade de corrente (em torno de 1,52µA) inferior a obtida para o biossensor utilizando apenas NTC e LDH (em torno de 8 µA). Assim, a presença de nSiO₂, pode favorecer a imobilização da enzima em centros específicos, de modo que não se verificou deslocamento de potencial.

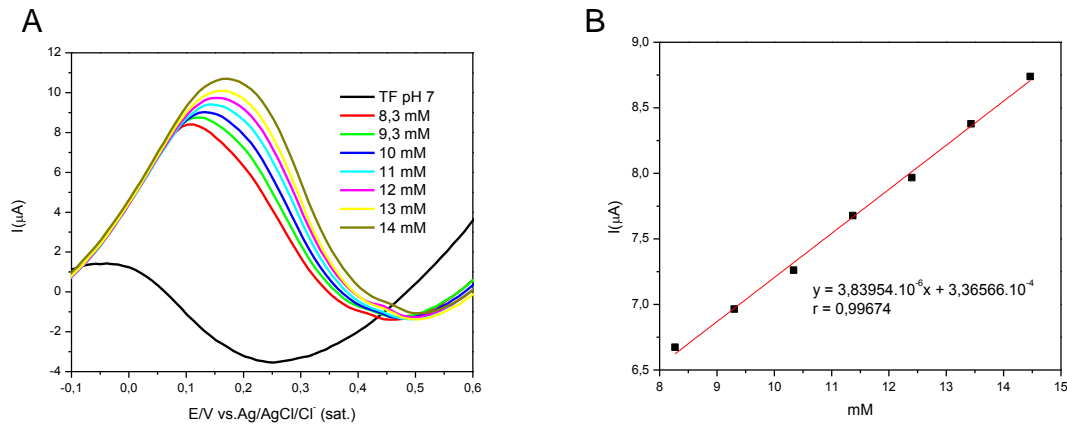
A obtenção dos parâmetros analíticos para o biossensor modificado com NTC+nSiO₂ e LDH (Figura 43b) resultou numa faixa linear de 3,52-28mM, um coeficiente de correlação de 0,96529, um limite de detecção e quantificação de 1,05 mM e 3,52mM, respectivamente.

Figura 43 – (a) Voltamogramas de Pulso Diferencial obtidos para ácido láctico em tampão fosfato pH 7, utilizando biossensor de CV modificado com NTC+nSiO₂ e enzima LDH e sua (b) curva de calibração



O biossensor modificado com NTC+ nAuSiO₂ e LDH (Figura 44a) apresentou um pico anódico, I_{pa} , que teve sua intensidade crescente em função da concentração de ácido láctico, mantendo-se seu potencial em torno de +0,15V . Logo a presença de nAuSiO₂ pode ter favorecido a imobilização da enzima em centros específicos, de modo que não se verificou mudança de potencial. Além disso, observa-se uma intensidade de corrente (em torno de 10 μ A) superior a obtida para os biossensores utilizando apenas NTC e LDH (em torno de 8 μ A) e NTC+ nSiO₂ e LDH (em torno de 1,5 μ A), provavelmente devido à presença de nanopartículas ouro que aumentou superfície. Na Figura 44b esta a curva de calibração do biossensor modificado com NTC+nAuSiO₂ e LDH que resultou numa faixa linear de 0,40-14mM, um coeficiente de correlação de 0,99675 e um limite de detecção e quantificação de 0,12mM e 0,4mM, respectivamente.

Figura 44 – (a) Voltamogramas de Pulso Diferencial obtidos para ácido láctico em tampão fosfato pH 7, utilizando biossensor de CV modificado com NTC+nAuSiO₂ e enzima LDH e sua (b) curva de calibração



Pereira et al. (2007) estudaram biossensores amperométricos com base em lactato desidrogenase e azul de Meldolae obtiveram um limite de detecção de 7,5 µM com faixa linear de 0,1-10 mM que apesar de diferir dos limites de detecção encontrados no presente estudo, utilizando modificações de eletrodo com NTC, NTC+nSiO₂ e NTC+nAuSiO₂ com a mesma enzima, apresenta uma faixa linear próxima.

Já Piano et al. (2010) baseou-se em um eletrodo impresso (*screenprinted*), modificado com sal azul-Reinecke de Meldola revestido com a enzima lactato desidrogenase e uma camada de acetato de celulose foi depositada na parte superior do dispositivo para atuar como uma membrana permeável e seletiva. Nesses estudos eles obtiveram uma faixa linear de 0,55 - 10 mM e limite de detecção igual a 0,55 mM, sendo ambos os valores próximos ao nosso estudo, no entanto obteve-se uma maior faixa linear.

Li et al. (2008) desenvolveram um novo método para a determinação de ácido láctico com base na análise da LDH e glutaraldeído imobilizado em um capilar de fluorescência, e obtiveram uma faixa linear de 0,50- 2,0 mM e um limite de detecção de 0,40 mM. Este resultado apresentou uma variação da faixa linear inferior ao encontrado neste estudo.

5.3.2 Modificação do eletrodo com NTC, NTC+nSiO₂, NTC+nAuSiO₂ e LOX

No estudo utilizado eletrodos modificados com NTC, NTC+nSiO₂ e NTC+nAuSiO₂ e a enzima lactato oxidase, apesar da presença de um pico anódico, I_{pa} , não houve variação de intensidade de corrente proporcional a concentração. Provavelmente devido à lixiviação da enzima na superfície do eletrodo. Tornando esses biossensores inutilizáveis, para esse tipo de material na presença desta enzima. Provavelmente a utilização de um filme sobre o eletrodo modificado com os nano compósitos e enzima resolveria o problema da lixiviação e a utilização de um mediador poderia melhorar a capacidade de transferência de elétrons.

Chum-xiuet al. (2009) construíram um biossensor eletroquímico planar com a enzima lactato oxidase em um sistema de dois eletrodos de filme fino de ouro e foi modificado com nanopartículas de negro de platina- e um mediador ferricianeto, este com o intuito de melhorar a capacidade de transferência de elétrons e obtiveram um limite de detecção a 0,1 mM e uma faixa linear de 1-20 mM de lactato. Essa ampla linearidade desse tipo de biossensores foi explicado pela utilização de alta concentração de ferricianeto, o qual pode superar a cinética relativamente lenta da oxidação da lactato oxidase.

Já Huang et al. (2008) usou nanopartículas de platina combinadas com os nanotubos de carbono de paredes múltiplas em eletrodo de carbono vítreo para a fabricação de um biossensor eletroquímico de L-lactato e a enzima foi imobilizada por adsorção neste material. No entanto estes autores utilizaram uma camada fina de sol-gel para evitar a perda da enzima e melhorar a capacidade anti-interferente, segundo os mesmos autores o sol-gel aumentou a estabilidade. Com isso eles obtiveram uma faixa linear de 0,2-2 mM e um limite de detecção estimado a 0,3mM.

5.3.3 Modificação do eletrodo com NTC-NH₂, NTC-NH₂+glutaraldeído, NTC-NH₂+nAuSiO₂ e LDH

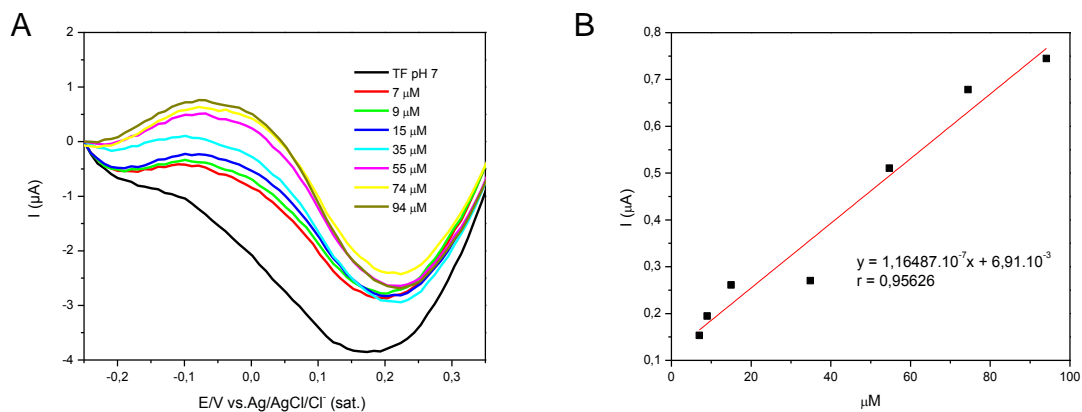
As análises voltamétricas obtidas através da técnica de VPD utilizando um eletrodo de carbono vítreo modificado com NTC funcionalizado com NH₂ e LDH, como eletrodo de trabalho, está representada na Figura 45a, na qual é possível verificar a presença de um pico anódico (I_{pa}) que teve sua intensidade crescente em função da concentração de ácido láctico e seu potencial manteve-se em torno de -0,1

V. No entanto verifica-se uma intensidade de corrente (em torno de $1,5 \mu\text{A}$) inferior à obtida para o biossensor utilizando apenas NTC, sem funcionalização com o grupo NH_2 , e LDH (em torno de $8 \mu\text{A}$).

Os dados analíticos foram obtidos através da curva de calibração, conforme Figura 45b, o coeficiente de correlação foi de 0,95626 e um limite de detecção de $2,61 \mu\text{M}$ e quantificação $0,869 \mu\text{M}$.

Esse resultado mostra uma sensibilidade maior do biossensor modificado com NTC funcionalizado com NH_2 e LDH em comparação com o biossensor que utilizou a mesma enzima e NTC sem funcionalização. Provavelmente o nafion utilizado na dispersão do NTC funcionalizado com NH_2 melhorou a imobilização da enzima, já que pode formar um filme.

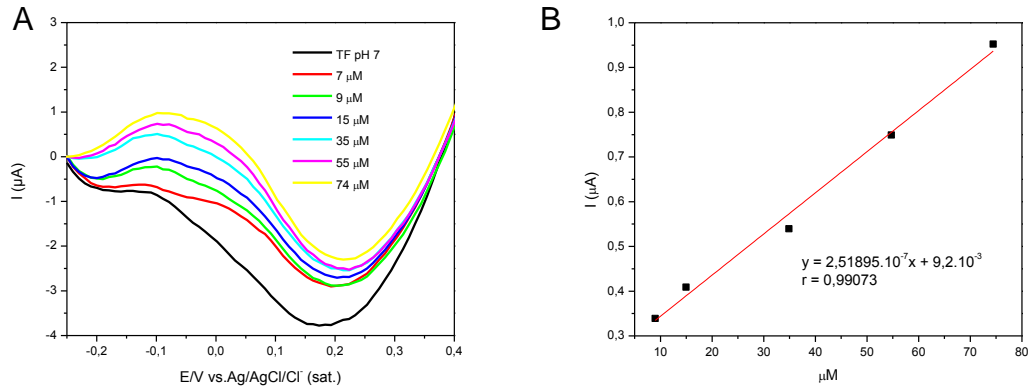
Figura 45 – (a) Voltamogramas de Pulso Diferencial obtidos para ácido láctico em tampão fosfato pH 7, utilizando biossensor de CV modificado com NTC funcionalizado com NH_2 e enzima LDH e sua (b) curva de calibração



No biossensor modificado com NTC funcionalizado com NH_2 , glutaraldeído e LDH (Figura 46a) apresentou pico anódico, I_{p_a} , com sua intensidade proporcional a concentração de ácido láctico e seu potencial se manteve em torno de $-0,1\text{V}$. Verifica-se uma intensidade de corrente (em torno de $1 \mu\text{A}$) inferior a obtida pelo biossensor de NTC funcionalizado com o grupo NH_2 , e LDH (em torno de $1,5 \mu\text{A}$), devido provavelmente a presença do glutaraldeído que pode ter diminuído a área superficial.

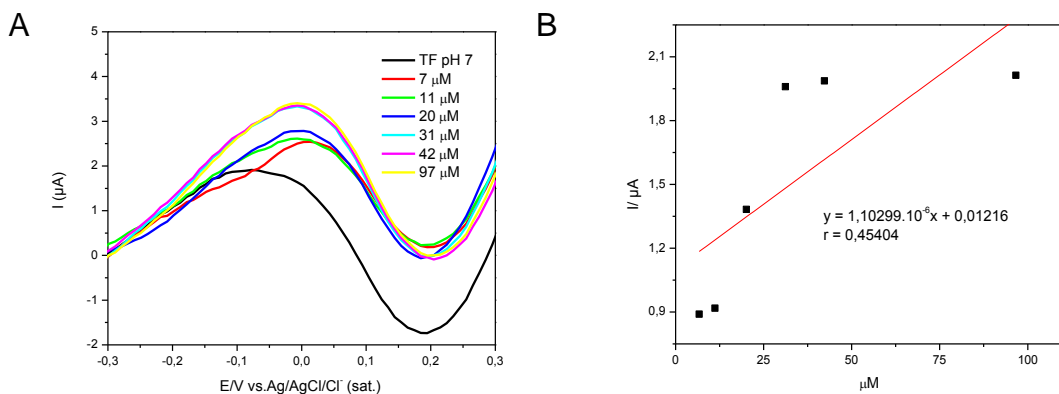
A curva de calibração do biossensor modificado com NTC funcionalizado com NH_2 , glutaraldeído e LDH está apresentada na Figura 46b e através dela foi obtido um coeficiente de correlação de 0,99073 e um limite de detecção e quantificação de $0,145 \mu\text{M}$ e $0,483 \mu\text{M}$, respectivamente.

Figura 46 – (a) Voltamogramas de Pulso Diferencial obtidos para ácido láctico em tampão fosfato pH 7, utilizando biossensor de CV modificado com NTC funcionalizado com NH_2 , glutaraldeído e enzima LDH e sua (b) curva de calibração



No biossensor modificado com NTC funcionalizado com NH_2 , nAuSiO_2 e LDH (Figura 47b) não houve linearidade, apesar de apresentar um pico anódico, I_{p_a} , um potencial em torno de zero (Figura 47a), e apresentar uma intensidade de corrente em torno de $3,5 \mu\text{A}$, valor superior aos obtidos pelos biossensores de NTC funcionalizado com o grupo NH_2 , e LDH (em torno de $1,5 \mu\text{A}$) e com glutaraldeído (em torno de $1 \mu\text{A}$). Neste caso a presença do nAuSiO_2 aumentou a área superficial.

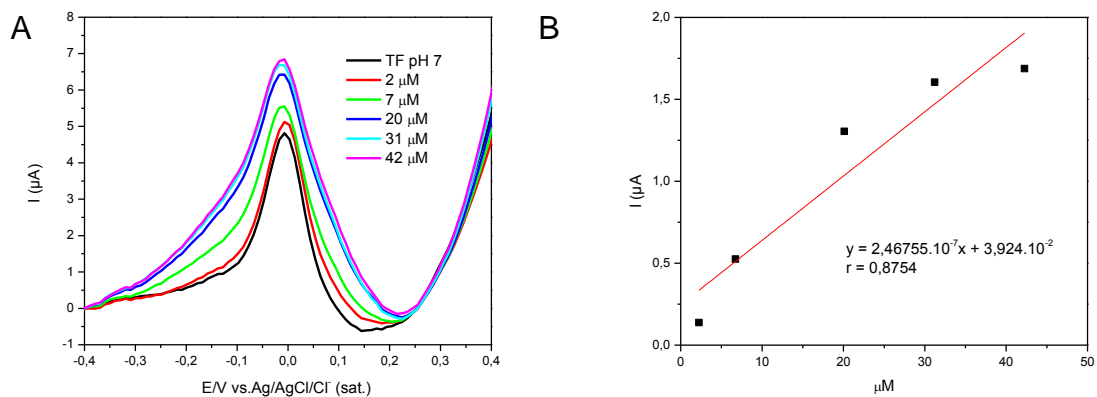
Figura 47 – (a) Voltamogramas de Pulso Diferencial obtidos para ácido láctico em tampão fosfato pH 7, utilizando biossensor de CV modificado com NTC funcionalizado com NH_2 , nAuSiO_2 e enzima LDH e sua (b) curva de calibração



5.3.4 Modificação do eletrodo com NTC- NH_2 , NTC- NH_2 +glutaraldeído, NTC- NH_2 + nAuSiO_2 e LOX

As análises voltamétricas obtidas através da técnica de VPD utilizando um eletrodo de carbono vítreo modificado com NTC funcionalizado com o grupo NH_2 e LOX, como eletrodo de trabalho (Figura 48a) apesar de apresentar um pico anódico, I_{p_a} , não houve proporcionalidade em sua intensidade com o acréscimo da concentração de ácido láctico (Figura 48b).

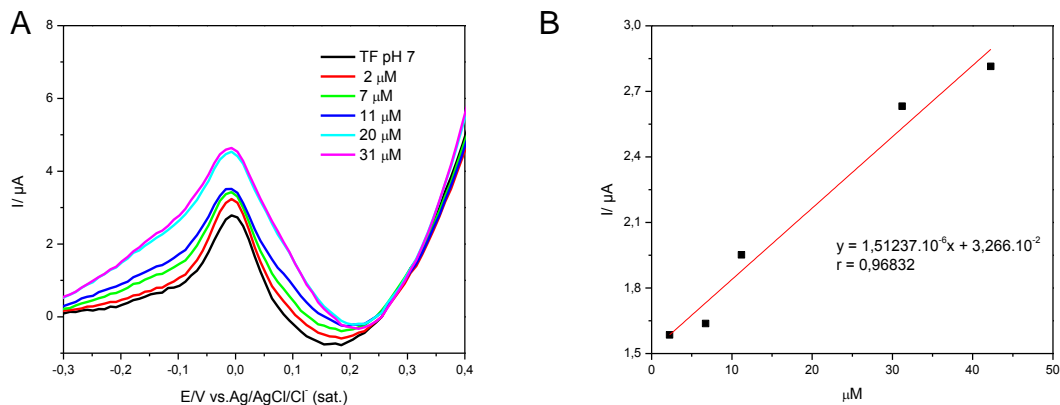
Figura 48 – (a) Voltamogramas de Pulso Diferencial obtidos para ácido láctico em tampão fosfato pH 7, utilizando biossensor de CV modificado com NTC funcionalizado com grupos NH_2 e enzima LOX e sua (b) curva de calibração



O biossensor modificado com NTC funcionalizado com o grupo NH_2 , glutaraldeído e LOX (Figura 49a) apresentou um pico anódico, I_{p_a} , com sua intensidade proporcional a concentração de ácido láctico e seu potencial se manteve em torno de 0 V, favorecendo a transferência de elétrons. Bem como, apresentou uma intensidade de corrente em torno de $5\mu\text{A}$, valor superior aos obtidos pelos biossensores de NTC funcionalizado com o grupo NH_2 , glutaraldeído e LDH (em torno de $1\mu\text{A}$).

Como apresentado na Figura 49b seu coeficiente de correlação foi de 0,96832. Seu limite de detecção e quantificação foi de $0,668\mu\text{M}$ e $2,23\mu\text{M}$, respectivamente.

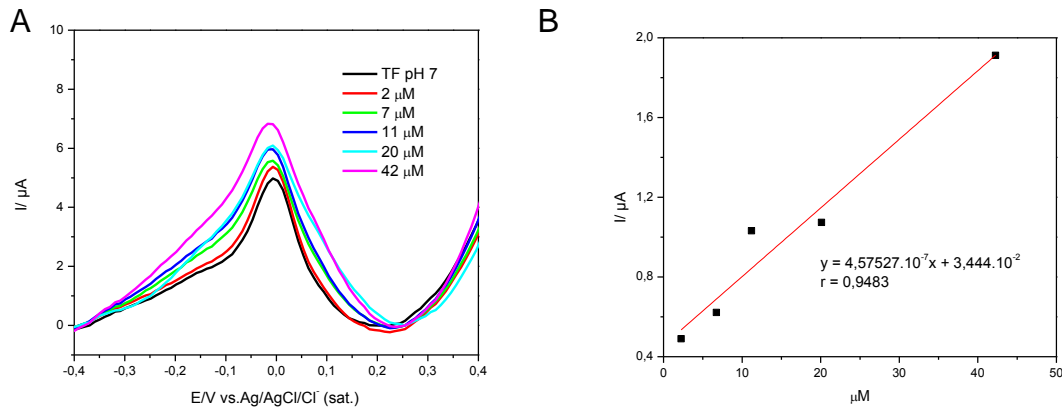
Figura 49 – (a) Voltamogramas de Pulso Diferencial obtidos para ácido láctico em tampão fosfato pH 7, utilizando biossensor de CV modificado com NTC funcionalizado com grupos NH_2 , glutaraldeído e enzima LOX e sua (b) curva de calibração



O biossensor modificado com NTC funcionalizado com o grupo NH_2 , nAuSiO_2 e LOX (Figura 50a) apresentou um pico anódico, I_{p_a} , com sua intensidade proporcional a concentração de ácido láctico e manteve seu potencial em 0 V, favorecendo a transferência de elétrons. Além disso, apresentou uma intensidade de corrente em torno de $7\mu\text{A}$, valor superior aos obtidos por todos os biossensores de NTC funcionalizado com o grupo NH_2 , exceto ao biossensor modificado com NTC funcionalizado com grupos NH_2 e enzima LOX, que apresentou valor similar.

Na Figura 50b esta apresentado o coeficiente de correlação de 0,9483, que melhorou em comparação com a mesma modificação, no entanto com a enzima LDH (0,8754). E seu limite de detecção foi de $0,348\mu\text{M}$ e limite de quantificação de $1,16\mu\text{M}$.

Figura 50 – (a) Voltamogramas de Pulso Diferencial obtidos para ácido láctico em tampão fosfato pH 7, utilizando biossensor de CV modificado com NTC funcionalizado com grupos NH_2 , nAuSiO_2 e enzima LOX e sua (b) curva de calibração



5.3.5 Comparações entre os biossensores

Na Tabela 2 estão resumidos os resultados obtidos neste trabalho. O biossensor de NTC-NH₂+GLUT+LDH apesar do seu potencial ser de -0,1 V, apresentou menor limite de detecção e quantificação e um bom coeficiente de correlação, quando comparados com os demais. Dentre as imagens de MEV observa-se que a lactato desidrogenase interpenetrou mais na superfície de NTC-NH₂ e glutaraldeído (Figura 37, p.51) em comparação com os demais biossensores com a mesma enzima, provavelmente houve uma melhor imobilização da lactato desidrogenase neste material.

Tabela 2 – Comparativo entre biossensor de ácido láctico modificados com nanotubos de carbonos, nanocompósitos e enzimas LDH e LOX

Biossensor	E (V)	LD	LQ	R
NTC+LDH	0	2,11 mM	7,05 mM	0,99753
NTC+nSiO ₂ + LDH	-0,10	1,05 mM	3,52mM	0,96529
NTC+nAuSiO ₂ + LDH	+0,15	0,12mM	0,40 mM	0,99675
NTC-NH ₂ +LDH	-0,10	2,61 μM	0,87 μM	0,95626
NTC-NH ₂ +LOX	0	-	-	0,87540
NTC-NH ₂ +GLUT. + LDH	-0,10	0,15 μM	0,48 μM	0,99073
NTC-NH ₂ +GLUT. + LOX	0	0,67 μM	2,23 μM	0,96832
NTC-NH ₂ +nAuSiO ₂ +LDH	0	-	-	0,45404
NTC-NH ₂ +nAuSiO ₂ +LOX	0	0,35 μM	1,16 μM	0,94830

Os biossensores com NTC apresentaram limites de detecção e quantificação superiores quando comparados com os biossensores de NTC funcionalizados com

grupos amina, que pode ser resultado de uma melhor imobilização entre as enzimas LDH e LOX com os grupos aminas.

A presença dos nanocompósitos NTC funcionalizados com grupo amina, apesar de não apresentar uma boa linearidade, facilitou a transferência de elétrons, já que apresentou potenciais em torno de zero. Porém isso não foi observado nos biossensores que utilizaram NTC sem funcionalização.

A não linearidade apresentada por alguns biossensores podem ter seus resultados melhorados na presença de uma membrana, que venha a proteger as enzimas de uma provável lixiviação.

Monosíket al. (2012) também encontrou baixos limites de detecção, utilizando NTC. Estes autores estudaram biossensores amperométricos baseados em eletrodo planar de ouro e em eletrodos de nanocompósitos composto de nanotubos de carbono de paredes múltiplas para a determinação de ácido láctico. Para isso os biossensores foram construídos por imobilização de oxidase de L-lactato e peroxidase dentro das camadas de quitosana sobre a superfície dos eletrodos. Como um mediador, ferrocianeto foi utilizado. Esses mesmos autores encontraram que o biossensor baseado em eletrodo de ouro mostrou linearidade na faixa de 5-244 μM e limite de detecção de 0,96 μM e para os biossensores com nanocompósitos a faixa foi mais ampla de 5-350 μM e limites de detecção foram 1,62 e 1,66 μM . Segundo os mesmos autores os sistemas baseados em biossensores com nanocompósitos mostrou que esse material é capaz de substituir a superfície do eletrodo de ouro, como uma alternativa mais barata.

6 CONCLUSÃO

Os resultados de modelagem molecular demonstraram que tanto a lactato desidrogenase quanto a lactato oxidase, interagiram com ambos os nanotubos de carbono, de paredes simples e duplas. No entanto os nanotubos de paredes múltiplas (MWNT) foi o que apresentou as maiores afinidades, fazendo deste um ótimo material para imobilizar as enzimas estudadas.

A partir das imagens de MEV na resolução de 100x e 1000x, observou-se mudanças morfológicas na superfície do NTC, NTC+nSiO₂, NTC+nAuSiO₂, NTC funcionalizado com NH₂, NTC funcionalizado com NH₂ mais glutaraldeído e NTC funcionalizado com NH₂ mais nAuSiO₂, na presença das enzimas lactato desidrogenase e lactato oxidase.

Os estudos eletroanalíticos demonstraram que é possível utilizar o biossensor a base de nanotubos de carbono e o melhor biossensor foi o modificado com NTC funcionalizados com grupo NH₂, glutaraldeído e a enzima lactato desidrogenase.

PERSPECTIVAS

A partir dos melhores biossensores estudados neste trabalho pretende-se otimiza-los, adicionar uma membrana, realizar estudos de interferentes, cálculos de *K_m* das enzimas lactato oxidase e desidrogenase imobilizadas e em solução. Realizar um estudo com a microbalança e fazer análise de microscopia eletrônica de transmissão. Os resultados serão comparados com técnicas tradicionais de espectroscopia e análises em amostra real.

REFERÊNCIAS

- BRAININA, K. H. Advances in voltammetry. **Talanta**, v. 34 n.1, p. 41–50, 1987.
- BRETT, A. M. O.; BRETT, C. M. A. **Electroquímica** - Princípios, Métodos e Aplicações. Coimbra: Oxford University Press, Inc., 1996.
- CAI, X.; YAN, J.; CHU, H.; WU, M.; TU, Y. An exercise degree monitoring biosensor based on electrochemiluminescent detection of lactate in sweat. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 143, n. 2, p. 655–659, 2010.
- CAMPBELL, M. K.; FARRELL, S. O. **Bioquímica**: bioquímica básica. v. 1. São Paulo: Thomson Learning, 2007. 193 p.
- CAMPBELL, M. K.; FARRELL, S. O. **Bioquímica**: bioquímica metabólica. V.3 São Paulo, Thomson Learning, 2008. 520 p.
- CARDOSO, C. L.; MORAES, M.C. DE; CASS, Q. B. Imobilização de enzimas em suportes cromatográficos: uma ferramenta na busca por substâncias bioativas. **Quim. Nova**, v. 32, n. 1, p. 175-187, 2009.
- ESTEVES, A. C. C.; BARROS-TIMMONS, A.; TRINDADE, T. Nanocompósitos de matriz polimérica: estratégias de síntese de materiais híbridos. **Quim.Nova**, v.27, n.5, p.798–806, 2004.
- FABER, K.; **Biotransformations in Organic Chemistry**. Berlin: Springer-Verlag, 2011.
- FENG, M.; HAN, H.; ZHANG, J.; TACHIKAWA, H. Electrochemical sensors based on carbon nanotubes In: ZHANG, X.; JU, H.; WANG, J. **Electrochemical sensors, biosensors and their biomedical applications**. 1. ed. New York: Academic Press, Inc., 2008. cap. 15.
- FURUICHI, M.; SUZUKI, N.; DHAKSHNAMOORTHY, B.; MINAGAWA, H.; YAMAGISHI, R.; WATANABE, Y.; MIZUNO, H. X-ray structures of *Aerococcus viridans* lactate oxidase and its complex with D-lactate at pH 4.5 show an alpha-hydroxyacid oxidation mechanism. **Journal of Molecular Biology**, v. 378, n. 2, p. 436–46, 2008.
- GOODSELL, D. S. Molecule of the Month June 2008: Lactate Dehydrogenase — **RSCB Protein Data Bank**. 2008. Disponível em: <<http://www.rcsb.org/pdb/101/motm.do?momID=102>>. Acesso em 05 out. 2013. DOI: 10.2210/rcsb_pdb/mom_2008_6.
- HARVEY, R. A.; FERRIER, D. R. **Bioquímica Ilustrada**. 5. Ed. Porto Alegre: Artmed, 2012.
- HERBST, M. H.; MACÊDO, M. I. F.; ROCCO, A. M. Tecnologia dos nanotubos de carbono: tendências e perspectivas de uma área multidisciplinar. **Quim. Nova**, v. 27, n.6, p.986–992, 2004.

- HERRERO, A. M.; REQUENA, T.; REVIEJO, A. J.; PINGARRÓN, J. M. Determination of L-lactic acid in yoghurt by a bi-enzyme amperometric graphite – Teflon composite biosensor. **European Food Research and Technology**, v. 219, n. 5, p. 557–560, 2004.
- HUANG, J.; LI, J.; YANG, Y.; WANG, X.; WU, B.; ANZAI, J.; CHEN, Q. Development of an amperometric L-lactate biosensor based on L-lactate oxidase immobilized through silica sol–gel film on multi-walled carbon nanotubes/platinum nanoparticle modified glassy carbon electrode. **Materials Science and Engineering: C**, v. 28, n.7, p. 1070–1075, 2008.
- HUANG, S. Y.; GRINTER, S. Z.; ZOU, X. Scoring functions and their evaluation methods for protein-ligand docking: recent advances and future directions. **Physical Chemistry Chemical Physics : PCCP**, v. 12, n. 40, p. 12899–908, 2010.
- KILLNER, M. H. M. **Desenvolvimento de um Sistema Voltamétrico Microfluídico**. 2007. 99 f. Dissertação (Mestrado em Química), Universidade Federal de Campinas. Programa de Pós-Graduação em Química, Campinas, SP, 2007. Disponível em: <<http://www.bibliotecadigital.unicamp.br/document/?code=vtls000429557>>. Acesso em: 05 out. 2013.
- KIM, N.; HAGINOYA, R.; KARUBE, I. Characterization and Food Application of an Amperometric Needle-Type L-Lactate. **Journal of Food Science**, v. 61, p. 286–290, 1996.
- KLABUNDE, K J.; RICHARDS, R. M. **Nanoscale materials in chemistry**. 2. ed. New Jersey: John Wiley & Sons, Inc., 2009. 807 p.
- LAUGHTON, J. D.; CHARNAY, Y.; BELLOIR, B.; PELLERIN, L.; MAGISTRETTI, P. J.; BOURAS, C. Differential messenger RNA distribution of lactate dehydrogenase LDH-1 and LDH-5 isoforms in the rat brain. **Neuroscience**, v.96, n. 3, p. 619–625, 2000.
- LEIROS, I.; WANG, E.; RASMUSSEN, T.; OKSANEN, E.; REPO, H.; PETERSEN, S. B.; HEIKINHEIMO, P.; HOUGH, E. The 2.1 Å **structure** of **Aerococcus viridans** L-lactate oxidase (LOX). *Acta Crystallogr., Sect. F*, v. **62**, p. **1185**, 2006.
- LI, Y. S.; JU, X.; GAO, X. F.; ZHAO, Y. Y.; WU, Y. F. Immobilization enzyme fluorescence capillary analysis for determination of lactic acid. **Analytica Chimica Acta**, v. 610, n.2, p. 249–56, 2008.
- LIMA, J. L. F. C.; LOPES, T. I. M. S.; RANGEL, A. O. S. S. Enzymatic determination of L(+) lactic and L(-) malic acids in wines by flow-injection spectrophotometry. **Analytica Chimica Acta**, v. 366, p.187–191, 1998.
- LIU, C. X.; LIU, H. M.; YANG, Q. DE; TIAN, Q.; CAI, X. X. Development of Amperometric Lactate Biosensor Modified with Pt-black Nanoparticles for Rapid Assay. **Chin J Anal Chem**, v. 37, n. 4, p. 624–628, 2009.

- MARTELLI, P. B.; REIS, B. F.; ARAÚJO, A. N.; CONCEIÇÃO, M.; MONTENEGRO, B. S. A flow system with a conventional spectrophotometer for the chemiluminescent determination of lactic acid in yoghurt. **Talanta**, v. 54, n. 5, 879–85, 2001.
- MARTIN, C. R.; KOHLI, P. The emerging field of nanotube biotechnology. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 2, n. 1, p. 29-37, 2003.
- MATEO, C.; PALOMO, J. M.; LORENTE, G. F.; GUISAN, J. M.; LAFUENTE, R. F. Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, n. 6, p. 1451–1463, 2007.
- MINAH, G. E.; LOESCHE, W. J. Differential messenger RNA distribution of lactate dehydrogenase LDH-1 and LDH-5 isoforms in the rat brain. **Infection and immunity**, v. 17, n. 1, p. 55–61. p. 1977.
- MONOŠÍK, R.; STREĎANSKÝ, M.; GREIF, G.; ŠTURDÍK, E. A rapid method for determination of L-lactic acid in real samples by amperometric biosensor utilizing nanocomposite. **Food Control**, v.23 n.1, p.238–244, 2012.
- MORGON, N. H.; COUTINHO, K. **Métodos de química teórica e modelagem molecular**. São Paulo: Ed. Livraria da Física, 2007.
- MULCHANDANI, A.; BASSI, A.S.; NGUYEN, A. Tetrathiafulvalene-mediated biosensor for L-lactate in dairy products. **Journal of Food Science**, v. 60, n. 1, p. 74–78, 1995.
- NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de bioquímica de Lehninger**. 5 ed. Porto Alegre: Artmed, 2011. 184 p.
- OLIVEIRA, L. C. F. **Síntese de nanopartículas de ouro suportadas em sílica mesoporosa e avaliação de suas propriedades catalíticas frente à reação de oxidação do álcool benzílico**. Maceió, AL: UFAL, 2011. Dissertação (mestrado em química) – Universidade Federal de Alagoas, 2011.
- PACHECO, A. G. M. **Modelagem molecular comparativa e estudos de acoplamento molecular da enzima lanosterol 14 α -desmetilase do *Moniliophthora perniciosa***. 2009. 93 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia), Universidade Estadual de Feira de Santana, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Feira de Santana, BA, 2009.
- PARRA, A.; CASERO, E.; VÁZQUEZ, L.; PARIENTE, F.; LORENZO, E. Design and characterization of a lactate biosensor based on immobilized lactate oxidase onto gold surfaces. **Analytica Chimica Acta**, v. 555, n.2, p.308–315, 2006.
- PEREIRA, A. C.; AGUIAR, M. R.; KISNER, A.; MACEDO, D. V.; KUBOTA, L. T. Amperometric biosensor for lactate based on lactate dehydrogenase and MeldolaBlue coimmobilized on multi-wall carbon-nanotube. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 124, n.1, p. 269–276, 2007.

PIANO, M.; SERBAN, S.; PITTSO, R.; DRAGO, G.; HART, J. P. Amperometric lactate biosensor for flow injection analysis based on a screen-printed carbon electrode containing Meldola's Blue-Reinecke salt, coated with lactate dehydrogenase and NAD⁺. **Talanta**, v. 82, n.1, p. 34–7, 2010.

PIONTEK, K.; CHAKRABARTI, P.; SCHAR, H.; ROSSMANN, M. G.; ZUBER, H. Structure determination and refinement of bacillus stearothermophilus lactate dehydrogenase. **Proteins: Structure, Function and Genetics**, v. 7, n. 1, 74-92, 1990.

RAHMAN, M. M.; SHIDDIKY, M. J.; RAHMAN, M. A.; SHIM, Y. B. A lactate biosensor based on lactate dehydrogenase/nicotinamide adenine dinucleotide (oxidized form) immobilized on a conducting polymer/multiwall carbon nanotube composite film. **Analytical Biochemistry**, v. 384, n. 1, p. 159–65, 2009.

READ, J. A.; WINTER, V. J. ESZES, C. M.; SESSIONS, R. B.; BRADY, R. L. Structural basis for altered activity of M- and H-isozyme forms of human lactate dehydrogenase. **Proteins: Structure, Function and Genetics**, v. 43, n. 2, p. 175-185, 2001.

ROMERO, M. R.; GARAY, F.; BARUZZI, A. M. Design and optimization of a lactate amperometric biosensor based on lactate oxidase cross-linked with polymeric matrixes. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 131, n. 2, p. 590–595, 2008.

ROSATTO, S. S.; FREIRE, R. S.; DURÁN, N.; KUBOTA, L. T.; Amperometric biosensors for phenolic compounds determination in the environmental interest samples. **Quim.Nova**, v. 24, p. 77, 2001.

SHU, H. C.; WU, N. P. A chemically modified carbon paste electrode with D-lactate dehydrogenase and alanine aminotranferase enzyme sequences for D-lactic acid analysis. **Talanta**, v. 54 p. 361–368, 2001.

SKOOG, D. A.; WEST, D. M.; HOLLER, F. J.; STANLEY, R. C. **Fundamentos da Química Analítica**. Trad. 8. ed. São Paulo: Ed.Thomson, 2007.

SOUZA, D. DE; MACHADO, S. A. S.; AVACA, L. A. Voltametria de onda quadrada. Primeira parte: aspectosteóricos. **Quim.Nova**, v. 26, n. 1, p. 81–89, 2003.

STAMBAUGH, R.; POST, D. Substrate and Product Inhibition of Rabbit Substrate and Product Inhibition of Rabbit Muscle Lactic Dehydrogenase Heart (H4) and Muscle (M4) isozymes. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 241, n. 7, p. 4–10, 1966.

SU, L.; JIA, W.; HOU, C.; LEI, Y. Microbial biosensors: a review. **Biosensors & Bioelectronics**, v. 26, n. 5, p. 1788–99, 2011.

SUMAN, S.; SINGHAL, R.; SHARMA, A. L.; MALTHOTRA, B. D.; PUNDIR, C. S. Development of a lactate biosensor based on conducting copolymer bound lactate oxidase. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 107, n. 2, p. 768–772, 2005.

TAMPION, J.; TAMPION, M.D. **Immobilized cells: principles and applications**. New York: Cambridge University Press, 1988. 257 p.

TROTT, O.; OLSON, A. J. AutoDockVina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. **Journal of Computational Chemistry**, v. 31, n. 2, p. 455–61, 2010.

TURNER, A.P.F.; KARUBE, I.; WILSON, G.S.; **BIOSENSORS: Fundamentals and Applications**. Oxford: Oxford University Press, 1988.

UMENA, Y.; YORITA, K.; MATSUOKA, T.; KITA, A.; FUKUI, K.; MORIMOTO, Y. The crystal structure of L-lactate oxidase from aerococcusviridans at 2.1 Å resolution reveals the mechanism of strict substrate recognition. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 350, n. 2, p. 249-256, 2006.

VECCHIA, R. D.; NASCIMENTO, M. G.; SOLDI, V. Aplicações sintéticas de lipases imobilizadas em polímeros. **Quim.Nova**, v. 27, n. 4, p. 623-630, 2004.

WHITE, J. L.; HACKERT, M. L.; BUEHNER, M.; ADAMS, M. J.; FORD, G. C.; LENTZ, P. J.; ROSSMANN, M. G. A comparison of the structures of apo dogfish M4 lactate dehydrogenase and its ternary complexes. **Journal of Molecular Biology**, v. 102, n. 4, p. 759–79, 1976.

WU, F.; HUANG, Y.; HUANG, C. Chemiluminescence biosensor system for lactic acid using natural animal tissue as recognition element. **Biosensors & Bioelectronics**, v. 21, n. 3, p. 518–22, 2005.

ZANINI, V. P.; LÓPEZ DE MISHIMA, B.; SOLÍS, V. An amperometric biosensor based on lactate oxidase immobilized in laponite–chitosan hydrogel on a glassy carbon electrode. Application to the analysis of l-lactate in food samples. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 155, n. 1, p. 75–80, 2011.