

# EMPREGO DE SISTEMA DE ANÁLISE EM FLUXO CONTÍNUO COM BIOSSENSOR POTENCIOMÉTRICO PARA DETERMINAÇÃO DE ADRENALINA EM MEDICAMENTOS\*

LUCIANA NASCIMENTO MOREIRA  
CRISTIANA SCHMIDT DE MAGALHÃES  
PEDRO ORIVAL LUCCAS\*

Departamento de Ciências Exatas, Escola de Farmácia e Odontologia de Alfenas-Centro Universidade Federal, Rua Gabriel Monteiro da Silva no 714, Centro, 37130-000, Alfenas (MG).

Autor responsável: (P.O.Lucas) E-mail: [pedro@int.foa.br](mailto:pedro@int.foa.br)

\* Trabalho vencedor do Prêmio Jaime Torres na Categoria Jovem Farmacêutico

## INTRODUÇÃO

A adrenalina é uma catecolamina liberada no sangue circulante, devido à estimulação dos nervos simpáticos das medulas supra-renais. É, também, secretada por tecidos cromafins. Em média, cerca de 80% das catecolaminas secretadas pela medula das adrenais corresponde à adrenalina (figura 1), a qual apresenta ações farmacológicas por excitar os receptores alfa e beta adrenérgicos, atuando no coração, vasos sanguíneos, pressão arterial, metabolismo, sistema respiratório, sistema nervoso central e musculatura lisa (GILMAN, A.G., 1996; GUYTON, AC & HALL, J.E., 1997; SILVA, P., 2002).

Quanto às indicações clínicas, os usos mais comuns visam a aliviar o distúrbio respiratório causado por broncoespasmo, proporcionar rápido alívio das reações de hipersensibilidade a fármacos e outros alérgenos e prolongar a ação de anestésicos locais (GILMAN, A.G., 1996).

A adrenalina é disponível em várias formulações para diferentes indicações clínicas e vias de administração. No Brasil, é comercializada sob a forma de ampolas de solução aquosa milesimal – cada mililitro contém um miligrama da substância ativa (GILMAN, A.G., 1996; SILVA, P., 2002).

A produção industrial da adrenalina consiste da síntese, a partir do pirocatecol (<http://www.qmcweb.org>). Assim, a análise química qualitativa e quantitativa é fundamental para o controle de qualidade desse fármaco.

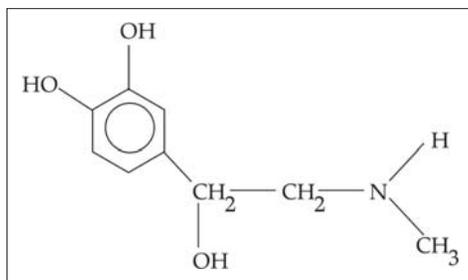


FIGURA 1- Estrutura química da adrenalina: 1,2-benzenodiol-4-(1-hidroxi-2-metilamina etil)

Dentre as técnicas analíticas para determinação da adrenalina, cita-se o biossensor. Trata-se de um sensor que utiliza um material biológico conectado a um transdutor. O material biológico

é imobilizado em uma membrana adequada, que é acoplada à superfície do transdutor. Esse dispositivo monitorará o desaparecimento de algum reagente ou o aparecimento de algum produto da reação do material biológico com o substrato de interesse.

As principais características de um biossensor são: boa seletividade; relativo baixo custo de construção e estocagem; potencial para miniaturização; facilidade de automação e construção de equipamentos portáteis. O elemento biológico pode ser enzimas purificadas, estrato bruto enzimático, tecido animal e vegetal, anticorpos, antígenos, células, organelas, ácido nucléico, receptores; sendo que a escolha do elemento biológico do biossensor dependerá do analito a ser estudado (EGGINS, B.R., 1996; FATIBELLO, O.F. & CAPELATO, M.D., 1991; ROSTTO, S.S. et al, 2001).

Os componentes biológicos mais empregados são enzimas que catalisam, com grande eficiência, as reações biológicas e possuem uma alta seletividade. A imobilização da enzima no biossensor deve ser de maneira adequada para não desnaturar o centro ativo das enzimas. Existem muitos métodos de imobilização enzimática, tais como oclusão em gel, microencapsulação, adsorção física e/ou química, ligação química covalente, ligação química covalente cruzada (FATIBELLO, O.F. & CAPELATO, M.D., 1991). A imobilização escolhida foi o da adsorção de enzima em suporte insolúvel, como o grafite.

Uma alternativa viável e que tem apresentado desempenho satisfatório é o uso de extrato bruto enzimático, que, além de ser mais econômico e estável, possui um tempo de vida superior ao das enzimas purificadas (FATIBELLO, O.F. & VIEIRA, I.C., 2002).

Quanto aos transdutores, nota-se a predominância do uso de amperométrico. Contudo, mencionam-se, também, potenciométrico, condutométrico, óticos, cristais piezelétricos (EGGINS, B.R., 1996). No presente trabalho, tem sido avaliado o transdutor potenciométrico acoplado a sistema de Análise por Injeção em Fluxo (FIA – do inglês *Flow Injection Analysis*).

O sistema FIA consiste de uma ferramenta analítica, na qual a amostra e os reagentes são conduzidos em tubos, com diâmetro interno da ordem de 0,8 mm, até um detector de interesse (RUZICKA, J. & HANSEN, E., 1988). O acoplamento do biossensor no FIA contribui para melhorar suas características operacionais, destacando-se a reprodutibilidade do sinal analítico, a velocidade de resposta e o acondicionamento contínuo da membrana sensora (COUTO, C.M.M. & MONTENEGRO, C.B.S.M., 2000; ZAGATTO, E.A. & ARRUDA, M.A., 1996).

Essas características geralmente levam a uma melhor precisão e exatidão das medidas, quando comparadas com o sistema convencional (RUZICKA, J. & HANSEN, E., 1988). Nota-se também melhoria da seletividade (COUTO, C.M.M. & MONTENEGRO, C.B.S.M., 2000).

Em termos gerais, o processo de análise, por injeção em fluxo, pode ser dividido em quatro partes: propulsão de fluidos, injeção de amostra, reação e detecção (ZAGATTO, E.A. & ARRUDA, M.A. 1996). Durante o percurso, podem provocar reações ou ajustes do meio reacional, com o intuito de se obter melhores condições analíticas.

Quanto aos detectores potenciométricos em sistemas FIA, diversos arranjos têm sido proposto para a adaptação dos eletrodos. Pode-se mencionar o artigo de revisão de COUTO & MONTENEGRO. O objetivo do presente trabalho foi desenvolver um biossensor potenciométrico e adaptação deste em sistema FIA para a determinação quantitativa de adrenalina em medicamentos. Para isso, empregou-se um sistema com dois eletrodos iguais com acoplamento em célula e detecção diferencial.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Reagentes

Epinefrina, Sigma; Dihidrogenofosfato de potássio, Synth; Hidróxido de sódio, Vetec; Vaselina, Rioquímica; Grafite em pó, Synth; Polivinilpirrolidona, Polyclar K-30<sup>®</sup>.

### Equipamentos e acessórios

Espectrofotômetro Uv-Vis Femto, modelo 482; Potenciômetro Micronal, modelo B 374; Centrífuga Fanem, modelo Excelsa Baby I; Agitador magnético Fisatom; Balança analítica Sartorius, modelo BP 210S; Cabos de polietileno (0,8mm de diâmetro); Injetor comutador, modelo CENA 2:3:2; Interface PCL 711S; Liquidificador Arno; Cubeta de quartzo com 1cm de caminho óptico; Eletrodo de referência de calomelano, Analyser; Almofariz com pistilo, Seringas de 0,5 mL; Fio de cobre.

### Procedimento

#### Obtenção do extrato bruto enzimático (EBE)

Para obtenção do extrato bruto de inhame (*Alocasia macrorrhiza*), fonte de polifenol oxidase (PFO), o seguinte procedimento foi adotado: uma massa de 25,0 g do vegetal descascado foi picado e misturado com 100 mL de tampão fosfato 0,1 mol L<sup>-1</sup> (pH 8,0) e 2,5 g de agente protetor polivinilpirrolidona (PVP) Polyclar K-30, em um liquidificador, durante três minutos. A mistura foi filtrada em gaze dobrada em quatro e centrifugada a 5.000 rpm, durante 30 minutos, a 25°C.

A solução sobrenadante foi armazenada no refrigerador a 4°C e usada como fonte enzimática (CARUSO, C.S. et al, 1999; FATIBELLO, O.F. & VIEIRA, I.C., 2002; LUPETTI, K.O. et al, 2003; ROSATTO, S.S. et al, 2001; SIGNORI, C.A. & FATIBELLO FILHO, O., 1994).

#### Determinação da atividade enzimática

A atividade da polifenol oxidase (PFO) presente no extrato bruto enzimático de inhame foi determinada em triplicatas pela medida de absorbância em 410 nm, monitorando a formação da o-quinona (CARUSO, C.S. et al, 1999).

Mediu-se a velocidade de reação para as seguintes misturas reacionais: 0,05 a 0,2 mL de extrato bruto enzimático, 2,4 mL de adrenalina 0,05 mol L<sup>-1</sup> e completou-se o volume com tampão fosfato 0,1 mol L<sup>-1</sup> (pH = 8,0) para 3 mL em cubeta de quartzo. A atividade enzimática é numericamente igual ao coeficiente angular do gráfico da velocidade, em função da quantidade de enzima, multiplicado por mil (HARPER, H.A., 1973).

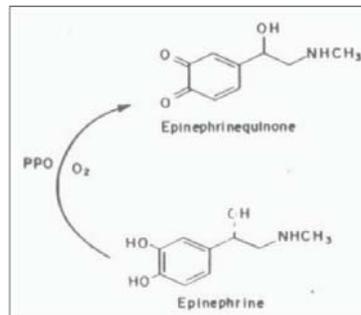


FIGURA 2 - Oxidação da adrenalina

### Construção dos biossensores

A pasta de grafite foi obtida, misturando-se 0,375 g de grafite em pó e volumes variáveis do extrato de enzima PFO em um almofariz com pistilo, durante 20 minutos. Em seguida, foram adicionados 0,125 g de vaselina, misturando-se, por mais 20 minutos. Logo após, a pasta foi introduzida em seringas de 0,5 mL e o contato elétrico foi feito, através de fio de cobre (figura 3).

Nos testes para determinar a concentração enzimática, construiu-se biossensores de 10, 25, 50, 100, 130, 150, 200 e 250 unidades. O biossensor foi alojado numa célula de fluxo e esta foi acoplada ao sistema FIA (CARUSO, C.S. et al, 1999; FATIBELLO, O.F. & VIEIRA, I.C., 2002; LUPETTI, K.O. et al, 2003; ROSATTO, S.S. et al, 2001; SIGNORI, C.A. & FATIBELLO FILHO, O., 1994).

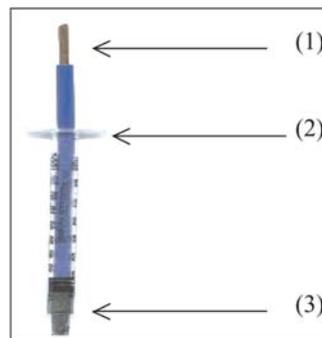


FIGURA 3 - Desenho esquemático do biossensor, (1) fio de cobre, (2). seringa, (3) pasta enzimática de grafite.

### Sistema de análise por injeção em fluxo

Os biossensores foram acoplados num sistema de análise por injeção em fluxo para determinação de adrenalina (figura 4).

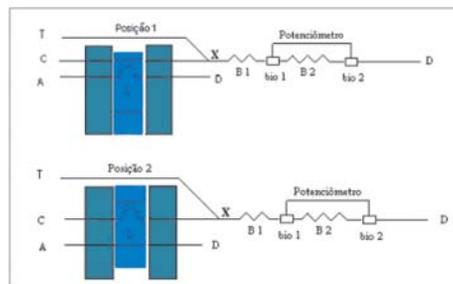


FIGURA 4- Diagrama de fluxos utilizado para determinação potenciométrica de adrenalina. (C) solução carregadora (água), (L) alça de amostragem (volume = 131µL), (A) representa a amostra (solução de adrenalina), (T) Tampão, (B1) reator (20 cm), (B2) reator (100 cm), (D) representa o descarte. Vazão total do sistema 3,28 mL. min<sup>-1</sup>.

No sistema proposto, o recipiente de solução carregadora, tampão e amostra foram mantidos em uma estante com 14 cm de altura em cima da bancada. O descarte foi mantido no piso do laboratório (93 cm em relação à bancada). Assim, esta diferença de altura gera um sistema a pressão constante e escoamento por gravidade com vazão total de 3,28 mL min<sup>-1</sup>. Desta forma, dispensa o uso de bombas peristálticas, tornando o sistema sem pulsações e menos dispendioso.

A amostra é inserida no sistema e transportada em direção aos detectores. No ponto de confluência X (figura 3), recebe o tampão fosfato 0,1 mol L<sup>-1</sup> (pH 8). Passa pelo reator (B1) e alcança o primeiro biossensor. Depois, se dirige ao reator de 100 cm e encontra o segundo biossensor. A distância entre os eletrodos foi de 100 cm, o que evitava a sobreposição dos sinais gerados, pois os dois biossensores funcionam, ora como eletrodo de referência, e ora como eletrodo indicador (FRENZEL, W., 1988).

Para a aquisição dos dados, utilizou-se uma interface PCL 711S e desenvolveu-se um programa escrito em uma planilha do Excel®, usando-se comandos (macros) do Visual Basic®.

### Realização das leituras

As soluções padrão de adrenalina eram preparadas, diariamente, em balões volumétricos, sendo que os volumes foram completados com tampão fosfato pH 8,0 no sistema fora de fluxo e com água no sistema FIA.

### Preparo dos padrões

Utilizaram-se ampolas de solução aquosa milesimal de adrenalina sem tratamento, as alíquotas de 131 mL foram aspiradas, no sistema FIA direto das ampolas.

## RESULTADOS E DISCUSSÕES

Inicialmente, obteve-se o espectro da adrenalina e, em seguida, fez-se o estudo da atividade enzimática no extrato bruto de inhame (*Alocasia macrorrhiza*). Posteriormente, fez-se o estudo do tempo de resposta e concentração enzimática ideal. A curva analítica e figuras de méritos foram determinadas para biossensor em sistema fora de fluxo e, em seguida, iniciaram-se testes em sistema em fluxo contínuo.

### Espectro da adrenalina

A figura 5 apresenta o espectro da adrenalina. Nota-se um maior sinal em 410 nm o qual foi adotado para os demais estudos. Este valor é condizente com o reportado na literatura (CARUSO, C.S., 1999).

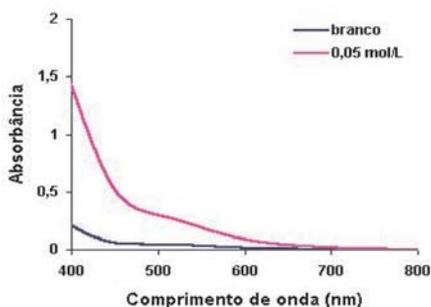


FIGURA 5- Espectro da adrenalina, concentração 0,05 mol L<sup>-1</sup> em tampão fosfato pH 8

### Determinação da atividade enzimática

O estudo da velocidade da reação de adrenalina catalisada pela PFO esta apresentado na figura 6.

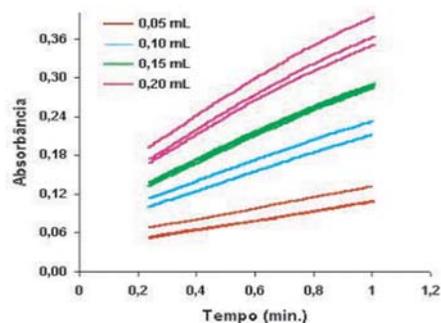


FIGURA 6- Estudo da velocidade da reação de adrenalina 0,05 mol L<sup>-1</sup>, em diferentes quantidades de extrato bruto enzimático.

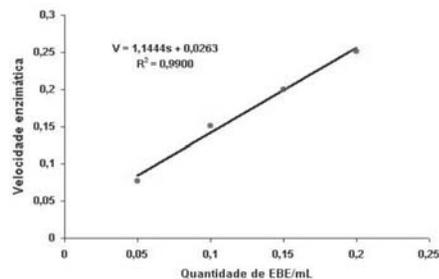


FIGURA 7 - Determinação da atividade enzimática da PFO.

A atividade enzimática é numericamente igual ao coeficiente angular do gráfico apresentado na figura 7 multiplicado por 1000. Assim, o extrato bruto enzimático estudado apresentou 1144,4 u mL<sup>-1</sup> de atividade.

### Estudo do tempo de resposta em função da concentração da enzima

No estudo do tempo de resposta, utilizou-se biossensores com concentrações de 10 a 250 unidades de PFO em tampão fosfato 0,1 mol L<sup>-1</sup> (pH 8,0). A resposta dos biossensores apresentou estabilidade, a partir de 150 segundos, conforme visto na figura 8. Assim, esse tempo foi fixado para as demais medidas.

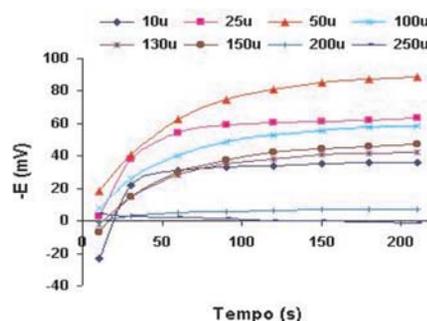
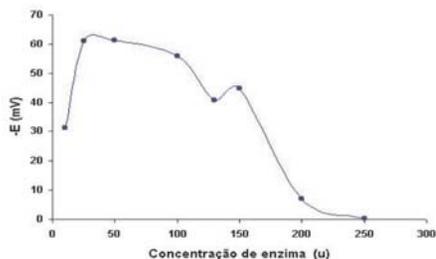


FIGURA 8- Estudo do tempo de resposta com diferentes concentrações enzimáticas nos biossensores em tampão fosfato 0,1 mol L<sup>-1</sup> (pH 8) para a adrenalina na concentração de 3x10<sup>-4</sup> mol L<sup>-1</sup>.

### Efeito da concentração de enzima

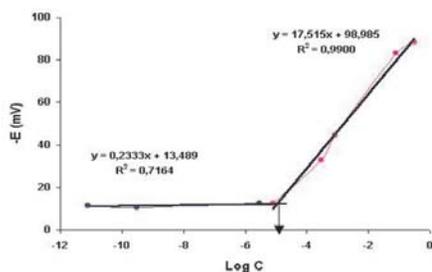
A figura 9 denota o efeito da concentração de enzima imobilizada sobre a resposta apresentada pelos biossensores com 10 a 250 unidades de PFO em tampão fosfato 0,1 mol L<sup>-1</sup> (pH 8,0). O biossensor de 50 u foi o que apresentou maior resposta, sendo que esta decrescia nos biossensores de concentrações superiores. Portanto, todos os outros biossensores construídos, posteriormente, apresentavam concentração enzimática de 50 unidades.



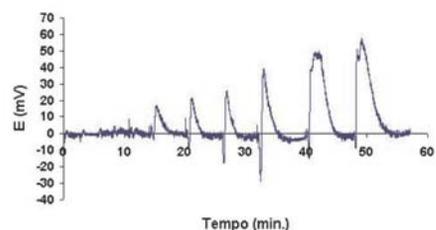
**FIGURA 9** - Efeito da concentração de enzima PFO em unidades sobre a resposta do biossensor, em tampão fosfato 0,1 mol L<sup>-1</sup> (pH 8) para a adrenalina 3x10<sup>-4</sup> mol L<sup>-1</sup>.

### Características analíticas do biossensor fora de fluxo contínuo

Foi feita a curva analítica com medidas fora de fluxo, utilizando-se soluções padrão de adrenalina de 8x10<sup>-12</sup> mol L<sup>-1</sup> a 3x10<sup>-1</sup> mol L<sup>-1</sup>, com biossensor de 50 unidades de PFO. O limite de detecção (LD) obtido foi de 1,13x10<sup>-5</sup> mol L<sup>-1</sup> e a faixa linear de resposta foi de 2x10<sup>-5</sup> mol L<sup>-1</sup> a 3x10<sup>-2</sup> mol L<sup>-1</sup>; conforme verifica-se na figura 10. Os registros dos sinais das soluções padrão para a curva analítica estão apresentados na figura 11



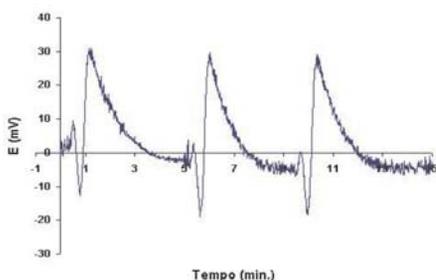
**FIGURA 10** - Curva analítica do biossensor de 50 unidades de PFO para adrenalina com concentração de 8x10<sup>-12</sup> mol L<sup>-1</sup> a 3x10<sup>-1</sup> mol L<sup>-1</sup>, denotando o limite de detecção (LD) e a faixa linear.



**FIGURA 11** - Introdução das soluções padrão: 3x10<sup>-7</sup> mol L<sup>-1</sup> a 3x10<sup>-1</sup> mol L<sup>-1</sup>

### Aplicações do sistema

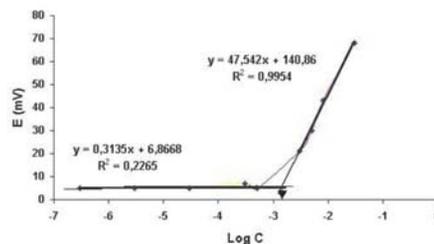
O medicamento foi introduzindo no sistema e obteve uma reprodução dos sinais, com concentração obtida de 5,38x10<sup>-3</sup> mol L<sup>-1</sup> e coeficiente de variação de 3,03% (figura 12).



**FIGURA 12**- Introdução do medicamento

### Características analíticas do biossensor no sistema FIA

Foi feita a curva analítica com medidas em fluxo utilizando soluções padrão de adrenalina de 3x10<sup>-7</sup> mol L<sup>-1</sup> a 3x10<sup>-1</sup> mol L<sup>-1</sup>, com biossensor de 50 unidades de PFO. O limite de detecção (LD) obtido foi de 1,46x10<sup>-3</sup> mol L<sup>-1</sup> e a faixa linear de resposta foram de 3x10<sup>-3</sup> mol L<sup>-1</sup> a 3x10<sup>-2</sup> mol L<sup>-1</sup>; conforme verifica-se na figura 13



**FIGURA 13**- Curva analítica do biossensor de 50 unidades de PFO para adrenalina com concentração de 3x10<sup>-7</sup> mol L<sup>-1</sup> a 3x10<sup>-1</sup> mol L<sup>-1</sup> denotando o limite de detecção (LD) e a faixa linear.

### CONCLUSÕES

O sistema FIA propiciou maior frequência analítica (10 determinações/hora), LD (1,46x10<sup>-3</sup> mol L<sup>-1</sup>). A principal limitação tem sido a adsorção do analito na membrana, o que diminui a vida útil do biossensor. O biossensor apresentou resultados satisfatórios para determinações em amostras de medicamentos injetáveis. Trata-se de uma alternativa viável e de baixo custo para a monitorização e controle de medicamentos contendo adrenalina.

### AGRADECIMENTOS

À FINEP (SNDCT/CT INFRA 0990/01) e à Capes, pelo suporte financeiro; ao CNPq, Programa PIBIC, pela bolsa IC concedida a Luciana Nascimento Moreira.

### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Adrenalina a Molécula da Ação. Disponível em: <http://www.qmcweb.org>. Acesso em 05 maio 2004.
2. CARUSO, C.S.; VIEIRA, I.C.; FATIBELLO FILHO, O. Determination of epinephrine and dopamine in pharmaceutical formulations using a biosensor based on carbon paste modified with crude extract of cara root (*Dioscorea bulbifera*). *Anal. Lett.*, v.32, n.1, p. 39, 1999.
3. COUTO, C. M. M.; MONTENEGRO, C. B. S. M. Detectores potenciométrico para sistemas de análise em fluxo, evolução e aplicação. *Química Nova*, v.23, n.6, p.774, 2000.
4. EGGINS, B.R. *Biosensor: An Introduction*, New York: Wiley Teubner, 1996.95p.
5. FATIBELLO, O.F.; CAPELATO, M.D. Biossensores, *Química Nova*, v.15, n.1, p.28, 1991.
6. FATIBELLO, O.F.; VIEIRA, I.C. Uso analítico de tecidos e de extratos brutos vegetais como fonte enzimática. *Química Nova*, v.25, n.3, p. 455, 2002.
7. FRENZEL, W. Enhanced performance of ion-selective electrodes in flow injection analysis: non-nerstian response, indirect determination, differential detection and modified reverse flow injection analysis. *Rev. Analyst.*, v.113, p. 1039, 1988.
8. GILMAN, A. G. *As Bases farmacológicas da terapêutica*. 9.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996.87p.
9. GUYTON, A.C.; HALL, J.E. *Tratado de fisiologia médica*, 9.ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1997.1014p.
10. HARPER, H. A. *Manual de química fisiológica*, 3.ed. São Paulo: Atheneu Editora São Paulo S. A., 1973.25p.
11. LUPETTI, K. O.; RAMOS L. A.; FATIBELLO FILHO, O. Dopamina em formulações farmacêuticas utilizando sistema de análise por injeção em fluxo com extrato bruto de abacate (*Persea americana*). *Química Nova*, v.26, n.2, p. 39, 2003.
12. ROSATTO, S.S.; FREIRE, R. S.; DURÁN, N.; KUBOTA, L. T. Biossensores amperométricos para determinação de compostos fenólicos em amostras de interesse ambiental. *Química Nova*, v.24, n.1, p.77, 2001.
13. RUZICKA, J.; HANSEN, E. *Flow Injection Analysis*, 2.ed, New York: Wiley Interscience, 1988.498p.
14. SIGNORI, C. A.; FATIBELLO FILHO, O. Biossensor Amperométrico de Fenóis Usando Extrato Bruto de Inhame (*Alocasia macrorrhiza*), *Química Nova*, V. 17, n.1, p.38, 1994.
15. SILVA, P. *Farmacologia*, 6.ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002.1246p.
16. ZAGATTO, E. A.; ARRUDA, M. A. Introdução à análise por injeção em fluxo. No XXXVI, Congresso Brasileiro de Química, São Paulo, 1996.