

Utilização da monocamada auto-organizada de ácido lipóico para imobilização da enzima peroxidase sobre CDtrodo de ouro

Carolina Venturini Uliana* (PG), Hideko Yamanaka (PQ). *uliana@iq.unesp.br

Departamento de Química Analítica, Instituto de Química – Unesp – Araraquara, SP.

Palavras Chave: monocamada auto-organizada, peroxidase, CDtrodo de ouro.

Introdução

A modificação de eletrodos utilizando monocamadas auto-organizadas (SAM: self-assembled monolayer) emprega camadas monomoleculares que exibem uma alta organização e que são formadas espontaneamente como consequência da imersão de uma superfície sólida em solução contendo um anfifílico apropriado¹. Alcanotióis e dissulfetos formam SAMs sobre o ouro e se os compostos tiolados forem dotados de grupos funcionais como -COOH e -NH₂, é possível utilizar a monocamada como ancoramento para biomoléculas por meio de ligações covalentes.

Este trabalho apresenta estudos da SAM formada a partir do ácido lipóico como meio de imobilização da enzima peroxidase sobre CDtrodos de ouro.

Resultados e Discussão

Os experimentos foram realizados em uma célula eletroquímica de 5,0 mL, usando um potenciostato/galvanostato PAR EG&G mod. 263 e Ag/AgCl, fio de platina e CDtrodos de ouro modificado como eletrodos de referência, auxiliar e trabalho, respectivamente. O CD de ouro foi lavado com HNO₃ concentrado, devidamente cortado² e a área do eletrodo delimitada com fita de galvanoplastia. Inicialmente, os CDtrodos foram imersos em uma solução etanol/água (1:10 v/v) de ácido lipóico 1,0 x 10⁻³ mol L⁻¹ por 15, 30, 60 e 120 min. Estudos por voltametria cíclica em K₄Fe(CN)₆ 1,0 x 10⁻² mol L⁻¹ foram realizados e então calculada a área do pico de oxidação do K₄Fe(CN)₆ antes e após a modificação.

A Figura 1 apresenta os voltamogramas obtidos na ausência e na presença da SAM formada em diferentes tempos. A formação da monocamada em um tempo de 120 min apresentou um maior recobrimento da superfície (40,2%) e a estabilidade da monocamada quando o eletrodo é submetido a ciclagens sucessivas foi significativamente maior às obtidas nos demais tempos de imersão.

O tempo de 120 min foi estabelecido para a formação da monocamada para imobilização da enzima peroxidase biotinilada (b-HRP), via proteína estreptavidina (STA). Para isto, realizou-se um estudo para otimização da concentração da STA e da carbodiimida (para ativar os grupos carboxila da

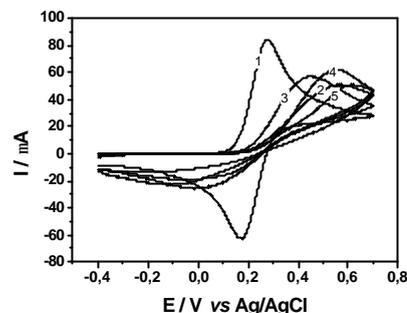


Figura 1: Voltamogramas cíclicos traçados em K₄Fe(CN)₆ 1,0 x 10⁻² mol L⁻¹ sobre CDtrodo não modificado (1) e após modificação por 15 (2), 30 (3), 60 (4) e 120 min (5) com ácido lipóico.

monocamada), e do tempo de incubação dos eletrodos na solução destes reagentes. A concentração da bHRP foi mantida constante (0,01 mg mL⁻¹) bem como o tempo de incubação do eletrodo com b-HRP (30 min). A modificação do eletrodo consistiu em: formação da SAM, imobilização da STA via carbodiimida, bloqueio da superfície com albumina de soro bovino (para evitar adsorção inespecífica) e imobilização da bHRP. As medidas eletroanalíticas foram realizadas por meio da cronoamperometria (E_i = +0,150V E_f = -0,05V), utilizando H₂O₂ 3,5x10⁻³ mol L⁻¹ (substrato enzimático) e ácido 5aminossalicílico 5,0x10⁻⁴ mol L⁻¹ (mediador de elétrons).

Os resultados indicaram que as concentrações de STA e carbodiimida de 0,1 mg mL⁻¹ e 1,0 x 10⁻² mol L⁻¹, respectivamente, com um tempo de incubação de 30 min, foram as melhores condições para imobilização da b-HRP.

Conclusões

A monocamada auto-organizada de ácido lipóico mostrou-se um suporte eficiente para imobilização da enzima peroxidase biotinilada.

Agradecimentos

CNPq

¹ Ferretti, S.; Paynter, S.; Russel, D.A.; Sapsford, K.E.; Richardson, D.J. *Trends Anal. Chem.* **2000**, *19*, 530.

² Angnes, L.; Richter, E.M.; Augelli, M.A.; Kume, G.H. *Anal. Chem.* **2000**, *72*, 5503.