



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA

PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

Laboratório de Filmes Poliméricos e Nanotecnologia LAFIP-NANOTEC

***DESENVOLVIMENTO DE BIOSSENSOR
ENZIMÁTICO PARA DIAGNÓSTICO DE LESÃO NO
TECIDO HEPÁTICO***

Aluno: Lara Ferreira Paraiso

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Ana Graci Brito Madurro

Co-orientador: Prof. Dr. João Marcos Madurro

Uberlândia - MG

2011

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA

PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

***DESENVOLVIMENTO DE BIOSSENSOR
ENZIMÁTICO PARA DIAGNÓSTICO DE LESÃO NO
TECIDO HEPÁTICO***

Lara Ferreira Paraíso

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica, do Instituto de Genética e Bioquímica da Universidade Federal de Uberlândia, como requisito à obtenção do título de mestre em Genética e Bioquímica.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Ana Graci Brito Madurro

Co-orientador: Prof. Dr. João Marcos Madurro

Uberlândia - MG

2011

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

P222d Paraiso, Lara Ferreira, 1986-
Desenvolvimento de biossensor enzimático para diagnóstico de lesão no tecido
hepático [manuscrito] / Lara Ferreira Paraiso. – 2011.

62 f. : il.

Orientadora: Ana Graci Brito Madurro.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica.

Inclui bibliografia.

1. Eletroquímica - Teses. 2. Fígado – doenças – Teses. 3. Biossensores - Teses I. Madurro, Ana Graci Brito. II. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica. III. Título.

CDU: 544.6

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA

PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

***DESENVOLVIMENTO DE BIOSSENSOR
ENZIMÁTICO PARA DIAGNÓSTICO DE LESÃO NO
TECIDO HEPÁTICO***

Lara Ferreira Paraíso

Comissão Examinadora:

Presidente: Ana Graci Brito Madurro

Examinadores: Roney Santos Coimbra
Sheila Cristina Canobre

Data da Defesa: 26 /07 /2011

As sugestões da Comissão Examinadora e as Normas PGGB para o formato da Dissertação/Tese foram contempladas

Ana Graci Brito Madurro

Quando alguém encontra seu caminho precisa ter coragem suficiente para dar passos errados. As decepções, as derrotas, o desânimo são ferramentas que Deus utiliza para mostrar a estrada.

Paulo Coelho

*A minha mãe Ozanita e meu pai João Carlos, vocês são
exemplos de caráter, dignidade, luta, confiança,
humildade e fé. Por todo carinho, preocupação e amor,
e por estarem sempre presentes.*

A vocês agradeço e dedico a minha alegria.

AGRADECIMENTOS

- ❖ Agradeço primeiramente a **Deus**, meu Amado Pai, que nunca permitiu que eu desistisse. Sempre me deu confiança, paciência e disposição para trabalhar. Por sempre renovar minhas forças dia após dia, me dando sabedoria para alcançar esta vitória.
- ❖ Aos meus amados pais, **João Carlos** e **Ozanita**, que sempre estiveram presentes em todos os momentos da minha vida, sofrendo e torcendo por mim. Obrigado por nunca medirem esforços para que meus sonhos fossem alcançados, por sempre acreditarem nas minhas capacidades, e por me ensinarem a dar valor nas pequenas coisas, hoje sou o que sou graças à dedicação incondicional de vocês.
- ❖ Ao meu amor, **Moisés**, obrigada pelos anos de companheirismo, dedicação e amor. Por me amar, ser meu porto-seguro, meu amigo e estar junto comigo nesta caminhada, compartilhando tantos momentos de felicidade ao meu lado. Obrigada por sempre me incentivar a crescer e lutar pelos meus ideais, por acreditar e sempre contribuir para meu crescimento profissional. Amo muito você!
- ❖ Minha irmã **Lorennna**, obrigada por ser uma irmã presente, carinhosa e amiga.
- ❖ Minhas amadas avós, **Aurora** e **Fátima**, por serem pessoas tão especiais. Obrigada pelos ensinamentos de fé, pelas orações e pelo carinho.
- ❖ A minha maravilhosa família, todos vocês são muito importantes para mim. Obrigada pelo incentivo, pela força, carinho e amor. Amo muito vocês!
- ❖ A querida professora **Ana Graci Madurro**, por ser uma orientadora presente, que acima de tudo acreditou no meu potencial desde o início, me ensinando eletroquímica, e me ajudando em cada passo dado nesta fase da vida. Obrigada professora pelos seus ensinamentos, sua paciência e compreensão.
- ❖ Ao Professor **João Marcos Madurro**, pelo incentivo, confiança e pelas contribuições científicas deste trabalho.
- ❖ Ao meu colega de laboratório **Diego Leoni Franco**, pelos ensinamentos, dedicação e paciência. Meus sinceros agradecimentos por me ajudar desde o início desta caminhada, com

muita disposição e alegria, me ensinado desde as coisas mais simples as mais complexas. Obrigada pelas soluções encontradas, que me ajudaram a seguir em frente perante aos inúmeros obstáculos encontrados no decorrer destes últimos 2 anos. Obrigada por tudo que fez por mim para a realização deste trabalho.

- ❖ A querida família **LAFIP**, que me recebeu de braços abertos. Aos colegas Ana Cristina, Ana Consuelo, Diego, Deusmaque, Erick, Heden, Isabela, Isabella, José Manuel, Leticia, Lucas, Luciano, Miquéias, Pâmela, Renata e Vinicius. Vocês além de colegas se tornaram meus amigos. Compartilhamos diversos momentos de grande felicidade que com certeza não serão esquecidos. Aprendi com vocês o que significa trabalho em equipe, obrigado à todos sem exceção, que sempre mantiveram o bom humor em todas as situações e tiveram paciência e disposição para me ajudar. Tenho um carinho especial por cada um de vocês e orgulho de pertencer à esta família, a amizade cultivada com vocês permanecerá para sempre.
- ❖ A todos os **professores** do curso de Genética e Bioquímica, obrigada pelo conhecimento compartilhado e as contribuições dadas para minha formação.
- ❖ Ao **Gerson Fraissat** pela paciência e disponibilidade sempre que precisei.
- ❖ A **Capes**, pelo apoio financeiro.
- ❖ Aos membros da banca que aceitaram cordialmente participar e contribuir para o aprimoramento deste trabalho.

A todos vocês, me faltam palavras para demonstrar meus sinceros agradecimentos, por contribuir de alguma forma para realização deste trabalho e para meu crescimento profissional, o **MEU MUITO OBRIGADO!**

ÍNDICE

ABREVIATURAS.....	X
ÍNDICE DE FIGURAS – CAPÍTULO 1.....	xi
ÍNDICE DE FIGURAS – CAPÍTULO 2.....	xi
APRESENTAÇÃO.....	1
CAPÍTULO 1: FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	2
1.ANATOMIA E FUNÇÕES DO FÍGADO	3
2.DIAGNÓSTICO DAS HEPATOPATIAS E DOENÇAS RELACIONADAS	6
3.FORMAS DE DOSAGEM DE ALT.....	8
4.BIOSSENSORES.....	8
4.1. BIOSSENSORES ENZIMÁTICOS.....	11
4.2. TÉCNICAS DE IMOBILIZAÇÃO	12
5. UTILIZAÇÃO DE POLÍMEROS CONDUTORES PARA A CONSTRUÇÃO DE BIOSSENSORES.....	14
6.OBJETIVOS	18
6.1. OBJETIVO GERAL.....	18
6.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	18
7.REFERÊNCIAS.....	19
CAPÍTULO 2:	28
Immobilization of pyruvate oxidase onto graphite electrode modified with poly(4-aminophenol) for detection of alanine aminotransferase .	28
Abstract.....	30
1. Introduction.....	31
2. Experimental Section.....	32
2.1. Apparatus	32
2.2. Chemical	32
2.3. Electrode surface modification.....	33
2.4. Thermal stability of the modified electrode.....	33
2.5. Immobilization of the PyO and detection of ALT	33

2.6. Interference studies	33
2.7. Bioelectrode stability.....	34
3. Results and Discussion	34
3.1. Stability studies of the electrode modified with poly(4-aminophenol).....	34
3.2. Immobilization of PyO on the modified electrode	34
3.3. Morphological characterization of the bioelectrode using atomic force microscopy.....	35
3.4. Detection of alanine aminotransferase.....	35
3.5. Sensitivity of bioelectrode for ALT	36
3.6. Interference study.....	36
3.7. Electrode stability	37
4. Conclusion.....	37
Acknowledgments	37
References..	38

ABREVIATURAS

AGL: Ácidos graxos livres

4-APP: 4-aminoantypirine

AA: Ascorbic acid

AFM: Atomic force microscopy

ALT: Alanina aminotransferase

DM2: Diabetes mellitus tipo 2

EHNA: Esteatose hepática não alcoólica

FAD: Flavin adenine dinucleotide

Glu: Glucose

Glut: Glutamate

GPT: Transaminase glutâmico pirúvica

NASH: Esteohepatite não alcoólica

PyO: Piruvato oxidase

RI: Resistência a insulina

SM: Síndrome metabólica

TAG: Triacilgliceróis

TPP: Pyrophosphate

UA: Uric acid

VLDL: Lipoproteínas de muito baixa densidade

α -KG: α -ketoglutarate

ÍNDICE DE FIGURAS – CAPÍTULO 1

Figura 1: Visão esquemática da anatomia do fígado	4
Figura 2: Reação de transaminação catalisada pela ALT.	7
Figura 3: Representação esquemática do biossensor.....	9
Figura 4: Esquema representativo dos quatro principais métodos de imobilização de biomoléculas. (a) Adsorção Física, (b) Ligação Covalente, (c) Oclusão (d) Ligação Cruzada.	14
Figura 5: Esquema mostrando várias aplicações conhecidas e propostas para polímeros condutores, em função das suas propriedades.....	15

ÍNDICE DE FIGURAS – CAPÍTULO 2

Figure 1. Stability study onto graphite electrode modified with poly(4-aminophenol) submitted to the temperature of 8°C. Cyclic voltammetries were realized in HClO ₄ solution (0.5 mol.L ⁻¹).....	43
Figure 2. Cyclic voltammograms of graphite electrode modified with poly-(4-aminophenol) in absence (a) or presence of PyO (b), in KCl solution (0.1 mol.L ⁻¹) containing K ₃ Fe(CN) ₆ (5 mmol.L ⁻¹), K ₄ Fe(CN) ₆ (5 mmol.L ⁻¹), 100 mV.s ⁻¹	44
Figure 3. AFM images of graphite (A), graphite/poly(4-aminophenol) (B), graphite/poly(4-aminophenol)/PyO (C).....	45
Figure 4. Schematic diagram displaying the enzyme and electrode reactions involved in the ALT activity onto graphite electrode modified with poly (4-aminophenol). PyO: pyruvate oxidase, ALT: alanine aminotransferase; 4-APP: 4-aminoantipyrine.	46
Figure 5. ALT detection based on graphite electrode modified with poly (4-aminophenol) using 4-aminoantipyrine as electrochemical indicator. (A) Linear voltammogram, (B) Amperometric response at +0.24V. Absence of ALT (—) and presence of ALT (---). All detection was done in phosphate buffer, pH 7.4.	47
Figure 6 (A) Linear voltammetries of bioelectrode for alanine aminotransferase, based on pyruvate oxidase immobilized on graphite electrode modified with poly (4-aminophenol) and 4-aminoantipyrine as electrochemical indicator, in absence or presence of different concentrations of ALT. (B) Calibration curves of	

bioelectrode for ALT. Inset: Oxidation charge of 4-aminoantipyrine versus logarithmic concentration of ALT. Electrolyte: phosphate buffer, pH 7.4. 48

Figure 7. Linear voltammograms of ALT detection, in absence (a) or presence of interferents: uric acid, 1mg/dL (b), glutamate, 1mM (c), glucose, 1mM (d) ascorbic acid, 3.6 mg/dL (e). Eletrolyte: phosphate buffer (0.1 mol.L^{-1}), pH 7.4, 100 V/s. Inset: selectivity coefficient of bioelectrode. 49

Figure 8. Operational stability of the ALT bioelectrode. 50

APRESENTAÇÃO

Doenças hepáticas são um problema de saúde pública visto que a taxa de mortalidade por doenças do fígado e causas relacionadas está crescendo gradativamente. Os fatores relacionados com este aumento incluem consumo abusivo de bebidas alcoólicas e desenvolvimento de síndrome metabólica, visto que a obesidade e as doenças relacionadas afetam diretamente as funções hepáticas.

O diagnóstico das principais doenças do fígado é feito com base na detecção da enzima alanina aminotransferase (ALT). Sua mensuração pode ser realizada utilizando diferentes técnicas, sendo as eletroquímicas as que se destacam. O desenvolvimento de biossensores eletroquímicos para diagnóstico de doenças é uma ferramenta promissora devido às vantagens que estes dispositivos apresentam como: miniaturização análise em tempo real, alta sensibilidade e seletividade. Desta forma, frente à importância de se ter dispositivos cada vez rápidos, de fácil manuseio, de baixo custo e confiáveis para detecção de ALT, o presente trabalho visa o desenvolvimento de um biossensor eletroquímico para análise indireta de ALT, utilizando eletrodo de grafite modificado com poli (4-aminofenol).

CAPÍTULO 1:
FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

1. ANATOMIA E FUNÇÕES DO FÍGADO

O fígado é o maior órgão sólido e metabolicamente complexo do corpo. Está localizado no quadrante superior direito da cavidade abdominal, abaixo do diafragma, estando protegido pela caixa torácica [1]. Consiste de dois lóbulos, cada um contendo outros múltiplos lóbulos e sinusóides. O fígado recebe 75% de sua demanda de sangue pela veia portal, que trás sangue proveniente do coração, intestino delgado, estômago, pâncreas e baço. Os 25% remanescentes são de sangue arterial, levado ao fígado pela artéria hepática [2] (**Figura 1**).

As células primárias do fígado são os hepatócitos, também conhecidos como células parenquimáticas que formam os lóbulos do fígado. Representam 80% do volume do fígado. Os outros 40% são células não parenquimáticas que constituem as células que revestem as paredes dos sinusóides. As células de revestimento são células endoteliais, células de Kupffer e células estreladas [1].

Os hepatócitos são responsáveis pelas funções biológicas hepáticas como a metabolização de algumas substâncias (por exemplo, o álcool etílico e uma gama de drogas) e pela produção da bile [3].

Devido às suas conexões anatômicas e suas funções bioquímicas, o fígado exerce um papel central no metabolismo, nos processos digestivos, desintoxicantes e de eliminação de várias substâncias do corpo. Ele recebe sangue venoso do intestino de modo que todos os produtos da digestão, mais as drogas e outros xenobióticos ingeridos, passam por ele antes de entrar na circulação sistêmica. Metabolicamente é responsável pela síntese e degradação do *heme*, na síntese dos ácidos biliares, além de atuar no metabolismo dos carboidratos, lipídeos e proteínas [1].

A avaliação das funções do fígado é importante para o diagnóstico de diversas desordens clínicas como a hepatite A, B, e C, cirrose, esteatose hepática não alcoólica (EHNA), hepatite induzida por drogas [4] carcinoma hepatocelular [5] e síndrome metabólica (SM) [6].

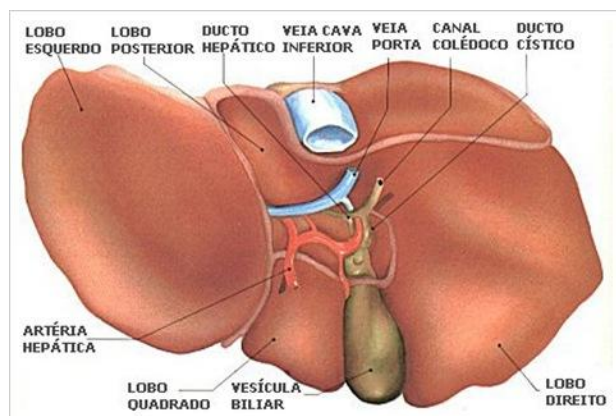


Figura 1: Visão esquemática da anatomia do fígado [7]

Atualmente estudos sobre mortalidade enfatizam a importância das causas relacionadas às doenças do aparelho circulatório, neoplasias malignas e causas externas. Entretanto, muito pouco é conhecido sobre a análise das doenças hepáticas, que também formam um importante agrupamento de causas de morte [8]. No Brasil, por exemplo, dados do ministério da saúde registraram um total de 751 óbitos e taxa de mortalidade 17,78 nos estados brasileiros, referente apenas ao mês fevereiro de 2011 (tabela 1) [9].

Tabela 1: Dados relacionados à doença do fígado registrados em fevereiro de 2011, nos estados brasileiros.

Região/UF	Internações	Óbitos	Taxa de Mortalidade
TOTAL	4225	751	17,78
Região Norte	264	41	15,53
Região Nordeste	1.086	186	17,13
Região Sudeste	1.913	381	19,92
Região Sul	749	99	13,22
Região Centro-Oeste	213	44	20,66

Fonte: Ministério da Saúde - Sistema de Informações Hospitalares do SUS (SIH/SUS) [9].

Inúmeras doenças podem ocasionar lesões no tecido hepático. De um modo geral, independente da etiologia ou grau de fibrose, esta gama de

patologias é denominada hepatopatia [10]. As principais hepatopatias, são descritas e caracterizadas a seguir:

Esteatose hepática (EH): É o termo geral utilizado para caracterizar acúmulo excessivo de gordura no fígado. Acumulam-se mais comumente triacilgliceróis (TAG), pois possuem a taxa de renovação mais elevada de todos os ésteres de ácidos graxos hepáticos. Nesta patologia, a captação hepática de ácidos graxos livres (AGL) do tecido adiposo e da dieta é desimpedida, enquanto que o descarte dos AGL por meio de oxidação, esterificação e secreção de proteínas de muito baixa densidade (VLDL) está limitado. A origem da esteatose pode estar relacionada ou não com o uso abusivo de álcool. Quando não está relacionada, a origem e os fatores que contribuem para o seu desenvolvimento incluem resistência a insulina (IR) [11,12], obesidade [13], diabetes mellitus tipo 2 (DM2) [14] e fatores genéticos [15] .

Esteatose hepática não alcoólica (EHNA): É a doença de fígado mais comum nos Estados Unidos e possivelmente do mundo atingindo proporções de epidemia [16]. É definida como acúmulo de gordura no fígado acima de 5-10% do peso, em indivíduos que não consomem quantidades significativas de álcool e não possuem evidências laboratoriais de auto-imunidade, vírus, doença hepática induzida por toxinas ou erros inatos do metabolismo [14]. Pacientes com EHNA geralmente apresentam níveis elevados de alanina aminotransferase (ALT), hepatomegalia, inflamação e necrose [11].

Esteatohepatite não alcoólica (NASH): É o quadro clínico evoluído da EHNA. O fígado de pacientes com NASH apresenta um grau elevado de inflamação, estresse oxidativo, disfunção mitocondrial, necrose e fibrose. A predisposição de desenvolver cirrose e carcinoma hepatocelular se torna bastante proeminente em pacientes com NASH [15].

Hepatopatia alcoólica: Compreende um espectro de síndromes clínicas e alterações patológicas no fígado provocadas pela ingestão de álcool, variando do acúmulo simples de gorduras neutras nos hepatócitos (esteatose hepática alcoólica) até cirrose e carcinoma hepatocelular. Não existe uma dose de ingestão de álcool precisa que irá acarretar o desenvolvimento de doença hepática alcoólica. Contudo dos consumidores de álcool à longo prazo, 90-100%

desenvolverão EH, porém apenas 10-35% desenvolverão hepatite alcoólica e 8-20% desenvolverão cirrose alcoólica [17].

Hepatite alcoólica: Inclui a alteração gordurosa macrovesicular mais uma resposta inflamatória difusa à lesão e necrose (freqüentemente focal); uma cirrose estabelecida também pode estar presente. A hepatite alcoólica, com seus infiltrados celulares inflamatórios difusos e necrose, é vista freqüentemente como o estágio intermediário entre a esteatose hepática e a cirrose [18].

Cirrose: A cirrose não é uma doença independente, mas é a condição terminal de outras doenças do fígado causadas pelo vírus da hepatite, álcool, desordens metabólicas, colesterase, desordens circulatórias, autoimunidade, substâncias tóxicas, drogas, infecções diferentes das relacionadas com a hepatite viral, doenças congênitas e razões desconhecidas que não têm cura e progridem cronicamente [19].

Carcinoma hepatocelular: É o câncer de fígado que surgiu de hepatócitos. É o quinto câncer de maior ocorrência mundial e o terceiro no *ranking* de mortalidade [20]. A cirrose é o maior fator de risco para seu desenvolvimento, outras causas podem estar relacionadas, dentre elas: cirrose descompensada, hepatites virais, NASH, DM2 e fatores genéticos [21].

A forma mais precisa de diagnóstico das doenças hepáticas é por meio da avaliação por biópsia do órgão lesionado, geralmente não indicada por ser um método agressivo. A análise sanguínea, principalmente a quantificação das enzimas hepáticas, com destaque para as transaminases é um método confiável e relevante para diagnosticar estas patologias.

2. DIAGNÓSTICO DAS HEPATOPATIAS E DOENÇAS RELACIONADAS

As estratégias mais eficientes para a detecção das hepatopatias são baseadas no ensaio para quantificação das transaminases denominadas aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase ou transaminase glutâmico pirúvica (ALT/GPT) em amostras de sangue. Embora ambas transaminases apresentem concentrações elevadas no soro sempre que os processos patológicos afetam a integridade da célula hepática, a ALT é a enzima

mais específica do fígado, pois a AST é encontrada em maiores proporções em outras células, além disso, sua atividade mantém-se elevada durante mais tempo comparado com a ALT [22].

A principal fonte de ALT é o fígado, mas também pode ser encontrado em menores quantidades nos rins, coração, músculo esquelético e pâncreas [23]. No fígado, localiza-se no citoplasma (90%) e na mitocôndria (10%). A ALT catalisa a transferência do grupo amina da alanina para o alfa-cetoglutarato com formação de piruvato e glutamato [24] (**Figura 2**).

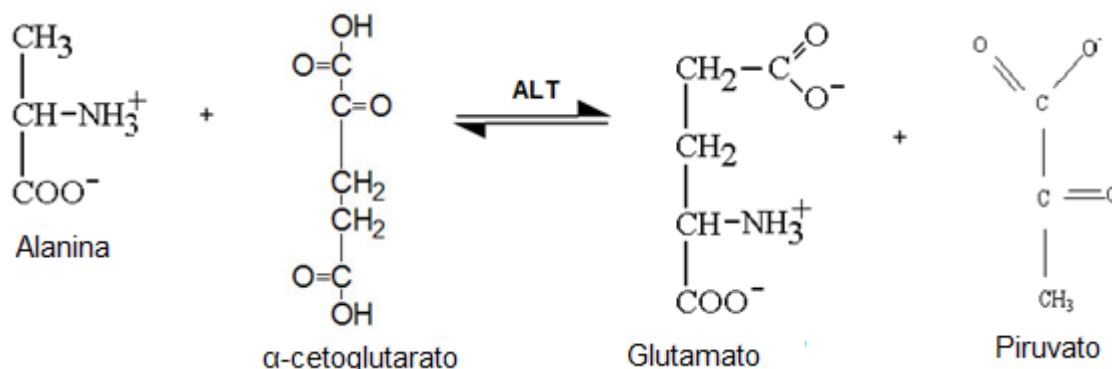


Figura 2: Reação de transaminação catalisada pela ALT.

Pequenas alterações nos níveis de ALT são encontradas nas hepatites crônicas (especialmente hepatite C e NASH) e uma elevação mais acentuada é encontrada nas hepatites alcoólica e agudas virais [25]. Alterações plasmáticas também são observadas no soro de pacientes com cirrose, necrose hepática, colestase, isquemia hepática, tumor hepático, drogas hepatotóxicas, icterícia obstrutiva, miosite e pancreatite [17]. Recentes estudos demonstraram que níveis alterados de ALT também estão associados à obesidade, IR, DM2 e outras doenças relacionadas à SM [10-13].

Em circunstâncias normais, a ALT, encontra-se dentro das células hepáticas, contudo na incidência de uma lesão ou injúria, ocorre rompimento destas células, causando um extravasamento desta enzima para o sangue, resultando em um aumento significativo nas concentrações séricas desta enzima [26].

Dessa forma, a ALT além de ser uma importante ferramenta para diagnóstico das hepatopatias e grau de lesão hepática, a sua mensuração já é utilizada para diagnosticar outras doenças metabólicas devido à forte relação existente com as mesmas.

3. FORMAS DE DOSAGEM DE ALT

A concentração normal no sangue de ALT é de 5 – 40UL⁻¹, no sangue e no plasma, respectivamente. No entanto, quando o órgão esta doente ou danificado, os níveis de ALT podem aumentar mais de 50 vezes acima do nível normal, sendo uma elevação moderada entre 96-240 UL⁻¹ e alta entre 240-960 UL⁻¹ [27].

As principais estratégias para a detecção de ALT incluem técnicas espectrofotométricas, quimioluminescentes, cromatográficas, fluorescentes, além de radioquímicas e eletroquímicas [28,25]. Das técnicas convencionais como a espectrofotometria, há certas desvantagens, como a análise da amostra ser realizada em laboratórios clínicos, requerindo reagentes complexos, caros e mão-de-obra especializada [29]. Assim, uma maior atenção tem sido dada nos últimos anos às técnicas eletroquímicas, que normalmente são baseadas em dispositivos minituarizados, com uso de pequenas quantidades de amostra, procedimentos simples e altamente sensíveis, com grau elevado de especificidade e confiabilidade nos dados obtidos. Biossensores eletroquímicos são exemplos de dispositivos com essas vantagens.

4. BIOSSENSORES

Durante os últimos 20 anos, a pesquisa e desenvolvimento global no campo de sensores tem crescido exponencialmente em termos de investimento financeiro, publicações na literatura e número de pesquisadores ativos [30]. Um sensor químico é um dispositivo que transforma uma informação química, variando desde a concentração específica de um componente da amostra até a análise de sua composição total, em um sinal analítico [31].

O termo biossensor refere-se a um dispositivo analítico que contém um material biológico sensível imobilizado, tal como enzimas, anticorpos/antígenos, DNA, bactérias, tecidos, etc. interligado a um transdutor, responsável por

identificar e converter um sinal baseado nas alterações biológicas em um sinal quantitativo, diretamente proporcional a concentração do analito [32].

Tais dispositivos são importantes ferramentas analíticas utilizadas para diagnóstico clínico [28], na detecção de fármacos, resíduos ambientais [33], controle e qualidade da água e de alimentos [34], controle de doenças, na indústria de bebidas [35], dentre outras. Oferecem diversas vantagens sobre os métodos existentes, tais como menos tempo de análise, baixo custo, miniaturização, elevada seletividade e sensibilidade [28] e capacidade de detecção em tempo-real que é desejado na análise clínica e biomédica, particularmente em diagnósticos próximos aos pacientes, onde o teste deve ser rápido e um pequeno volume de amostras é requerido [36,37].

Sendo assim, os sensores baseados em biomoléculas contribuem para o estabelecimento das técnicas analíticas, representando uma nova ferramenta para a determinação de analitos (glicose, uréia, lactato, colesterol, DNA, antígenos, anticorpos) em fluidos corpóreos como o sangue [30,38].

Uma gama de configurações destes dispositivos confere grande versatilidade no desenvolvimento dos biossensores, dependendo das características do elemento biológico e do transdutor utilizado. A **figura 3** demonstra o esquema representativo de um biossensor.

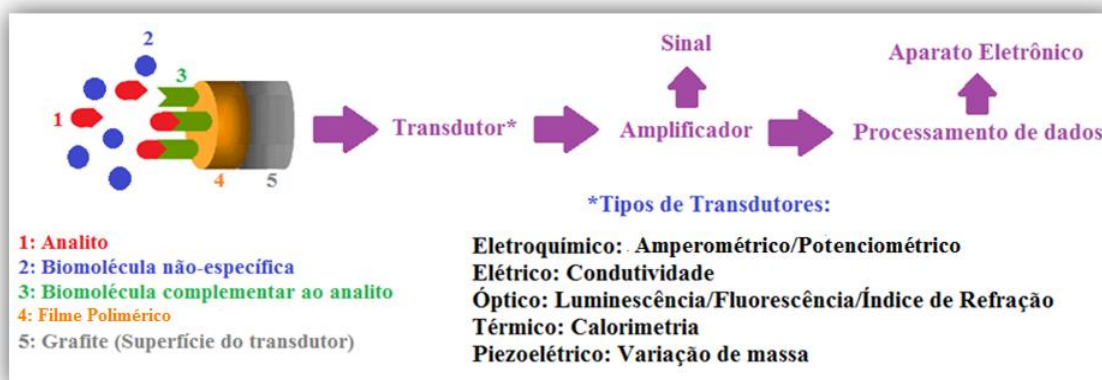


Figura 3: Representação esquemática do biossensor [39].

O tipo de transdução de sinal está diretamente relacionado à característica física ou química do produto gerado pelo componente biológico [40,41]. Dentre os transdutores, um dos mais utilizados para a construção de biossensores é o eletroquímico. Dentre as diversas técnicas utilizando esse transdutor, a voltametria

cíclica tem se mostrado eficaz. Esta técnica mensura a corrente produzida pelos processos de oxidação-redução que ocorrem na superfície de um eletrodo através de variação de potencial. A resposta obtida é proporcional à concentração do analito [28].

Os transdutores eletroquímicos comumente utilizados na construção dos biossensores são os eletrodos condutores. Dos diversos materiais empregados como ouro, platina, carbono vítreo, destaca-se o uso de carbono grafite devido as suas vantagens tais como: baixo custo, monitoramento *on site*, fácil manuseio, e grandes possibilidades de modificação da superfície.

O material biológico a ser imobilizado na superfície do transdutor é denominado camada de bioreconhecimento. Dependendo da natureza deste material, pode ser dividida em duas grandes classes: Os biocatalisadores (enzimas, microrganismos, materiais teciduais) e os bioligantes (anticorpos, ácidos nucleicos, lectinas) [34].

Uma forma de classificar os biossensores é pelo tipo de molécula que é imobilizada na superfície do transdutor. De tal maneira, os biossensores são divididos em: **Enzimáticos**, **Genossensores**, **Imunossensores** e **Microbiológicos**. O princípio de funcionamento de cada um dos respectivos biossensores pode ser entendido da seguinte maneira:

Enzimáticos: baseiam-se na imobilização de enzimas, tendo seu princípio de funcionamento baseado na atividade específica sobre um composto (substrato) ou uma determinada classe de compostos. O funcionamento desses biossensores pode também envolver a inibição da enzima pelos referidos compostos, afetando a quantidade de substrato consumido ou produto gerado, ou pelo monitoramento direto da espécie eletroativa gerada/consumida na catálise enzimática [34,42].

Genossensores: baseiam-se na imobilização de fragmentos de DNA ou oligonucleotídeos. A chamada simples fita (ssDNA), após interação com alvo complementar regenera a dupla fita (dsDNA), num processo denominado de hibridização. Este sinal pode ser detectado diretamente pela oxidação-redução das bases nitrogenadas do DNA que pode ser auxiliado pelo uso de mediadores, reduzindo o potencial de reação como compostos a base de cobalto ou rutênio [43]. A detecção pode ser indireta pelo uso de indicadores, como brometo de

etídio, azul de metileno que possuem afinidades diferentes por sistemas contendo simples e duplas fitas [44].

Imunossensores: baseiam-se no uso de um anticorpo que reage especificamente com uma substância (antígeno) a ser testada. A imobilização do receptor (por exemplo, antígeno) sobre um substrato é conveniente para aplicações de reconhecimento biomolecular para detecção da molécula alvo (por exemplo, anticorpo) presente na solução. A especificidade da interação antígeno-anticorpo permite o desenvolvimento de imunossensores para diagnósticos clínicos, monitoramento ambiental, dentre outros [34].

Microbiológicos: consiste na imobilização de células microbiológicas sobre o transdutor. O princípio de operação destes biossensores é baseado no uso das funções metabólicas e respiratórias do microorganismo para detectar um analito que seja o substrato ou um inibidor destes processos. Lei e colaboradores [45] reportaram algumas das recentes aplicações dos biossensores microbiológicos no monitoramento ambiental e para o uso em alimentos, fermentação e campos similares.

4.1. BIOSSENSORES ENZIMÁTICOS

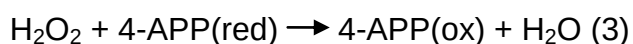
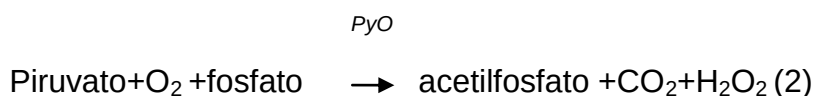
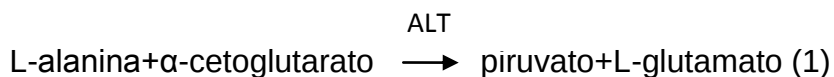
Biossensores enzimáticos estão atraindo atenção generalizada na área clínica, ambiental e biotecnológica. Trata-se de um dispositivo que combina sensibilidade e seletividade de uma enzima com um transdutor. Para alcançar elevada sensibilidade, rápido tempo de resposta, e estabilidade química dos materiais responsáveis pelo reconhecimento, métodos de imobilização e estabilização adequados para a enzima e o mediador devem ser explorados [46-48].

Sabe-se que enzimas são estruturas complexas, que possuem grupos catalíticos e muitas vezes requerem cofatores específicos ou coenzimas para desempenhar catálises bioquímicas [49]. Todas as enzimas possuem centros ativos. Neste local, processam-se as reações específicas com determinados substratos. Esse centro ativo é geralmente constituído de resíduos de aminoácidos de uma cadeia de proteína, e um grupo não-protéico, sendo responsável pela atividade biológica. Algumas dependem somente da sua própria

estrutura protéica (apoenzima) para exercer sua atividade, enquanto outras necessitam também de um ou mais componentes não-protéicos chamados de cofatores, que podem ser íons metálicos (metaloenzimas) ou moléculas orgânicas (coenzimas) ou ambos. O complexo cataliticamente ativo enzima-cofator é denominado de holoenzima [50,51].

Alguns biossensores são encontrados na literatura para mensuração de ALT, diversas estratégias são propostas, mas a maioria utilizando sistemas complexos envolvendo transdutores de alto custo como ouro e platina [52,53]. De forma que dispositivos mais adequados, simples e de baixo custo são necessários.

Este trabalho propõe o desenvolvimento de um biossensor para a medida de ALT, de acordo com as reações 1, 2 e 3 indicadas abaixo:



4.2. TÉCNICAS DE IMOBILIZAÇÃO

As técnicas de imobilização de biomoléculas mais utilizadas são as de formação de ligação covalente e adsorção [54]. Outros processos como os de ligação cruzada (*cross-linking*) e oclusão (*entrapment*) também são utilizados [55,56]. Podemos destacar as características de cada procedimento como:

Adsorção física: baseia-se na formação de forças atrativas de Van der Waals, ligações de hidrogênio e complexos de transição de elétrons entre as biomoléculas e o eletrodo. Este método, não exige qualquer modificação química

causando menos dano a biomolécula, e possui a vantagem da simplicidade, requerendo apenas uma solução contendo o componente biológico [57,58].

Ligação covalente: esta técnica baseia-se na reação entre grupos funcionais terminais da biomolécula, não essenciais à atividade biológica e grupos reativos da superfície do transdutor, dentre as diversas superfícies pode-se ter um filme polimérico. Embora esta técnica possua a vantagem de dificilmente o componente biológico se desprender da matriz de suporte, é extremamente relevante que seus sítios biológicos sejam preservados [59,60].

Oclusão: esta técnica é utilizada quando o componente biológico é preparado em conjunto com o produto de modificação da superfície do eletrodo, deixando assim as biomoléculas aprisionadas. Normalmente esta camada de modificação é separada da solução teste por uma membrana semipermeável, de forma a retardar a lixiviação do componente biológico. O processo de interação pode ser puramente físico ou envolver ligações covalentes [54].

Ligação Cruzada: baseia-se na imobilização como resultado da reação do componente biológico com um agente bifuncional em que se formam as ligações covalentes intermoleculares [61,62]. Os reagentes que permitem o uso desta técnica contêm grupos reativos terminais específicos para os grupos funcionais (por exemplo, aminas) que se encontram nas outras moléculas a imobilizar.

A resposta das moléculas imobilizadas depende da área superficial, porosidade, caráter hidrofílico da matriz imobilizada, condições de reação e metodologia escolhida para a imobilização. De uma forma esquemática, as diferentes formas de imobilização, encontram-se representadas na **Figura 4**.

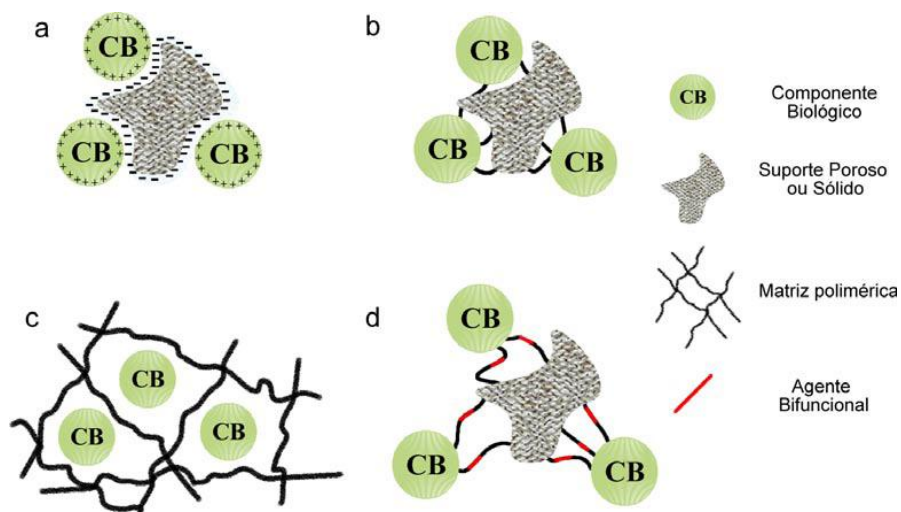


Figura 4: Esquema representativo dos quatro principais métodos de imobilização de biomoléculas. (a) Adsorção Física, (b) Ligação Covalente, (c) Oclusão (d) Ligação Cruzada [54].

Juntamente com as técnicas de imobilização que são utilizadas para melhorar a interação entre os componentes do biossensor, existem procedimentos que promovem melhores interações e consequentemente melhores repostas analíticas, como é o caso da utilização de polímeros condutores.

5. UTILIZAÇÃO DE POLÍMEROS CONDUTORES PARA A CONSTRUÇÃO DE BIOSSENSORES

Os polímeros são parte integrante da nossa existência e tudo que nos rodeia, desde os blocos básicos de construção aos constituintes da vida como proteínas, ácidos nucleicos e polissacarídeos, que são polímeros [27]. Podem ser definidos como compostos de origem natural ou sintética com alta massa molar formados pela repetição de um grande número de unidades químicas (monômeros) unidas entre si por ligações covalentes. Existem polímeros orgânicos e inorgânicos, ambos sendo importantes comercialmente [63].

Uma das propriedades mais importantes dos polímeros é a capacidade de comportarem-se como excelentes isolantes elétricos. Contudo, nas três últimas décadas, uma nova classe de polímeros orgânicos tem sido desenvolvida, cuja importância está relacionada à possibilidade de conduzir eletricidade [64]. Os membros desta nova classe de materiais, chamados de “metais sintéticos”, possuem uma característica em comum: longos sistemas π conjugados ao longo da cadeia, responsáveis por uma condutividade elétrica intrínseca. O interesse evidente é combinar em um mesmo material as propriedades elétricas de um semicondutor ou metal com as vantagens de um polímero [65].

Inúmeras aplicações tecnológicas têm sido propostas e desenvolvidas para polímeros condutores, devido, principalmente, às suas propriedades de condutividade e eletroquímicas de oxi-redução. A **figura 5** ilustra algumas aplicações conhecidas e outras propostas para os polímeros condutores, em função das suas propriedades [66].

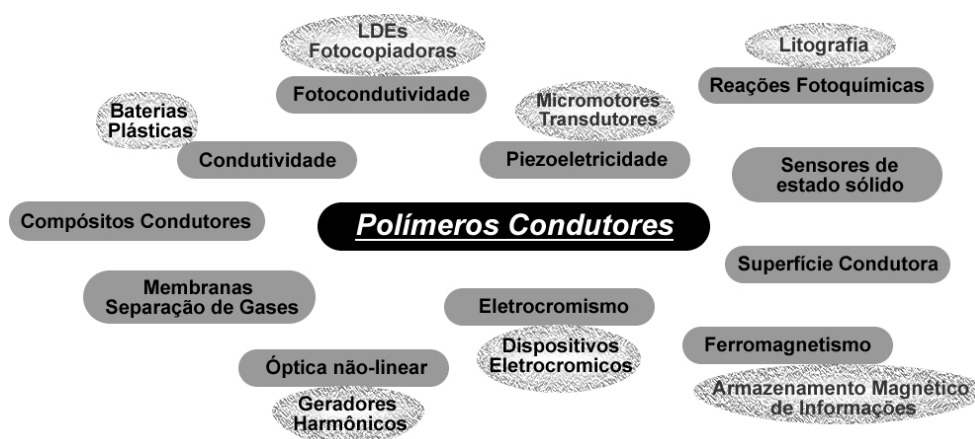


Figura 5: Esquema mostrando várias aplicações conhecidas e propostas para polímeros condutores, em função das suas propriedades [66].

Duas maneiras são comumente utilizadas para tornar o polímero condutor: por meio de processo físico ou dopagem eletrônica. No processo físico ocorre apenas uma mistura física de um polímero não-condutor com um material condutor como, por exemplo, um metal ou pó de grafite distribuído através do material [67]. Já a dopagem eletrônica, é um procedimento de adição de

“impurezas” químicas a um elemento semiconductor, para transformá-lo num elemento mais condutor, porém de forma controlada [68].

O funcionamento da dopagem é baseado no princípio de condução. A capacidade do semiconductor de transportar corrente elétrica pode ser ampliada: pela adição de elétrons na banda de condução, um semiconductor tipo n (negativo) e pela remoção de elétrons da banda de valência, um semiconductor tipo p (positivo) [69]. Na dopagem dos polímeros, as “impurezas” são introduzidas nas cadeias fazendo a interação gerar deformações e “defeitos carregados” localizados, responsáveis pelo aumento na condutividade [70].

Um método de tornar o polímero condutor é por meio de eletropolimerização [71]. Neste tipo de processo, o polímero em formação na superfície de um eletrodo é dopado pelo eletrólito suporte presente na solução. Este material apresenta características favoráveis que contribui para a sua crescente utilização no desenvolvimento de biossensores dentre as quais se destacam: facilidade no controle de formação (quantidade, espessura do material), estabilidade ao ambiente e em soluções aquosas, condutividade elétrica e proteção do eletrodo de adsorção de analitos não específicos. A presença de grupos funcionalizados em sua estrutura é um dos principais interesses na construção de um biossensor, pois pode promover uma melhor interação com a sonda (camada de bioreconhecimento) a ser imobilizada sobre o transdutor [72].

Polímeros formados dessa maneira são normalmente chamados de filmes poliméricos devido à fina espessura que pode ser construída sobre os eletrodos. Derivados de monômeros aromáticos funcionalizados, eletrodepositados em eletrodos condutores, tem sido uma das principais atividades do Laboratório de Filmes Poliméricos e Nanotecnologia (LAFIP/Nanotec). Dentre eles estão o estudo de eletropolimerização de 4-aminofenol [73], 3-aminofenol [74] e tiramina [75]; estudos de imobilização de bases nitrogenadas de DNA sobre aminofenóis [76-78] e 4-metoxi-fenetilamina [79]; estudo da eletropolimerização e imobilização de estruturas de DNA utilizando ácido 4-hidroxi-fenilacético [80,81] e ácido 3-hidroxi-fenilacético [82].

Filme polimérico derivado 4-aminofenol eletrodepositado sobre eletrodo de grafite apresenta características favoráveis para sua aplicação no

desenvolvimento de biossensores [73], contudo poucos estudos são encontrados na literatura com este propósito.

6. OBJETIVOS

6.1. OBJETIVO GERAL

Desenvolvimento de biossensor eletroquímico para detecção indireta de alanina aminotransferase, utilizando superfície de carbono grafite modificado com filme polimérico derivado de 4-aminofenol.

6.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Modificação eletroquímica de eletrodos de carbono de grafite com polímero derivado de 4-aminofenol;
- Avaliação da estabilidade eletroquímica do filme polimérico;
- Imobilização da enzima piruvato oxidase sobre a superfície do eletrodo modificado com filme polimérico;
- Detecção indireta de ALT, por monitoramento do pico de oxidação do mediador 4-aminoantipirina (4-APP);
- Estudo da sensibilidade e seletividade do biossensor produzido.
- Caracterização morfológica da superfície.

7. REFERÊNCIAS

1. Baynes, J.; Dominiczak, M.H.; “Bioquímica Médica”. São Paulo-SP, **2007**, 345-356. Manole, 1ª edição.
2. Smith, C.; Marks, A.D.; Lieberman, M.; “Bioquímica Médica Básica de Marks”. São Paulo-SP, **2007**, 842-860. Artmed. 2ª edição.
3. Células Hepáticas. Disponível em:
<http://pt.wikipedia.org/wiki/Hepat%C3%B3cito>. Acesso em: 06 maio 2011.
4. Song, M.-J.; Yun, D.-H.; Min, N.-K.; Hong, S.-I.; “Electrochemical Biosensor Array for Liver Diagnosis Using Silanization Technique on Nanoporous Silicon Electrode”. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 103:(1), **2007**, 31-37.
5. Marrero, C.R.; Marrero, J.A.; “Viral Hepatitis and Hepatocellular Carcinoma”. *Biosensors and Bioelectronics*, 19, **2003**, 365- 371.
6. Saely, C.H.; Vonbank, A.; Rein, P.; Woess, M.; Beer, S.; Aczel, S.; Jankovic, V.; Boehnel, C.; Risch, L.; Drexel, H.; “Alanine aminotransferase and gamma-glutamyl transferase are associated with the metabolic syndrome but not with angiographically determined coronary atherosclerosis” *Clinica Chimica Acta*, **2008**, 397, 82-86.
7. Fígado. Disponível em: <http://doarvida.blogspot.com/2010/05/transplante-hepatico.html>. Acesso em: 14 junho 2011.
8. Godinho, R. E.; Mamer, C. P.; *VIII Congresso Luso-Afro-Brasileiro de Ciências Sociais* “O comportamento social pode levar a doenças hepáticas”. **2004**.
9. Doenças do Fígado. Disponível em:
<http://www2.datasus.gov.br/DATASUS/index.php?area=0202&VObj=http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/deftohtm.exe?sih/cnv/qr>. Acesso em: 29 abril 2011.

10. Lida V. H.; Silva, T. J. A.; Silva, A. S. F.; Silva, L. F. F.; Alves, V. A. F.;
“Cirrose hepática: aspectos morfológicos relacionados às suas possíveis complicações. Um estudo centrado em necropsias”. *Bras. Patol. Med. Lab.*,41:(1),**2005**, 29-36.
11. Wang, C-C.; Wu,W-W.; Hsu, C-S.; Wang,P-C.; Lin,H.H.; Kao,J-H.;
“Association of insulin resistance with alanine aminotransferase activity in patients with nonalcoholic fatty liver disease”. *Tzu Chi Medical Journal*, 20:(4), **2008**, 275-279.
12. Luis, D.A.; Aller, R.; Izaola, O.; Sagrado, M.G.; Conde, R.; Bellido, D.;
“Influence of insulin resistance and adipocytokines on elevated serum alanine aminotransferase in obese patients”. *Archives of Medical Research*, 39, **2008**, 110-114.
13. Goessling,W.; Massaro,J.M.; Vasan,R.S.; D’Agostino,R.B.; Ellison,R.C.; Fox,C.S.;
“Aminotransferase levels and 20-Year risk of metabolic syndrome, diabetes, and cardiovascular disease”. *Gastroenterology*, 135, **2008**, 1935-1944.
14. Targher, G.; “Non-alcoholic fatty liver disease, the metabolic syndrome and the risk of cardiovascular disease: the plot thickens”. *Diabet Med*, 24, **2007**, 1-6.
15. Makkonen,J.; Pietiläinen,K.H.; Rissanen,A.; Kaprio,J.; Yki-Järvinen,H.;
“Genetic factors contribute to variation in serum alanine aminotransferase activity independent of obesity and alcohol: A study in monozygotic and dizygotic twins”. *Journal of Hepatology*, 50, **2009**, 1035-1042.
16. Cave, M.; Deaciuc,I.; Mendez,C.; Song,Z.; Joshi-Barve,S.; Barve,S.; McClain,C.;
“Nonalcoholic fatty liver disease: predisposing factors and the role of nutrition”. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 18, **2007**, 184-195.
17. Arteel,G.; Marsano,L.; Mendez,C.; Bentley,F.; McClain,C.J.; “Advances in alcoholic liver disease”. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*, 17 :(4), **2003**,625-647.

18. Targher, G.; “Non-alcoholic fatty liver disease, the metabolic syndrome and the risk of cardiovascular disease: the plot thickens”. *Diabet Med*, 24, **2007**, 1-6.
19. Arakawa, Y.; Moriyama, M.; Arakawa, Y.; “Liver cirrhosis and metabolism (sugar, protein, fat and trace elements)”. *Hepatology Research*, 30, **2004**, 46-58.
20. Eh-Serag, H.B.; Rudolph, K.L.; “Hepatocellular Carcinoma: Epidemiology and Molecular Carcinogenesis”. *Gastroenterology*, 132, **2007**, 2557-2576.
21. Xuan, G. S.; Oh, S. W.; Choi, E. Y.; “Development of an electrochemical immunosensor for alanine aminotransferase”. *Biosens. Bioelectron.* 19, **2003**, 365-371.
22. Testes de função hepática. Disponível em:
http://pt.wikipedia.org/wiki/Testes_de_fun%C3%A7%C3%A3o_hep%C3%A1tica. Acesso em: 13 junho 2011.
23. Alanina aminotransferase. Disponível em:
<http://www.webmd.com/digestive-disorders/alanine-aminotransferase-alt>. Acesso em: 08 maio 2011.
24. Astrin, K.H.; Arredondo-Vega, F.X.; Desnick, R.J.; Smith, M.; “Assignment of the gene of cytosolic alanine aminotransferase (AAT1) to human chromosome 8”. *Ann. Hum. Genet.*; 46, 125-133. **1982**.
25. Jorge S. G.; Tommaso, A. M. A.; Mochizuki, M. Disponível em:
<http://www.hepcentro.com.br/biblioteca.htm>. Acesso em 19 maio. 2011.
26. Huang, X.J.; Choi, Y.K.; Im, H.S.; Yarimaga, O.; Yoon, E.; Kim, H.S.; “Aspartate Aminotransferase (AST/GOT) and Alanine Aminotransferase (ALT/GPT) Detection Techniques”. *Sensors*, **2006**, 756-782.
27. Marrero, C.R.; Marrero, J.A.; “Viral Hepatitis and Hepatocellular Carcinoma”. *Biosensors and Bioelectronics*, 19, **2003**, 365- 371.
28. Nambiar, S.; Yeow, J.T.W.; “Conductive polymer-based sensors for biomedical applications”. *Biosensors and Bioelectronics*, 26, **2011**, 1825-1832.

29. Dafour, D.R.; Lott, J.A.; Nolte, F.S.; Gretch, D.R.; Koff, R.S.; Seeff, L.B.; "Diagnosis and monitoring of hepatic injury. I. Performance characteristics of laboratory tests". *Clin. Chem.*, 46, **2000**, 2027-2049.
30. Adhikari, B.; Majumdar, S.; "Polymers in sensor applications". *Progress in Polymer Science*, 29:(7), **2004**, 699-766.
31. Chiericato J.G.; Silva, A.P.S.; "Spectroelectrochemistry and investigation of charge transport mechanisms of iron poly (pyridyl) redox polymers". *Polyhedron*, 27 : (7), **2008**, 1860-1866.
32. Theâvenot, D.R.; Toth, K.; Durst, R.A.; Wilson, G.S.; "Electrochemical Biosensors: Recommended Definitions and Classification". *International Union of Pure and Applied Chemistry*, 71:(12), **1999**, 2333-2348.
33. Sanvicens, N.; Manneilli, I.; Salvador, J-P.; Valera, E.; Marco, M-P.; "Biosensors for pharmaceuticals based on novel technology". *Trends in Analytical Chemistry*, 30 : (3), **2011**, 541-553.
34. Cosnier, S.; "Biosensors based on electropolymerized films: new trends". *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 377:(1), **2003**, 507-520.
35. Castillo, J.; Gáspár, S.; Leth, S.; Niculescu, M.; Mortari, A.; Bontidean, I.; Soukharev, V.; Dorneanu, S.A.; Ryabov, A.D.; Csöregi, E.; "Biosensors for life quality Design, development and applications". *Sensors and Actuators B*, 102, **2004**, 179-194.
36. Tymecki, L.; Koncki, R.; "Thick-film potentiometric biosensor for bloodless monitoring of hemodialysis". *Sensor and Actuators B*, 113, **2006**, 782-786.
37. Chen, J.C.; Chung, H.H.; Hsu, C.T.; Tsai, D.M.; Kumar, A.S.; Zen, J. M.; "A disposable single-use electrochemical sensor for the detection of uric acid in human whole blood". *Sensors and Actuators B: Chemical*, 110, **2005**, 364-369.
38. Kerman, K.; Kobayashi, M.; Tamiya, E.; "Recent trends in electrochemical DNA biosensor technology". *Measurement Science and Technology*, 15, **2004**, 1-11.
39. Martins, P.O. Síntese, Caracterização e aplicação do poli(ácido 3-hidroxifenilacético) no desenvolvimento de biossensor para detecção de marcador cardíaco. Dissertação de Mestrado, **2011**, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia.

- 40.D'Orazio, P.; "Biosensors in clinical chemistry". *Clinica Chimica Acta*, 334 : (2), **2003**,41-69.
- 41.Mello, L.D.; Kubota, L.T.; "Review of the use of biosensors as analytical tools in the food and drink industries". *Food Chemistry*, 77:(2), **2002**, 237-256.
- 42.Davis, J.; Huw Vaughan, D.; Cardosi, M.F.; "Elements of biosensor construction". *Enzyme and Microbial Technology*, 17:(12), **1995**, 1030-1035.
- 43.Teles, F.R.R.; Fonseca, L.P.; "Trends in DNA biosensors". *Talanta*, 77:(2), **2008**, 606-623.
44. Liu, S.; Ye, L.; He, P.; Fang, Y.; "Voltammetric determination of sequence-specific DNA by electroactive intercalator on graphite electrode". *Analytica Chimica Acta*, 335:(3), **1996**, 239-243.
- 45.Lei, Y., Chen, W.; Mulchandani, A.; "Microbial biosensors". *Analytica Chimica Acta*, 568:(2), **2006**, 200-210.
- 46.Pereira, A. C.; Santos, A. S.; Kubota, L. T.; "Tendências em modificação de eletrodos amperométricos para aplicações eletroanalíticas". *Quim. Nova*, 25:(6), **2002**,1012-1021.
- 47.Brito-Madurro, A.G.; Ferreira, L.F.; Vieira, S.N.; Ariza, R.G.; Filho, L.R.G.; Madurro, J.M.; "Immobilization of purine bases on a poly-4-aminophenol matrix". *J. Mater. Sci*, 42 (9), **2007**, 3238-3243.
- 48.Yuging, M.; Jianrong,C.; Xiaohua,W.; "Using electropolymerized non-conducting polymers to develop enzyme amperometric biosensors". *Trends in Biotechnology*, 22: (5), **2004**, 227-231.
- 49.Sotomayor, M. D. P. T.; Kubota, L.T.; "Enzymeless biosensors: uma nova área a ser explorada", *Química Nova*, 25:(1),**2002**,123-128.
- 50.Lehninger, A. L.; *Princípios de Bioquímica*, Sarvier; São Paulo, **1986**, p.154.
- 51.Stryer, L.; *Biochemistry*, W. H. Freeman and Company, New York, **1995**, p. 181.

52. Oldenziel, W.H.; Westerink, B.H.C.; "Improving glutamate Microsensors by optimizing the composition of the redox hydrogel". *Anal. Chem.*, 77, **2005**, 5520-5528.
53. Jamal, M.; Worsfold, O.; McCorma, T.; Dempsey, E.; "A stable and selective electrochemical biosensor for the liver enzyme alanine aminotransferase (ALT)". *Biosensors and Bioelectronics*, 24, **2009**, 2926-2930.
54. Patacas, R.C.; "Desenvolvimento, caracterização e otimização de um biossensor amperométrico para a determinação de nitrato baseado em microinterfaces gelificadas". *Dissertação de Mestrado*, **2007**, Faculdade de Ciências da Universidade do Porto.
55. Ramanathan, K.; Bangar, M.A.; Yun, M.; Chen, W.; Myung, N.V.; Mulchandani, A.; "Bioaffinity Sensing Using Biologically Functionalized Conducting-Polymer Nanowire". *Journal of the American Chemical Society*, 127 : (2), **2004**, 496-497.
56. Ramanathan, K.; Pandey, S.S.; Kumar, R.; Gulati, A.; Murthy, A.S.N.; Malhotra, B.D.; "Covalent immobilization of glucose oxidase to poly(o-amino benzoic acid) for application to glucose biosensor". *Journal of Applied Polymer Science*, 78: (3), **2000**, 662-667.
57. Mikkelsen, S.R.; Corton, E.; "Bioanalytical Chemistry". *John Wiley and Sons*, **2004**, New Jersey.
58. Sharma, S.K.; Sehgal, N.; Kumar, A.; "Biomolecules for development of biosensors and their applications". *Current Applied Physics*, 3: (3), **2003**, 307-316.
59. Turner, A.; Karube, I.; Wilson, G.; "*Biosensors: Fundamentals and Applications*". *Oxford University Press*, **1987**, Oxford, cap.6.
60. Gerard, M.; Chaubey, A.; Malhotra, B.D.; "Application of conducting polymers to biosensors". *Biosensors and Bioelectronics*, 17: (5), **2002**, 345-359.

61. Chaubey, A.; Gerard, M.; Singhal, R.; Singh, V.S.; Malhotra, B.D.; "Immobilization of lactate dehydrogenase on electrochemically prepared polypyrrole-polyvinylsulphonate composite films for application to lactate biosensors". *Electrochimica Acta*, 46:(5), **2001**, 723-729.
62. "Thermo Fisher Scientific Inc. - Chemistry of Crosslinking". 2009, Disponível em: <http://www.piercenet.com/Products/Browse.cfm?fldID=CE4D6C5C-5946-4814-9904-C5946E01232683>. Acesso em: 17 maio 2011.
63. Akcelrud, L. "Fundamentos da ciência dos polímeros" Barueri-SP, Manole, **2007**, 1-5.
- 64.[64] Kanatzidis, M.G.; "Polymeric Electrical Conductors". *Chemical and Engineering News*, 3:(1), **1990**, 36-54.
65. Maia, D.J.; De Paoli, M-A.; Alves, O.L.; Zarbin, A.J.G.; Neves, S.D.; "Síntese de polímeros condutores em matrizes sólidas hospedeiras". *Química Nova*, 23:(2), **2000**, 204-215.
- 66.[66] Nalwa, H.S. *Handbook of Organic Conductive Molecules and Polymers*, (John Wiley & Sons, 1996).
- 67.[67] MacDiarmid, A.G.; "Synthetic metals": a novel role for organic polymers". *Current Applied Physics*, 1:(4-5), **2001**, 269-279.
- 68.[68] Dopagem eletrônica. Disponível em: <http://www.infoescola.com/quimica/dopagem-eletronica/>. Acesso em: 10 jan. 2011.
69. P. Atkins.; Jones. L.; "Princípios de Química, Questionando a vida moderna e o meio ambiente", Porto Alegre, **2006**.
70. Genies, E.M.; Lapkowski, M.; "Spectroelectrochemical study of polyaniline versus potential in the equilibrium state". *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 220:(1), **1987**, 67-82.
71. Lange, U.; Roznyatovskaya, N.V.; Mirsky, V.M.; "Conducting polymers in chemical sensors and arrays". *Analytica Chimica Acta*, 614:(1), **2008**, 1-26.
72. Franco, D. L.; "Desenvolvimento de biossensores eletroquímicos, utilizando matriz polimérica modificada com biomoléculas, para o diagnóstico de

câncer de próstata e hepatite C”. Tese de doutorado. Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, **2011**.

73. Vieira, S.N.; Ferreira L. F.; Franco D.L.; Afonso, A.S.; Goncalves, R.A.; Brito-Madurro, A.G.; Madurro, J.M.; “Electrochemical modification of graphite electrodes with poly(4-aminophenol)”. *Macromolecular Symposia*, **2006**, 236-242.
74. Franco, D.L.; Afonso, A.S.; Vieira, S.N.; Ferreira, L.F.; Goncalves, R.A.; Brito-Madurro, A.G.; Madurro, J.M.; “Electropolymerization of 3-aminophenol on carbon graphite surface: Electric and morphologic properties”. *Materials Chemistry and Physics*. 107, **2008**, 404-409.
75. Castro, M.; Vieira, S.N.; Gonçalves, R.A.; Brito-Madurro, A.G.; Madurro, J.M.; “Electrochemical and morphologic studies of nickel incorporation on graphite electrodes modified with polytyramine”. *Journal of Materials Science*, 43, **2008**, 475-482.
76. Ferreira, L.F.; Boodts, J.F.C.; Brito-Madurro, A.G.; Madurro, J.M.; “Gold electrodes modified with poly (4-aminophenol): incorporation of nitrogenated bases and an oligonucleotide”. *Polymer International*, 57, **2008**, 644-650.
77. Ferreira, L.F.; Vieira, S.N.; Filho, L.R.G.; Brito-Madurro, A.G.; Madurro, J.M.; “Immobilization of purine bases in poly-4-aminophenol matrix”. *Journal of Materials Science*, 42, **2007**, 3238-3243.
78. Franco, D.L.; Afonso, A.S.; Ferreira, L.F.; Goncalves, R.A.; Boodts, J.F.C.; Brito-Madurro, A.G.; Madurro, J.M.; “Electrodes modified with polyaminophenols: Immobilization of purines and pyrimidines.” *Polymer Engineering and Science*. 48, **2008**, 2043-2050.
79. Silva, F.B.; Vieira, S.N.; Filho, L.R.G.; Boodts, J.F.C.; Brito-Madurro, A.G.; Madurro, J.M.; “Electrochemical Investigation of Oligonucleotide-D9A Hybridization on Poly (4-Methoxyphenethylamine)”. *International Journal of Molecular Science*, **2008**, 1173-1188.

80. Silva, T.A.R.; Ferreira, L. F.; Boodts, J.F.C.; Eiras, S.P.; Brito-Madurro, A.G.; Madurro, J.M.; "Poly(4-hydroxyphenylacetic acid): a new material for immobilization of biomolecules". *Polymer Engineering and Science*, 48, **2008**, 1963-1970.
81. Silva, T.A.R.; Ferreira, L.F.; Souza, L.M.; Filho, L.R.G. ; Brito-Madurro, A.G.; Madurro, J.M.; "New approach to immobilization and specific-sequence detection of nucleic acids based on poly(4-hydroxyphenylacetic acid)". *Materials Science & Engineering. C, Biomimetic Materials, Sensors and Systems* 29, **2009**, 539-545.
82. Oliveira, R.M.L.; Vieira, S.N.; Alves, H.C.; Franca, E.G.; Franco, D.L.; Ferreira, L.F.; Brito-Madurro, A.G.; Madurro, J.M.; "Electrochemical and morphological studies of an electroactive material derived from 3-hydroxyphenylacetic acid: a new matrix for oligonucleotide hybridization" *Journal of Materials Science*, 45, **2010**, 475-482.

CAPÍTULO 2:

Immobilization of pyruvate oxidase onto graphite electrode modified with poly(4-aminophenol) for detection of alanine aminotransferase

O capítulo II está de acordo com as normas da revista Bioelectrochemistry
(http://www.elsevier.com/wps/find/journaldescription.cws_home/504080/description#description)

Immobilization of pyruvate oxidase onto graphite electrode modified with poly(4-aminophenol) for detection of alanine aminotransferase

Lara F. Paraíso¹, Isabella B. Guerra², Diego L. Franco²,
João M. Madurro², Ana G. Brito-Madurro^{1,*}

1. Institute of Genetics and Biochemistry, Federal University of Uberlândia, Uberlândia, Brazil

2. Institute of Chemistry, Federal University of Uberlândia, Uberlândia, Brazil.

*Author to whom correspondence should be addressed. Tel. +55 34 32182203; Fax: +55 3432182203; E-mail: agbrito@iqufu.ufu.br

Abstract

High concentrations of alanine aminotransferase (ALT) in human serum indicate hepatic disorders. This paper reports a new procedure for ALT determination using pyruvate oxidase (PyO) immobilized onto graphite electrode modified with poly(4-aminophenol) and 4-aminoantipyrine as an indicator of enzymatic system. The characterization of the resulting bioelectrode was performed using atomic force microscopy (AFM) techniques. AFM images indicate that the enzyme was successfully incorporated onto the modified graphite electrode. The bioelectrode obtained showed attractive characteristics such as a short response time (about 200 s), a low detection limit to ALT (0.003U/L) and good stability (95% of response after 4 weeks).

The combination of enzymatic assay for ALT and modified electrode with poly(4-aminophenol) is a promising approach towards the development of a diagnosis kit for hepatic disease using electrochemical detection.

Keywords: Alanine aminotransferase; modified electrode, pyruvate oxydase, poly(4-aminophenol).

1. Introduction

Liver diseases are a growing public health problem that affects million people worldwide [1, 2]. The evaluation of hepatic function is important for the diagnosis of a number of clinical disorders, such as hepatitis A, B, C, cirrhosis, steatosis and hepatitis induced by drug [3]. The measurement of alanine aminotransferase (ALT) in blood is frequently used [4-8] to determine these diseases or only to evaluate the liver function.

ALT is found primarily in the liver and kidneys, with smaller amounts in the heart and in skeletal muscles [9-11]. It has a catalytic activity of reversible conversion of alanine and α -ketoglutarate (α -KG) to pyruvate and glutamate. Under normal circumstances, this enzyme resides within the cells of the liver, but when the liver is injured, it is spilt into the blood. Elevated levels of ALT are a signal of liver damage such as hepatitis and jaundice [12]. Recent studies found alteration in ALT concentrations in individuals with metabolic syndrome [13, 14], insulin resistance [15], diabetes mellitus and obesity [16], revealing that the measurement of this enzyme concentration is an important tool for the diagnosis of these diseases too. Normal levels of ALT are 5 and 40 U/L⁻¹, respectively in blood and serum, following severe liver damage, ALT levels increase to >50 times the normal level with moderate elevation at 96–240 U/L⁻¹ and high elevation at 240–960 U/L⁻¹ [17].

Some of the main detection strategies, such as colorimetry, chemiluminescence, chromatography and electrochemical techniques have been employed for ALT determination [17]. Methodologies based on conventional spectrophotometric assay, which are routinely performed in clinical laboratories, require complex reagents, are costly and require trained operators. Therefore, there is a recent growing demand for the development of healthcare devices and electrochemical sensors that have proven advantages for such applications [18].

A number of biosensors for ALT monitoring have been reported, using electrode without modification or on modified platforms [19], based on the glutamate oxidase [20-23] and pyruvate oxidase (PyO) [2] using indirect on electrochemical detection with mediators [24-26]. Most of these devices were developed using expensive transducers such as gold [22] and platinum [24].

Electrodes electrochemically modified by polymeric films offer advantages in the construction of biosensors, helping in the interaction of the analyte with the target and increasing the electric conductivity [27]. The development of polymeric films using 4-aminophenol have already been reported [28-31]; however, no study using poly(4-aminophenol) as matrix for immobilization of pyruvate oxidase aiming at the detection of alanine aminotransferase is found in the literature. In this way, we report the development of an electrochemical bioelectrode for ALT detection, based on pyruvate oxidase immobilized on graphite surface modified with 4-aminophenol using 4-aminoantipyrine (4-APP) as mediator.

2. Experimental Section

2.1. Apparatus

All electrochemical experiments were carried out using a potentiostat CH Instruments, model 760 C connected to a serial output program. Surface morphology was assessed through atomic force microscopy (AFM) (Shimadzu SPM 9600).

2.2. Chemical

All reagents used were of analytical grade. The monomer 4-aminophenol and α -ketoglutarate were purchased from Acros Organics. L-alanine was obtained from VETEC. 4-aminoantipyrine (4-APP), sodium pyruvate, thiamine pyrophosphate (TPP), flavin adenine dinucleotide (FAD), porcine heart alanine aminotransferase (E.C. 2.6.1.2) and bacterial pyruvate oxidase (E.C.1.2.3.3) were purchased from Sigma.

Electrochemical polymerization was performed in a three-compartment cell using a potentiostat from CH Instruments model 420A. A graphite disk (6 mm diameter, 99.9995%) from Alfa Aesar was used as working electrode. A platinum plate was used as counter electrode. All potentials refer to a silver/silver chloride reference electrode (Ag/AgCl, KCl 3.0 M). Ultra high purity water (Master System, Gehaka, Brazil) was used for the preparation of all solutions.

2.3. Electrode surface modification

Prior to the electropolymerization, the bare graphite electrode was mechanically polished with alumina (0.3 μm) slurry, ultrasonicated, washed with deionized water and dried in the air. 4-Aminophenol solution was deaerated with ultra pure nitrogen for ca. 45 minutes, prior to electropolymerization. The monomer 4-aminophenol was electropolymerized on graphite electrode through continuous cycling of the potential, according to Vieira and col. [31]. After the electropolymerization, the modified electrode was rinsed with deionized water to remove non-reacting monomers.

2.4. Thermal stability of the modified electrode

The thermal stability of the graphite electrode modified with poly(4-aminophenol) was evaluated. The modified electrodes were maintained at 8 ± 1 °C, and analyzed by cyclic voltammetry in 0.5 mol.L⁻¹ HClO₄ solution, between +0.0 V to +1.0 V vs. Ag/AgCl, every 5 days.

2.5. Immobilization of the PyO and detection of ALT

For the pre-conditioning, cleaning and polarization of the surface of the graphite electrode modified with poly(4-aminophenol), it was subjected to successive potential scans from 0 to +1.0 V vs. SCE, in phosphate buffer 0.1M, until the voltammograms remained constant. After, 15 μL of PyO (2 U ml⁻¹) and 6 μL TPP (3.0 mM) were dropped onto the electrode. The electrode was dried at room temperature and then kept under dry conditions at 4 °C before use. For the detection of ALT, 10 μL of substrates (alanine, 0.1 M and α -KG 0.01 M), 15 μL of 4-APP (1.0 mM) were used during the detections conducted at 37 °C for 25 minutes.

2.6. Interference studies

Common substances found in serum or urine were studied for the evaluation of the possible interfering effects. 1 mg/dL uric acid (UA), 1mM glutamate (Glut), 1mM glucose (Glu) or 3.6 mg/dL ascorbic acid (AA) was added to ALT 0.003 U/L. All experiments were performed at 37°C.

2.7. Bioelectrode stability

To evaluate the biosensor stability, the modified electrodes containing PyO were stored at 8 °C, protected from light and oxygen during 30 days.

3. Results and Discussion

3.1. Stability studies of the electrode modified with poly(4-aminophenol)

Studies of electrodeposition and characterization of polymers derived from 4-aminophenol have been described by our group [28, 29, 31] but no study of the stability in function of low temperature has been reported. Figure 1 shows the stability of graphite electrode modified with poly(4-aminophenol), during 30 days, at 8°C.

The electrode modified with polymer film, submitted to low temperature (8°C), during 30 days, kept about 75% of its electroactivity, indicating maintenance of the structure of the polymer, after this treatment.

3.2. Immobilization of PyO on the modified electrode

One way to demonstrate the adsorption of a biomolecule on the surface of transducer is conducting studies using electroactive complexes such as redox pair potassium ferrocyanide/ferricyanide (negative probe) and hexaammineruthenium chloride (positive probe) [32, 33].

In order to evaluate the charge-transfer properties on the surface of the modified electrodes, cyclic voltammetry technique was employed, using $K_3Fe(CN)_6/K_4Fe(CN)_6$ as redox probe (Fig. 2). Piruvate Oxydase was immobilized onto graphite electrode modified with poly(4-aminophenol). After immobilization, the modified electrode containing the enzyme was evaluated in the presence of the redox probes.

Figure 2 shows a small decrease in the current values of the redox couple in the modified electrode in presence of PyO (Fig. 2b), indicating that the enzyme

was immobilized on the surface of the electrode, reducing the electron transfer of the redox couple to the electrode.

3.3. Morphological characterization of the bioelectrode using atomic force microscopy

AFM measurements were carried out to characterize the morphological changes of the electrode modified with or without biomolecules. Fig. 3 shows representative 2D and 3D AFM images of these surfaces.

Images of bare graphite, graphite/poly(4-aminophenol), graphite/poly(4-aminophenol)/PyO, presents roughness values of 312 nm, 1133 nm, 306 nm, respectively. The surface of graphite/poly(4-aminophenol) is rougher than the bare electrode. That provides a significant increase of the electrode surface area, interesting for immobilization of a greater number of biomolecules. The roughness of modified graphite decreases after immobilization of PyO, being observed formation of numerous clusters, indicating that the enzyme was successfully incorporated on the modified graphite electrode, in accordance with the voltammetric studies (see Fig.2).

3.4. Detection of alanine aminotransferase

The modified electrode with polymeric film, containing PyO was utilized for the detection of ALT using 4-aminoantipyrine as indicator of enzymatic reaction (Fig. 4).

The biocatalyst scheme to evaluate ALT is illustrated in Fig. 4. The enzyme ALT, in the presence of L-alanine and α -Ketoglutarate, produces pyruvate, which is a substrate for the second enzyme, pyruvate oxidase. The pyruvate can be converted to H_2O_2 , oxidizing 4-APP and leading to a decrease in current for 4-APP. The quantity of 4-APP_{ox} produced is directly proportional to the amount of ALT. The system proposed is compatible with the results obtained in the Fig. 5 Linear voltammetry (Fig. 5A) realized onto graphite electrode modified with poly(4-aminophenol)/PyO shows that the presence of ALT causes decrease in the current oxidation of 4-APP. This decrease is associated with the consumption of 4-APP by

competitive chemical reaction with H_2O_2 , decreasing the availability of 4-APP to the oxidation in the electrode and, consequently, decreasing the oxidation current. These results are consistent with the amperometric response obtained in the presence or absence of ALT (Fig. 5B) where a decrease in the charge values was obtained for the bioelectrode in the presence of ALT (5.65C) compared with the bioelectrode in the absence of ALT (6.19 C). Also, it was determined by chronoamperometry that the response time was less than 200s when the current was stable (Figure 5B).

3.5. Sensitivity of bioelectrode for ALT

The bioelectrode was evaluated using samples of ALT prepared in buffer phosphate, monitoring 4-APP through linear voltammetry (Fig. 6).

Since ALT produces H_2O_2 that oxidizes 4-APP, the enzymatic activity can be determined from the decrease in the current oxidation values in the bioelectrode (Fig 6A). Fig. 6B shows the oxidation charge of 4-APP in function of the variation of ALT quantity. The sensitivity, determined from the semi-logarithmic plot, was 0.003 U/L (correlation coefficient $r = 0.998$) for ALT over a range of 0.0003U/L to 3U/L.

3.6. Interference studies

In the analysis of biological fluids, background signals due to physiological levels of electroactive species such as ascorbic acid and uric acid create selectivity challenges [24]. Effect of some common interferents in ALT determination such as uric acid, glutamate, glucose, ascorbic acid on the poly(4-aminophenol)/PyO bioelectrode response has been studied (Fig. 7).

Selectivity coefficient (SC) of the bioelectrode for each interferent was calculated using the equation, $\text{SC} = I_{\text{C}+\text{i}}/I_{\text{C}}$, where $I_{\text{C}+\text{i}}$ and I_{C} are the bioelectrode response for ALT (0.003U/L) in the presence and absence of each interferent, respectively [34]. The results obtained indicate that the response of the

bioelectrode is not significantly affected in the presence of such interferents, indicating high selectivity towards the determination of ALT.

3.7. Electrode stability

The storage stability of biosensors is a critical feature in the context of potential pharmaceutical and industrial applications [35]. Fig. 8 depicts the stability of the bioelectrode for ALT, stored in dry state.

Figure 8 indicates that the biosensor response was still 97% of the initial value after 30 days of storage (8°C). This result was considered as an indication that the microenvironment of the modified electrode was a stable platform for PyO immobilization, preventing its leaching and preserving its stability and biological activity.

4. Conclusion

The present work describes the development of a new ALT biosensor obtained by immobilization of pyruvate oxidase onto poly(4-aminophenol) matrix.

Poly (4-aminophenol) electrodeposited onto graphite electrode presented high stability during 30 days, in the conditions of the biosensor storage.

Electrochemical techniques confirmed the PyO immobilization and ALT detection on the modified surface. AFM images confirmed the modifications in the surface after the immobilization or ALT detection. The material produced shows a favorable effect onto a bioactivity of the immobilized PyO in a 30-day storage. The detection limit obtained was 0.003 U.L^{-1} and interferences studies showed high selectivity of bioelectrode and fast response.

The system is very promising for the clinical requirements for measurement of abnormal elevation of ALT in serum with potential application in point-of-care in diagnostic and home use.

Acknowledgments

The authors are grateful for the financial support from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo à

Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES). Also, we would like to thank teacher Abilio Borghi for the review of the English manuscript.

References

- [1] Vezali, E.; Aghemo, A.; Colombo, M. A review of the treatment of chronic hepatitis C virus infection in cirrhosis. *Clinical Therapeutics*. 32 (2010) 2117-2138.
- [2] Xuan G. S.; Oh S. W.; Choi E. Y. Development of an electrochemical immunosensor for alanine Aminotransferase Biosensors and Bioelectronics 19 (2003) 365-371.
- [3] Li, G.; Liao, J.M.; Hu, G.Q.; Ma, N. Z.; Wu, P. J.; Study of carbon nanotube modified biosensor for monitoring total cholesterol in blood. *Biosens. Bioelectron.* 20 (2005) 2140–2144.
- [4] Poynard T.; Ngo Y.; Munteanu M.; Thabut D.; Ratziu V. Noninvasive Markers of Hepatic Fibrosis in Chronic Hepatitis B. *Curr Hepat Rep.* 10 (2011) 87-97.
- [5] Kuroda H.; Kakisaka K.; Tatemichi Y.; Sawara K.; Miyamoto Y.; Oikawa K.; Miyasaka A.; Takikawa Y.; Masuda T.; Suzuki K. Non-invasive evaluation of liver fibrosis using acoustic radiation force impulse imaging in chronic hepatitis patients with hepatitis C virus infection. *Hepatogastroenterology*. 57 (2010) 1203-1207.
- [6] Rietz, B., Guilbault, G.G., “Fluorimetric assay of serum glutamate oxaloacetate transaminase, glutamate pyruvate transaminase and α -hydroxybutyrate dehydrogenase by solution an”. *Anal. Chim. Acta* 77 (1975) 191–198.
- [7] Reitman, S., Frankel, S.; “A colorimetric method for the determination of serum glutamic oxalacetic and glutamic pyruvic transaminases”. *Am. J. Clin. Pathol.* 1957 (28) 56–63.

- [8] Karmen, A., "Transaminase activity in human blood". *J. Clin. Invest.* 34 (1955) 131–133.
- [9] Adolph, L.; Lorenz, R.; Enzyme Diagnosis in Diseases of the Heart, Liver, and Pancreas. S Karger, S Karger Pub., 1982, 9 -/27.
- [10] Jung, K.; Mildner, D.; Jacob, B.; Scholz, D.; Precht, K.; " On the pyridoxal-5P-phosphate stimulation of AST and ALT in serum and erythrocytes of patients undergoing chronic hemodialysis and with kidney transplants". *Clin. Chim. Acta*, 115 (1998) 1105-1110.
- [11] Wroblewski, F.; "The clinical significance of alterations in transaminases activities of serum and other body fluids". *Adv.Clin. Chem.* 1 (1958) 313-351.
- [12] D'Amico, D.R.; Lott, J.A.; Nolte, F.S.; Gretch, D.R.; Koff, R.S.; Seeff, L.B.; "Diagnosis and monitoring of hepatic injury. I. Performance characteristics of laboratory tests". *Clin. Chem.*, 46 (2000) 2027–2049.
- [13] Saely, C.H.; Vonbank, A.; Rein, P.; Woess, M.; Beer, S.; Aczel, S.; Jankovic, V.; Boehnel, C.; Risch, L.; Drexel, H.; "Alanine aminotransferase and gamma-glutamyl transferase are associated with the metabolic syndrome but not with angiographically determined coronary atherosclerosis" *Clin. Chim. Acta*, 397 (2008) 82–86.
- [14] Goessling, W.; Massaro, J.M.; Vasan, R.S.; D'Agostino, R.B.; Ellison, R.C.; Fox, C.S.; "Aminotransferase levels and 20-Year risk of metabolic syndrome, diabetes, and cardiovascular disease". *Gastroenterology*, 135 (2008) 1935–1944.
- [15] Wang, C-C.; Wu, W-W.; Hsu, C-S.; Wang, P-C.; Lin, H.H.; Kao, J-H.; "Association of insulin resistance with alanine aminotransferase activity in patients with nonalcoholic fatty liver disease". *Tzu Chi Medical Journal*, 20 (2008) 275-279.

- [16] Oh, S-Y.; Cho, Y-K.; Kang, M-S, Yoo, T-W.; Park, J-H, Kim, H-J., Sohn, C-I.; Jeon, W-K., Kim, B-I.; Son, B-H.; Shin, J-H.; “The association between increased alanine aminotransferase activity and metabolic factors in nonalcoholic fatty liver disease”. *Metabol. Clin. Experiment.* 55 (2006) 1604–1609.
- [17] Huang, X.J.; Choi, Y.K.; Im, H.S.; Yarimaga,O.; Yoon, E.; Kim, H.S.; “Aspartate Aminotransferase (AST/GOT) and Alanine Aminotransferase (ALT/GPT) Detection Techniques”. *Sensors*, 6 (2006) 756-782.
- [18] Plaxco, K.W.; Soh, H.T. Switch-based biosensors: a new approach towards real-time, in vivo molecular detection. *Trends Biotechnol.* 29 (2011)1-5.
- [19] He, Y.N.; Chen, H.Y. “The kinetics-based electrochemical determination of serum glutamate pyruvate transaminase activity with a gold microelectrode”. *Anal. Chim. Acta*, 353 (1997) 319-323.
- [20] Changa, K-S.; Changa, C-K, Chou, S-F.; Chen, C-Y.; “Sequential measurement of aminotransferase activities by amperometric biosensors”. *Biosens. Bioelectron.* 22 (2007) 2914–2920.
- [21] Pan, S.; Arnold, M.A.; “Selectivity enhancement for glutamate with a Nafion/glutamate oxidase biosensor”. *Talanta* 43 (1996) 1157-1162.
- [22] Ye, B.C.; Li, Q.S.; Li, Y.R.; Li, X.B.; Yu, J.T.; “L-Glutamate biosensor using a novel L-glutamate oxidase and its application to flow injection analysis system”. *J. Biotechnol.* 42 (1995) 45-52.
- [23] Oldenziel, W.H.; Westerink, B.H.C.; “Improving glutamate Microsensors by optimizing the composition of the redox hydrogel”. *Anal. Chem.* 77 (2005) 5520-5528.

- [24] Jamal M.; Worsfold Oliver.; McCormac T.; Dempsey E. M. A stable and selective electrochemical biosensor for the liver enzyme alanine aminotransferase (ALT) *Biosens. Bioelectron.* 24 (2009) 2926–2930.
- [25] Song, M-J.; Yun, D-H.; Min, N-K.; Hong, S-I.; “Electrochemical biosensor array for liver diagnosis using silanization technique on nanoporous silicon electrode”. *Journal of bioscience and bioengineering*, 103 (2007) 32-37.
- [26] 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. *Sens. Actuators B* ,107 (2005) 768-772.
- [27] Zhu, A.; Romero,R.; Howard, R.P. A sensitive fluorimetric assay for pyruvate. *Anal. Biochem.* 396 (2010) 146–151.
- [28] Brito-Madurro, A. G.; Ferreira, L. F.; Vieira, S. N.; Goulart Filho, L. R.; Madurro, J. M. Immobilization of purine bases in a poly-4-aminophenol matrix. *J. Mater. Sci.* 42 (2007) 3238-3243.
- [29] Franco, D. L.; Afonso, A. S.; Ferreira, L. F.; Gonçalves, R. A.; Boodts, J. F. C.; Madurro, A. G. B.; Madurro, J. M. Electrodes modified with polyaminophenols: immobilization of purines and pyrimidines. *Polym. Eng. Sci.* 48 (2008) 2043-2050.
- [30] Afonso A. S.; Goulart, L. R.; Goulart I. M. B.; Machado A. E. H.; Madurro J. M.; Brito-Madurro A. G. A promising bioelectrode based on gene of *Mycobacterium leprae* immobilized onto poly(4-aminophenol). *J. Appl. Pol. Sci.* 118 (2010) 2921–2928.
- [31] Vieira, S. N.; Afonso, A. S.; Madurro, A. G. B.; Ferreira, L. F.; Ariza, R. G.; Filho, L. R. G.; Madurro, J. M. Electrochemical modification of graphite electrodes with poly(4-aminophenol). *Macromol. Symp.* 236 (2006) 246-242.

[32] Steichen, M.; Doneux, T.; Buess-Herman, C.; "On the adsorption of hexaammineruthenium (III) at anionic self-assembled monolayers". *Electrochimica Acta*, 53 (2008) 6202-6208.

[33] Janek, R.P., Fawcett, W.R.; Ulman, A.; "Impedance Spectroscopy of Self-Assembled Monolayers on Au(111): Sodium Ferrocyanide Charge Transfer at Modified Electrodes". *Langmuir*, 14 (1998) 3011-3018.

[34] Saxena U.; Chakraborty M.; Goswami P. Covalent immobilization of cholesterol oxidase on self-assembled gold nanoparticles for highly sensitive amperometric detection of cholesterol in real samples. *Biosens. Bioelectron.* 26 (2011) 3037–3043.

[35] Rubio-Retama J.; López-Cabarcos E and López-Ruiz B. High stability amperometric biosensor based on enzyme entrapment in microgels. *Talanta* 68 (2005) 99-107.

Legend for figures

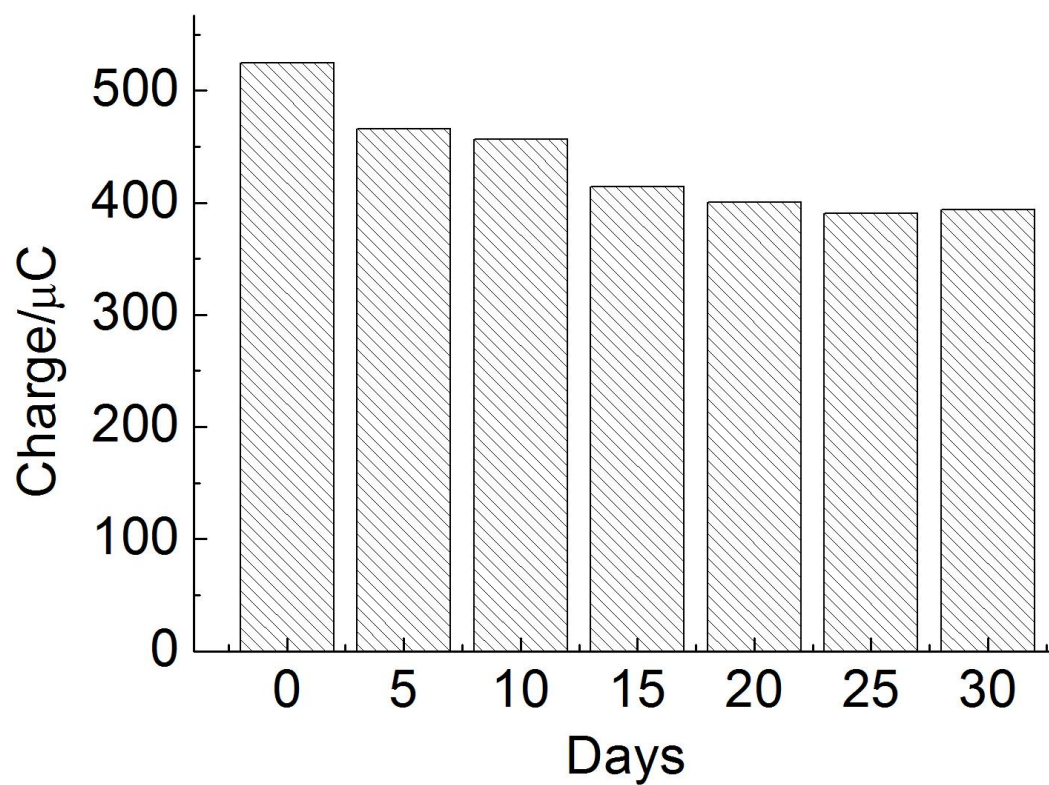


Figure 1. Stability study onto graphite electrode modified with poly(4-aminophenol) submitted to the temperature of 8°C. Cyclic voltammetries were realized in HClO₄ solution (0.5 mol.L⁻¹).

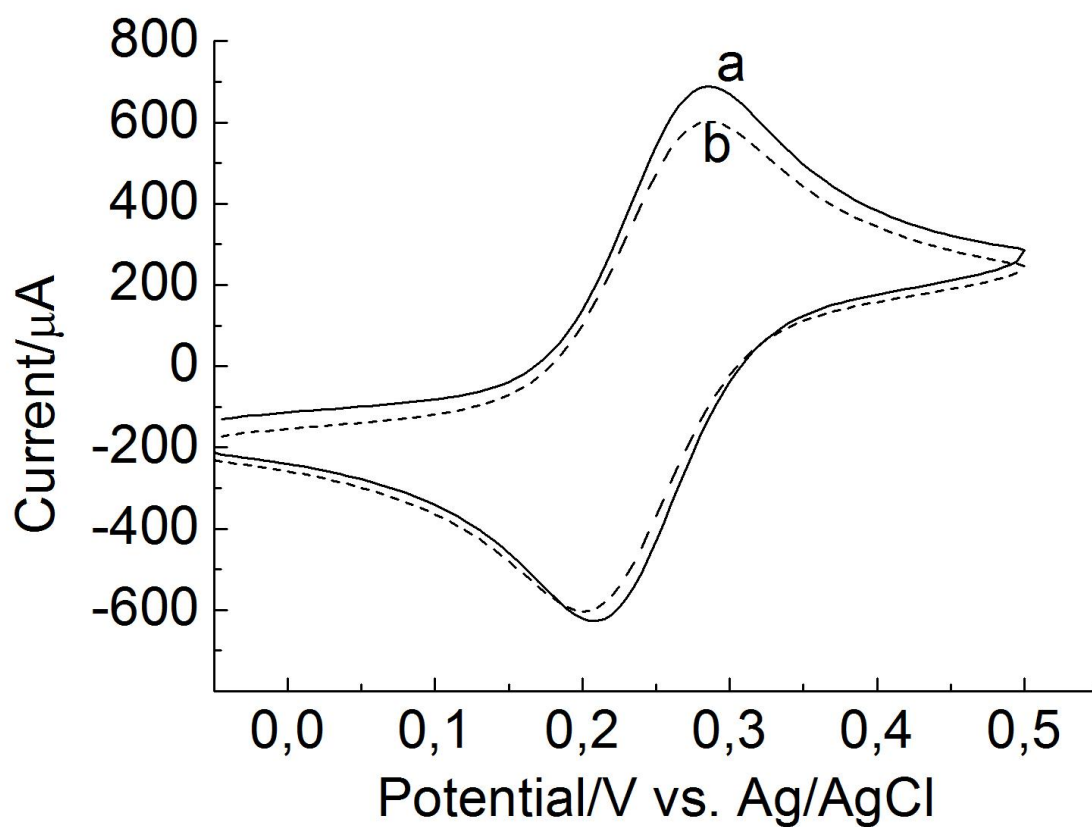


Figure 2. Cyclic voltammograms of graphite electrode modified with poly-(4-aminophenol) in the absence (a) or presence of PyO (b), in KCl solution (0.1 mol.L^{-1}) containing $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ (5 mmol.L^{-1}), $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ (5 mmol.L^{-1}), 100 mV.s^{-1} .

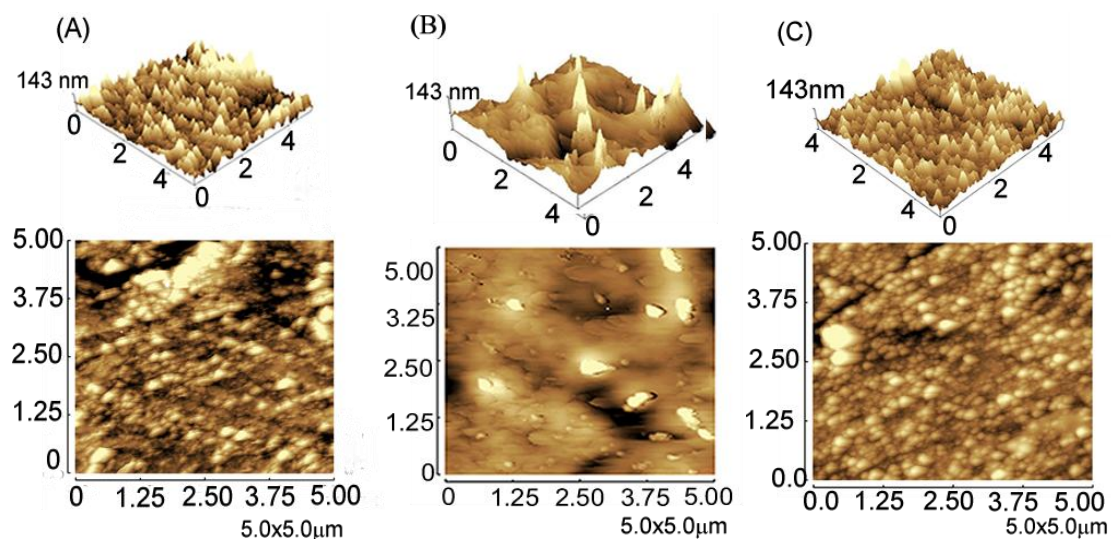


Figure 3. AFM images of graphite (A), graphite/poly(4-aminophenol) (B), graphite/poly(4-aminophenol)/PyO (C).

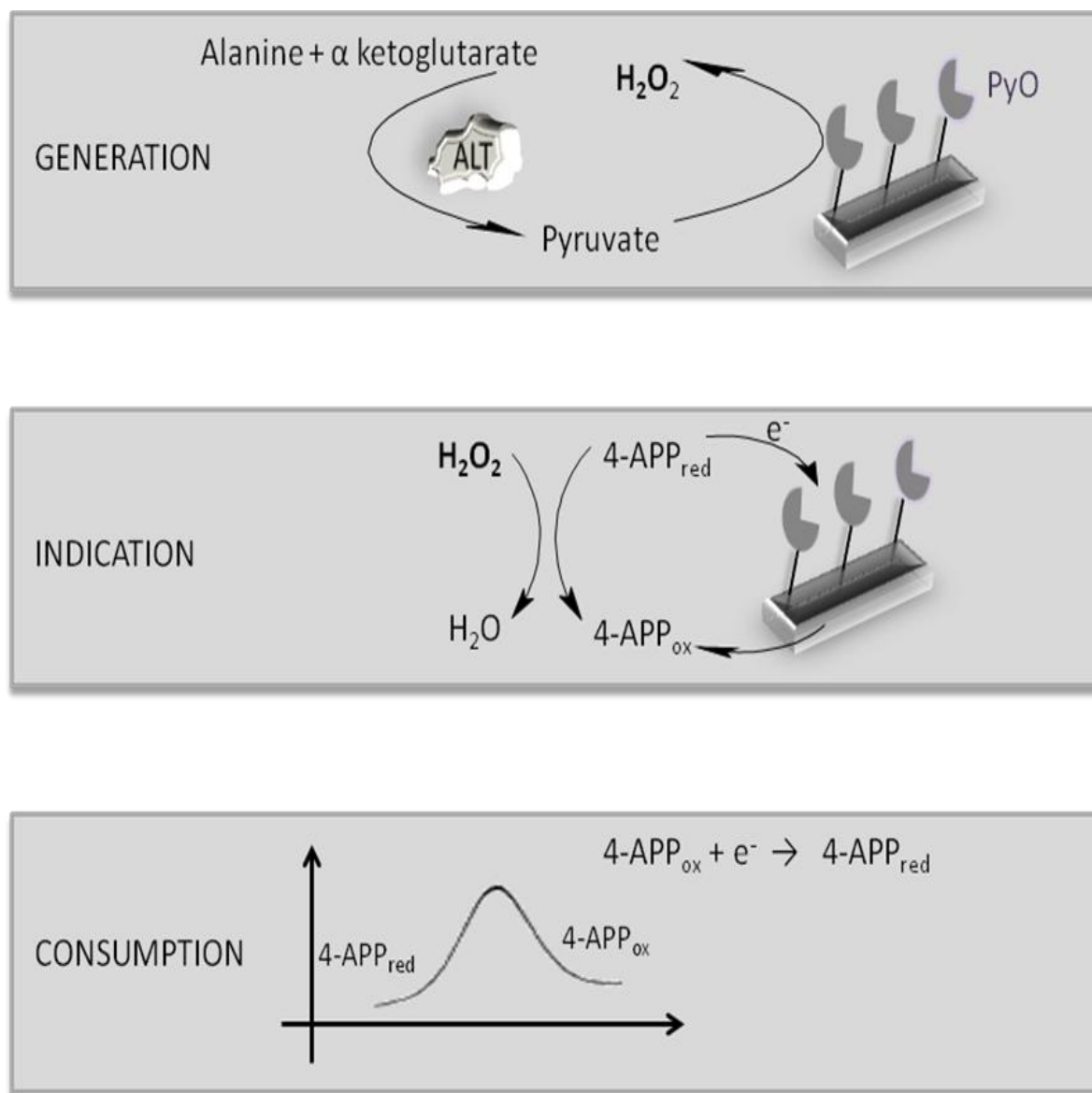


Figure 4. Schematic diagram displaying the enzyme and electrode reactions involved in the ALT activity onto graphite electrode modified with poly (4-aminophenol). PyO: pyruvate oxidase, ALT: alanine aminotransferase; 4-APP: 4-aminoantipyrine.

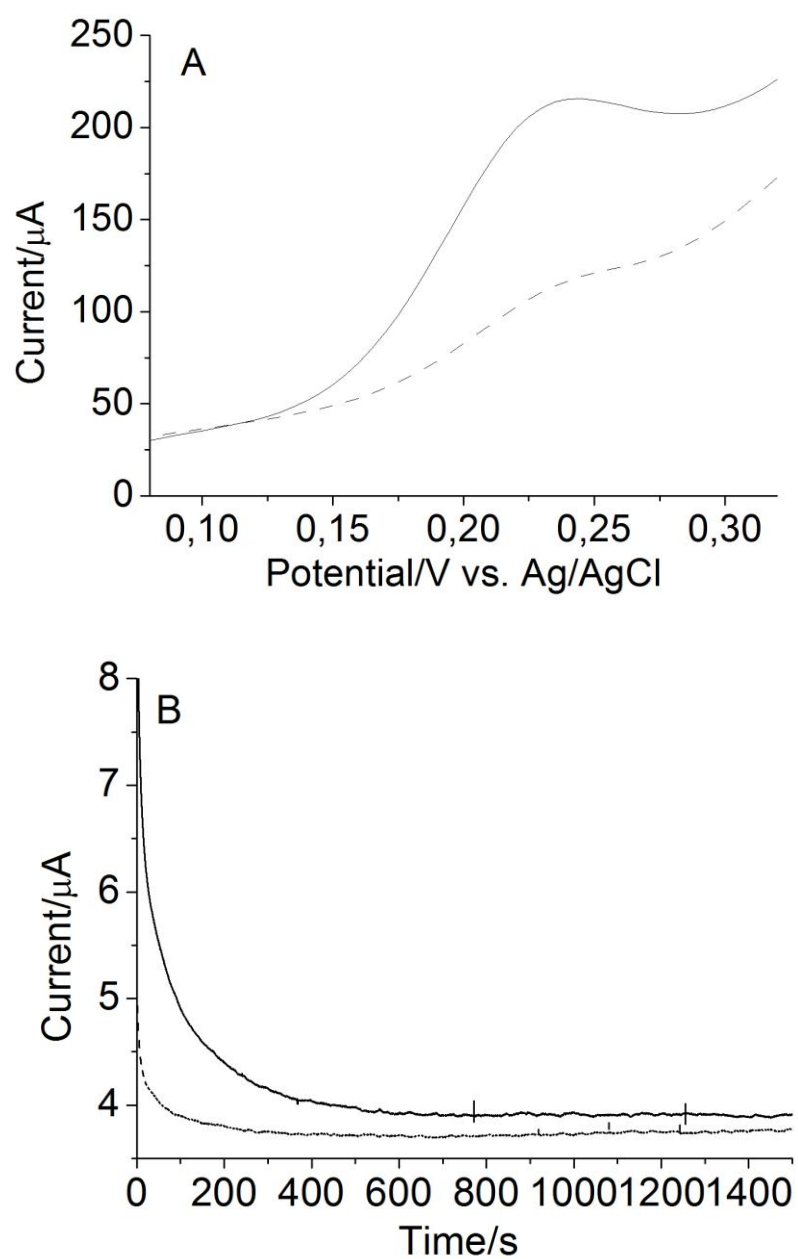


Figure 5. ALT detection based on graphite electrode modified with poly (4-aminophenol) using 4-aminoantipyrine as electrochemical indicator. (A) Linear voltammogram, (B) Amperometric response at +0.24V. Absence of ALT (—) and presence of ALT (---). All the detection was performed in phosphate buffer, pH 7.4.

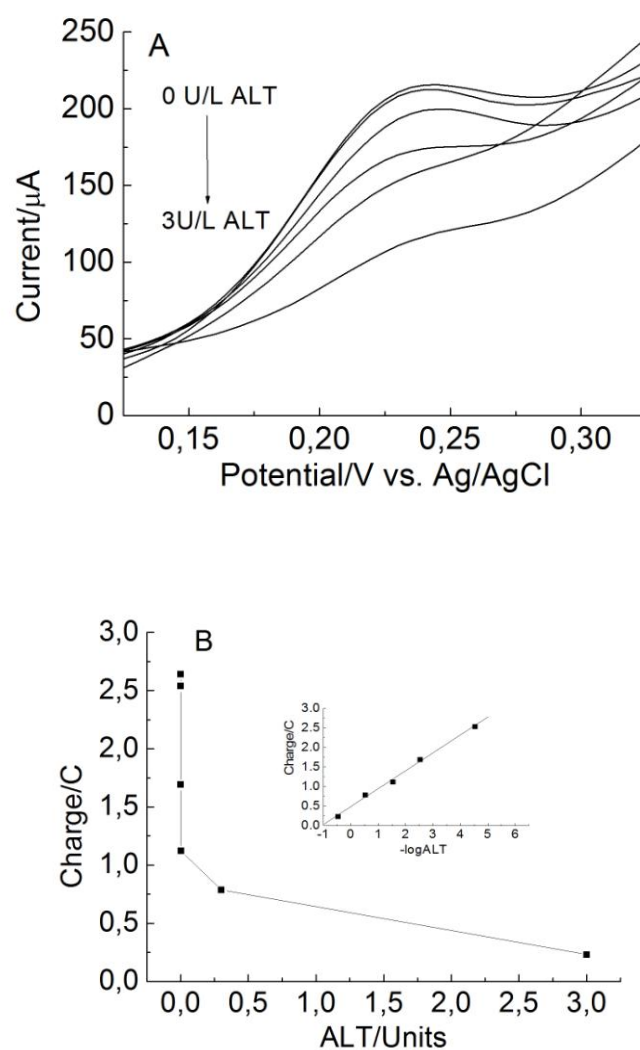


Figure 6. (A) Linear voltammograms of bioelectrode for alanine aminotransferase, based on pyruvate oxidase immobilized on graphite electrode modified with poly (4-aminophenol) and 4-aminoantipirine as electrochemical indicator, in the absence or presence of different concentrations of ALT. (B) Calibration curves of bioelectrode for ALT. Inset: Oxidation charge of 4-aminoantipirine versus logarithmic concentration of ALT. Electrolyte: phosphate buffer, pH 7.4.

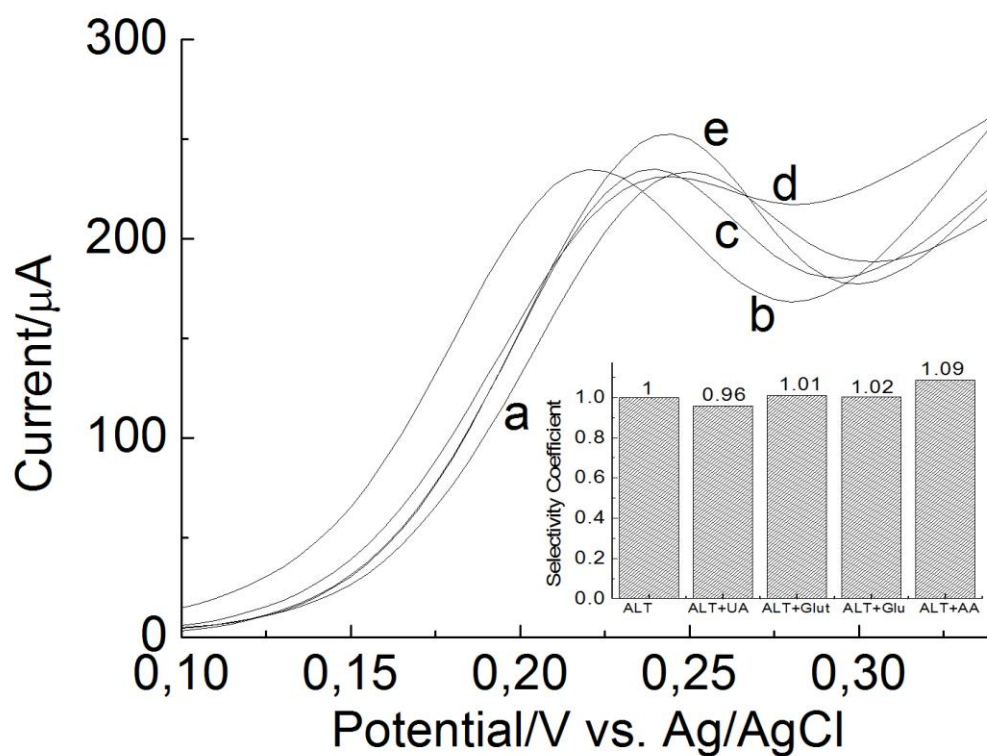


Figure 7. Linear voltammograms of ALT detection, in the absence (a) or presence of interferences: uric acid, 1mg/dL (b), glutamate, 1mM (c), glucose, 1mM (d) ascorbic acid, 3.6 mg/dL (e). Electrolyte: phosphate buffer (0.1 mol.L^{-1}), pH 7.4, 100 V/s. Inset: selectivity coefficient of bioelectrode.

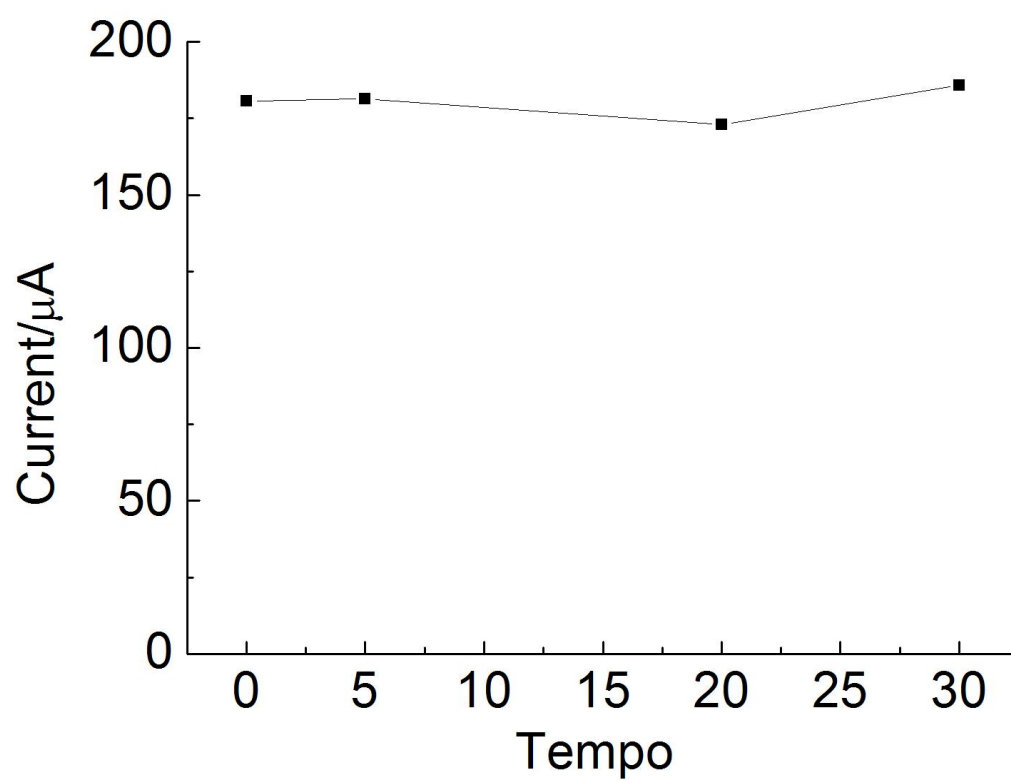


Figure 8. Operational stability of the ALT bioelectrode.