

Universidade Federal de Juiz de Fora
Pós-Graduação em Química
Doutorado em Química

Vanézia Liane da Silva

**IMOBILIZAÇÃO ENZIMÁTICA E ELETRODOS
MODIFICADOS PARA DETERMINAÇÃO
AMPEROMÉTRICA EM FLUXO DE GLICOSE, ÁCIDO
ASCÓRBICO E ÁCIDO ÚRICO**

Juiz de Fora
2011

Vanézia Liane da Silva

**IMOBILIZAÇÃO ENZIMÁTICA E ELETRODOS MODIFICADOS PARA
DETERMINAÇÃO AMPEROMÉTRICA EM FLUXO DE GLICOSE, ÁCIDO
ASCÓRBICO E ÁCIDO ÚRICO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química, Área de Concentração: Química Analítica, da Universidade Federal de Juiz de Fora como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Química.

Orientador: Prof. Dr. Renato Camargo Matos

JUIZ DE FORA

2011

Silva, Vanézia Liane da.

Imobilização enzimática e eletrodos modificados para a determinação amperométrica em fluxo de glicose, ácido ascórbico e ácido úrico / Vanézia Liane da Silva. – 2011.
148 f. : il.

Tese (Doutorado em Química)-Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2011.

1. Ácido úrico. 2. Ascorbato oxidase. 3. Uricase. I.
Título.

CDU 612.461.25

À Deus e a minha família, pelo apoio, incentivo e confiança em todas as etapas da minha vida.

AGRADECIMENTOS

A Deus por me dar forças para vencer mais este desafio;

A minha família, pela força, confiança e principalmente pela presença em todos os momentos da minha vida;

Ao meu namorado, pelo carinho, companheirismo e incentivo;

Aos amigos do NUPIS (Núcleo de Pesquisa em Instrumentação e Separações Analíticas) e colegas de curso, pela amizade, apoio e incentivo;

Ao professor Renato Camargo Matos, pela orientação, dedicação, apoio e também pela sua amizade;

A todos os professores do Departamento de Química, que de alguma forma contribuíram para a concretização deste trabalho;

À Universidade Federal de Juiz de Fora através do Departamento de Química e seu programa de Pós-Graduação, à Universidade Federal de Juiz de Fora/Propesq, CNPq, CAPES e FAPEMIG pelo apoio logístico, financeiro, pela oportunidade de realização do curso e pela infraestrutura disponibilizada;

Enfim, a todas as pessoas que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste sonho e a possibilidade da conclusão deste trabalho.

RESUMO

Este trabalho teve como objetivo desenvolver procedimentos analíticos baseados na análise por injeção em fluxo (FIA) e na especificidade de diferentes enzimas para a determinação de glicose, ácido ascórbico e ácido úrico em diferentes matrizes usando a detecção amperométrica diferencial com eletrodos modificados. A primeira pesquisa deste trabalho consistiu na determinação dos teores de glicose em amostras de mel, água de coco e forrageira. A glicose foi determinada usando sistema FIA e reator tubular com a enzima *glicose oxidase* (Gox) imobilizada sobre a resina Amberlite IRA-743. Um eletrodo de ouro modificado com platina ou com platina/paládio, um eletrodo de Ag/AgCl_(sat) e uma agulha de aço inoxidável foram utilizados como eletrodos de trabalho, referência e auxiliar, respectivamente. O método indireto baseou-se na detecção em potencial de + 0,60 V do peróxido de hidrogênio (H₂O₂) gerado pela oxidação da glicose pela enzima. O método apresentou uma resposta linear na faixa de 52 a 200 μmol L⁻¹, limites de quantificação e detecção de 25,9 μmol L⁻¹ e 8,54 μmol L⁻¹, respectivamente. As concentrações de glicose nas amostras variaram de 27,7 a 32,8 % (m/m), de 19,1 a 35,7 g L⁻¹ e de 101 a 191 mg g⁻¹ para mel, água de coco e forrageiras, respectivamente. Em outro estudo foi desenvolvido um método amperométrico em fluxo para a determinação dos teores de ácido ascórbico (AA) em amostras de mel e suco usando um reator tubular com a enzima *ascorbato oxidase* imobilizada sobre a resina Amberlite IRA-743, a instrumentação utilizada foi similar a anterior, porém substituindo o eletrodo de trabalho por ouro modificado com paládio (potencial de +0,60 V). O método apresentou resposta linear na faixa de trabalho de 10 a 250 μmol L⁻¹, limites de quantificação e detecção de 0,047 μmol L⁻¹ e 0,014 μmol L⁻¹, respectivamente. As concentrações do analito nas amostras variaram de 1,5 a 6,2 mg (100 g)⁻¹ e de 0,06 a 0,15 g L⁻¹ para mel e suco, respectivamente. Também foi estudada a possibilidade de trabalhar com a enzima *ascorbato oxidase* obtida do pepino, sendo os resultados obtidos equivalentes aos encontrados com a enzima comercial. O último estudo avaliou os teores de ácido úrico (AU) em amostras de urina usando a enzima *uricase* e eletrodo de ouro modificado com paládio e acetato de celulose. O método indireto baseou-se na detecção do H₂O₂, em potencial de + 0,60 V, gerado pela oxidação do AU pela enzima *uricase*. O método apresentou resposta linear na faixa de trabalho entre 5 e 50 μmol L⁻¹, limites de quantificação e

detecção de $3,32 \mu\text{mol L}^{-1}$ e $1,05 \mu\text{mol L}^{-1}$, respectivamente. As concentrações do analito nas amostras variaram de 287 a 477 mg L^{-1} . Em todos os estudos os resultados foram comparados com os obtidos por métodos padrões, apresentando um bom grau de correlação.

Palavras chave: *Glicose Oxidase*, Glicose, *Ascorbato Oxidase*, Ácido Ascórbico, *Uricase*, Ácido Úrico.

ABSTRACT

The work aimed to develop of analytical procedures based on flow-injection analysis (FIA) system enzymatic reactions and in the specific of different enzymes, in determination of (glucose, ascorbic acid and uric acid) in different samples using amperometric detection with modified electrodes. In the first research of the work consisted of determining the levels of glucose in samples of honey, coconut water and forage. The glucose was determined using a FIA and tubular reactor with *glucose oxidase* (Gox) enzyme immobilized on Amberlite IRA-743 resin. A gold electrode modified with platinum or with palladium / platinum, an $\text{Ag}/\text{AgCl}_{(\text{sat})}$ electrode and a stainless steel tube were employed as working, reference and auxiliary electrodes, respectively. The indirect method was based on the detection potential of + 0.60 V of the hydrogen peroxide (H_2O_2) generated in the oxidation of glucose by the enzyme. The method showed wide linear dynamic range ($52\text{-}200\ \mu\text{mol L}^{-1}$), quantification and detection limits of $25.9\ \mu\text{mol L}^{-1}$ and $8.54\ \mu\text{mol L}^{-1}$, respectively. The concentrations found in the analyzed samples were in the range of 27.7-32.8% (m/m), $19.1\text{-}35.7\ \text{g L}^{-1}$ and $101\text{-}191\ \text{mg g}^{-1}$ of glucose for honey, coconut water and forage, respectively. In another study was development a method, to determine the levels of ascorbic acid (AA) in samples of honey and juice using a tubular reactor with the enzyme *ascorbate oxidase* immobilized on Amberlite IRA-743 resin, instrumentation used was similar to the above, but replacing the working electrode modified by gold palladium (potential of +0.6 V).. The method showed wide linear dynamic range ($10\text{-}250\ \mu\text{mol L}^{-1}$), quantification and detection limits of $0.047\ \mu\text{mol L}^{-1}$ and $0.014\ \mu\text{mol L}^{-1}$, respectively. The concentrations found in the analyzed samples were in the range of $1.5\text{-}6.2\ \text{mg (100 g)}^{-1}$ and $0.06\text{-}0.15\ \text{g L}^{-1}$ of ascorbic acid for honey and juice, respectively. We also studied the possible of work with the enzyme *ascorbate oxidase* obtained of the cucumber, being the results were comparable with the obtained for the commercial enzyme. The latest study evaluated the levels of uric acid (UA) in samples of urine using the enzyme *uricase* and gold electrode modified by palladium and cellulose acetate. The direct method was based on the detection of H_2O_2 in potential of +0.60 V, generated in the oxidation of uric acid by the enzyme *uricase*. The method showed wide linear dynamic range ($5\text{-}50\ \mu\text{mol L}^{-1}$), quantification and detection limits of $3.32\ \mu\text{mol L}^{-1}$ and $1.05\ \mu\text{mol L}^{-1}$, respectively. The concentrations found in the analyzed samples were in the range of

287- 477 mg L⁻¹. In all studies the results were compared with those obtained by standard methods, showing a good degree of correlation.

Keywords: *Glucose Oxidase*, Glucose, *Ascorbate Oxidase*, Ascorbic Acid, *Uricase*, Uric Acid.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1: Princípios utilizados na detecção de sensores químicos..... | 21 |
| Figura 2: Esquema representativo de um experimento de voltametria cíclica. Ei: potencial inicial, Ef: potencial final e E máx: potencial máximo..... | 26 |
| Figura 3: Representação esquemática da estrutura química de um aminoácido.. | 34 |
| Figura 4: Representação da estrutura tridimensional de uma enzima..... | 35 |
| Figura 5: Representação esquemática do sistema “chave-fechadura”..... | 35 |
| Figura 6: Métodos de imobilização enzimática: (a) adsorção; (b) ligação covalente no suporte; (c) ligação cruzada; (d) encapsulação em matriz; (e) encapsulação em membrana microcápsulas e (f) encapsulação em membrana macroscópicas..... | 42 |
| Figura 7: Reação de suportes aminopropilados para imobilização covalente, usando glutaraldeído como agente de ativação..... | 42 |
| Figura 8: Esquema básico de um sistema de análise por injeção em fluxo (FIA) com detecção amperométrica e propulsão de fluidos por ação gravitacional..... | 45 |
| Figura 9: (A) Abelhas da espécie <i>Apis Melífera</i> . (B) Favo de mel. (C) Amostra de mel..... | 47 |
| Figura 10: Fotos de coqueiro e seu fruto, o coco..... | 52 |
| Figura 11: (A): Coco pronto para ser consumido na forma natural. (B): Carrinho usado para comercialização de água de coco..... | 53 |
| Figura 12: Forrageira do gênero <i>Brachiaria</i> , espécie <i>Brizantha</i> | 55 |
| Figura 13: Sucos naturais e industrializados..... | 59 |
| Figura 14: Diagrama esquemático da imobilização enzimática..... | 65 |
| Figura 15: Reator tubular com enzima imobilizada..... | 65 |
| Figura 16: Foto do potenciostato, sistema FIA utilizado. A – potenciostato; B – Célula eletroquímica; C – Válvula de injeção; D – Bomba peristáltica; E – Reservatório de eletrólito; F – Injetor Manual; G – Alça de amostragem..... | 66 |
| Figura 17: Representação das estruturas químicas da D-Glicose e D-Frutose..... | 68 |
| Figura 18: Reação de oxidação da glicose..... | 70 |
| Figura 19: Espectrofotômetro Shimadzu® UV 1601 PC..... | 74 |

| | |
|--|----|
| Figura 20: Voltamogramas cíclicos de H_2O_2 10 mmol L^{-1} em tampão fosfato (pH 7,4,4; 0,1 mol L^{-1}) usando eletrodos de Au, AuPd e AuPt. Velocidade de varredura: 100 mVs^{-1} | 77 |
| Figura 21: Injeções de glicose 80 $\mu\text{mol L}^{-1}$ para a escolha da melhor condição de trabalho. (A) Volume de amostra de 50 a 300 μL e (B) vazão de 0,8 a 3,5 mL min^{-1} . As medidas foram feitas com um eletrodo de ouro modificado por eletrodeposição de platina. Potencial aplicado + 0,6 V (vs. $\text{Ag/AgCl}_{(\text{sat})}$)..... | 77 |
| Figura 22: Injeções de glicose 80 $\mu\text{mol L}^{-1}$ para a escolha da melhor condição de trabalho. (A) Comprimento do percurso analítico de 20 a 105 cm e (B) Quantidade de enzima de 1 a 12 mg (159 U mg^{-1}). As medidas foram feitas com um eletrodo de ouro modificado por eletrodeposição de platina. Potencial aplicado + 0,6 V (vs. $\text{Ag/AgCl}_{(\text{sat})}$)..... | 79 |
| Figura 23: Curva analítica para a quantificação da glicose nas amostras de mel com concentrações variando de 52 a 200 $\mu\text{mol L}^{-1}$ | 80 |
| Figura 24: Diagrama da curva analítica (P1-P4) para a quantificação da glicose com concentrações variando de 5,2 a 20 $\times 10^{-5}$ mol L^{-1} e 8 amostras de mel (A1 a A8)..... | 81 |
| Figura 25: Comparação de resultados obtidos pelos métodos de amperometria e espectrofotometria para análise de glicose em oito diferentes amostras de mel. Intercepto e inclinação, respectivamente (valor \pm desvio padrão): 0,36 \pm 1,44 % e 0,97 \pm 0,05..... | 82 |
| Figura 26: (A) Estudo do eletrodo de trabalho, utilizando a voltametria cíclica. Dados: [H_2O_2] 10 mmol L^{-1} , eletrólito: tampão fosfato (pH 7,4,4; 100 mmol L^{-1}), eletrodos estudados: Au, AuPd, AuPt e AuPdPt, velocidade de varredura: 100 mVs^{-1} . (B) Potenciais de oxidação do eletrodo de AuPdPt..... | 84 |
| Figura 27: Injeções de glicose 80 $\mu\text{mol L}^{-1}$ para a escolha da melhor condição de trabalho. (A) Volume da alça de amostragem de 50 a 300 μL e (B) taxa de vazão de 1,5 a 4,0 mL min^{-1} . As medidas foram feitas com um eletrodo de ouro modificado por eletrodeposição de platina e paládio. Potencial aplicado 0,6 V (vs. $\text{Ag/AgCl}_{(\text{sat})}$)..... | 85 |
| Figura 28: Curva analítica para a quantificação da glicose nas amostras de água de coco com concentrações variando de 30 a 130 $\mu\text{mol L}^{-1}$ | 86 |
| Figura 29: Diagrama da curva analítica (P1-P6) com concentrações variando de 30 a 130 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e 6 amostras de água de coco (A1 a A6)..... | 86 |
| Figura 30: Comparação de resultados obtidos pelos métodos de amperometria e espectrofotometria para análise de glicose em seis diferentes amostras de água de coco. Intercepto e inclinação, respectivamente (valor \pm desvio padrão): 0,46 \pm 2,69 g L^{-1} e 0,97 \pm 0,10..... | 87 |

| | |
|--|-----|
| Figura 31: Curva analítica para a quantificação da glicose nas amostras de forrageira com concentrações variando de 30 a 110 $\mu\text{mol L}^{-1}$ | 88 |
| Figura 32: Diagrama da curva analítica (P1-P5) com concentrações variando de 30 a 110 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e 6 amostras de forrageira (A1 a A6)..... | 89 |
| Figura 33: Comparação de resultados obtidos pelos métodos de amperometria e HPLC para análise de glicose em seis diferentes amostras de forrageira. Intercepto e inclinação, respectivamente (valor \pm desvio padrão): (12,41 \pm 12,51) g L^{-1} e (0,89 \pm 0,08)..... | 90 |
| Figura 34: Esquema da síntese de vitamina C..... | 93 |
| Figura 35: Representação da fórmula estrutural da vitamina C (ácido ascórbico) | 94 |
| Figura 36: Esquema representativo da primeira ionização do ácido ascórbico..... | 94 |
| Figura 37: Oxidação do ácido ascórbico ao ácido dehidroascórbico..... | 95 |
| Figura 38: Estrutura da enzima ascorbato oxidase..... | 101 |
| Figura 39: A) Estudo do eletrodo de trabalho, utilizando a voltametria cíclica. Dados: [ácido ascórbico] 10 mmol L^{-1} , eletrólito: tampão fosfato (pH 7,4,4; 100 mmol L^{-1}), eletrodos estudados: Au, AuPd, AuPt, AuIr e AuRh, velocidade de varredura: 100 mVs^{-1} . (B) Potenciais de oxidação do eletrodo de AuPd..... | 105 |
| Figura 40: Injeções de ácido ascórbico 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$ para a escolha da melhor condição de trabalho. (A) Volume da alça de amostragem de 50 a 300 μL e (B) taxa de vazão de 1,0 a 4,0 mL min^{-1} . As medidas foram feitas com um eletrodo de ouro modificado por eletrodeposição de paládio. Potencial aplicado 0,6 V (vs. $\text{Ag/AgCl}_{(\text{sat})}$)..... | 106 |
| Figura 41: Curva analítica para a quantificação de ácido ascórbico nas amostras mel com concentrações variando de 1 a 5 $\times 10^{-5}\text{mol L}^{-1}$ | 108 |
| Figura 42: Diagrama da curva analítica (P1-P5) com concentrações variando de 1 a 5 $\times 10^{-5}\text{mol L}^{-1}$ e 7 amostras de mel (A1 a A7)..... | 108 |
| Figura 43: Comparação de resultados obtidos pela amperometria e pela iodometria para análise de ácido ascórbico em oito diferentes amostras de mel. Intercepto e inclinação, respectivamente (valor \pm desvio padrão): 0,34 \pm 0,16 e 0,86 \pm 0,05..... | 109 |
| Figura 44: Relação entre Atividade Enzimática e tempo de armazenamento do extrato puro..... | 112 |
| Figura 45: Curva analítica para a quantificação de ácido ascórbico nas amostras suco com concentrações variando de 20 a 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ | 114 |

| | |
|---|-----|
| Figura 46: Diagrama da curva analítica (P1-P5) com concentrações variando de 20 a 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e 5 amostras de suco (A1 a A5): sem tratamento enzimático, tratamento com enzima comercial e com enzima do extrato do pepino..... | 114 |
| Figura 47: Comparação de resultados obtidos por amperometria: usando enzima comercial e enzima do extrato de pepino para análise de ácido ascórbico em cinco diferentes amostras de suco. Intercepto e inclinação, respectivamente (valor \pm desvio padrão): 0,004 \pm 0,007 e 0,980 \pm 0,072..... | 115 |
| Figura 48: Estrutura do Ácido Úrico..... | 117 |
| Figura 49: Fotografia da mão de uma pessoa com doença de Gota..... | 118 |
| Figura 50: Reação calítica da enzima uricase com oxidação do ácido úrico na presença de oxigênio produzindo alantoina e CO_2 como produtos de oxidação do ácido úrico e H_2O_2 como produto de redução do O_2 | 121 |
| Figura 51: Mecanismo de Chance-George..... | 121 |
| Figura 52: Mecanismo de formação da anti-pirilquinonimina..... | 122 |
| Figura 53: Exemplo de espectro de absorção do complexo anti-pirilquinonimina gerado na determinação de H_2O_2 | 122 |
| Figura 54: Reação global da formação da anti-pirilquinonimina..... | 123 |
| Figura 55: Eletrodo de ouro modificado com Pd e acetato de celulose para diferentes concentrações de H_2O_2 (5, 10, 50, 100 e 500 $\mu\text{mol L}^{-1}$) e ácido úrico (5, 10, 50, 100 e 500 $\mu\text{mol L}^{-1}$). Potencial aplicado 0,6 V (vs. $\text{Ag}/\text{AgCl}_{(\text{sat})}$)..... | 127 |
| Figura 56: Injeções de ácido úrico 10 $\mu\text{mol L}^{-1}$ para a escolha da melhor condição de trabalho. (A) Tempo de reação da enzima com o substrato (0-30 min.) e (B) Volume da solução enzimática (25-200 μL). As medidas foram feitas com um eletrodo de ouro modificado por eletrodeposição de Pd e acetato de celulose. Potencial aplicado 0,6 V (vs. $\text{Ag}/\text{AgCl}_{(\text{sat})}$)..... | 128 |
| Figura 57: Injeções de ácido úrico 10 $\mu\text{mol L}^{-1}$ para a escolha da melhor condição de trabalho. (A) Volume da alça de amostragem de 50 a 300 μL e (B) taxa de vazão de 1,4 a 4,4 mL min^{-1} . As medidas foram feitas com um eletrodo de ouro modificado por eletrodeposição de Pd e acetato de celulose. Potencial aplicado 0,6 V (vs. $\text{Ag}/\text{AgCl}_{(\text{sat})}$)..... | 129 |
| Figura 58: Diagrama de 5 amostras de urina (A1 a A5) e curva analítica (P1-P10) com concentrações variando de 5 a 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (em A); curva analítica (em insert A1) e curva de adição de padrão (em B)..... | 130 |
| Figura 59: Comparação de resultados obtidos pelos métodos de amperometria (curva de calibração e adição de padrão) para análise de ácido úrico em cinco diferentes amostras de urina. Intercepto e inclinação, respectivamente (valor \pm desvio padrão): 1,53 \pm 0,37 g L^{-1} e 0,20 \pm 0,14..... | 131 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|-----|
| Tabela 1: Classes em que as enzimas são divididas..... | 36 |
| Tabela 2: Parâmetros a serem considerados na escolha do suporte para imobilização de enzima..... | 39 |
| Tabela 3: Parâmetros físico-químicos estabelecidos pela Instrução Normativa 11 do MAPA..... | 50 |
| Tabela 4: Evolução do rendimento e dos percentuais de participação regional na produção e área colhida com coco, entre 1985 e 2001..... | 52 |
| Tabela 5: Classificação dos sucos..... | 57 |
| Tabela 6: Condições otimizadas na análise de glicose em amostras de mel..... | 79 |
| Tabela 7: Resultados obtidos na análise de glicose (% m/m \pm desvio padrão) em amostras de mel..... | 82 |
| Tabela 8: Avaliação qualitativa do grau de correlação de Pearson entre duas variáveis..... | 83 |
| Tabela 9: Condições utilizadas na análise de glicose em amostras de água de coco..... | 85 |
| Tabela 10: Resultados obtidos na análise de glicose (g L^{-1} \pm desvio padrão) em amostras de água de coco..... | 87 |
| Tabela 11: Condições usadas na análise de glicose em amostra de forrageira..... | 88 |
| Tabela 12: Resultados obtidos na análise de glicose (mg g^{-1} \pm desvio padrão) em amostras de forrageira..... | 90 |
| Tabela 13: Trabalhos descritos na literatura para a quantificação de ácido ascórbico em diferentes matrizes..... | 98 |
| Tabela 14: Condições utilizadas na análise de ácido ascórbico em amostras de mel..... | 107 |
| Tabela 15: Concentrações de ácido ascórbico ($\text{mg}/100\text{g}$) nas amostras de mel. Os valores em parênteses representa o desvio padrão para as oito amostras (em triplicata), com intervalo de confiança de 95%..... | 109 |
| Tabela 16: Quantidades de soluções utilizadas nos tubos de ensaio..... | 111 |
| Tabela 17: Relação entre o tipo de extrato e a concentração de proteínas totais..... | 111 |

| | |
|---|-----|
| Tabela 18: Relação entre o tipo de extrato e atividade enzimática..... | 111 |
| Tabela 19: Condições utilizadas na análise de ácido ascórbico em amostras de suco..... | 113 |
| Tabela 20: Concentrações de ácido ascórbico ($\text{g L}^{-1} \pm$ desvio padrão) nas amostras de suco..... | 115 |
| Tabela 21: Alguns procedimentos para a determinação de ácido úrico em amostras biológicas..... | 120 |
| Tabela 22: Os resultados dos experimentos de determinação de ácido úrico (gL^{-1}) em amostras de urina..... | 131 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|-------------------|--|
| ABIA | Associação Brasileira das Indústrias de Alimentação |
| AOAC | Association of Official Analytical Chemists |
| Au | Eletrodo de ouro |
| AuIr | Eletrodo de ouro modificado com irídio |
| AuPd | Eletrodo de ouro modificado com paládio |
| AuPdPt | Eletrodo de ouro modificado com uma mistura equimolar de paládio e platina |
| AuPt | Eletrodo de ouro modificado com platina |
| AuRh | Eletrodo de ouro modificado com ródio |
| B | Coeficiente angular da reta de calibração |
| BAW | Bulk Acoustic Wave |
| CAC | Codex Alimentarius Commission |
| CENA | Centro de Energia Nuclear na Agricultura |
| DP | Desvio padrão do branco |
| EA | Eletrodo auxiliar |
| ECS | Eletrodo de calomelano saturado |
| ER | Eletrodo de referência |
| ET | Eletrodo de trabalho |
| FAD | Flavina Adenina dinucleotídeo |
| FADH ₂ | Forma reduzida da Flavina Adenina dinucleotídeo |
| FIA | Flow Injection Analysis ou Análise por Injeção em Fluxo |
| GLU | Glutaraldeído |
| Gox | Glicose Oxidase |
| HPG | Hipoxantina guanina fosforiboxiltransferase |
| HPLC | Cromatografia a liquido de alta eficiência |
| IBGE | Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística |
| IDR | Ingestão Diária Recomendada |
| LD | Limite de detecção |
| LQ | Limite de quantificação |
| MAPA | Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento |
| PhOH | Fenol |
| PMMA | Poli(metiletacrilato) |

| | |
|--------|---------------------------------|
| POD | Peroxidase |
| RSD | Desvio padrão relativo |
| SAW | Surface Acoustic Wave |
| SCE | Eletrodo de Calomelano Saturado |
| UV-Vis | Ultravioleta-Visível |

SUMÁRIO

| | |
|--|----|
| 1 INTRODUÇÃO GERAL | 20 |
| 1.1 SENSORES QUÍMICOS | 20 |
| 1.2 ELETROANALÍTICA | 23 |
| 1.2.1 Células Eletroquímicas | 23 |
| 1.2.2 Voltametria cíclica..... | 24 |
| 1.2.3 Amperometria | 26 |
| 1.3 ELETRODOS MODIFICADOS..... | 27 |
| 1.4 ENZIMAS | 33 |
| 1.5 IMOBILIZAÇÃO ENZIMÁTICA | 37 |
| 1.6 ANÁLISE POR INJEÇÃO EM FLUXO (FIA)..... | 43 |
| 1.7 AMOSTRAS..... | 47 |
| 1.7.1 Mel..... | 47 |
| 1.7.2 Água de coco..... | 50 |
| 1.7.3 Forrageira | 54 |
| 1.7.4 Suco de Frutas..... | 56 |
| 1.7.5 Urina | 59 |
| 2. OBJETIVOS | 62 |
| 3. PARTE EXPERIMENTAL GERAL | 64 |
| 3.1) REAGENTES..... | 64 |
| 3.2) IMOBILIZAÇÃO ENZIMÁTICA..... | 64 |
| 3.3) ELETRODOS E INSTRUMENTAÇÃO..... | 65 |
| 4. IMOBILIZAÇÃO DA ENZIMA GLICOSE OXIDASE PARA A DETERMINAÇÃO AMPEROMÉTRICA DIFERENCIAL DE GLICOSE EM DIFERENTES MATRIZES .67 | |
| 4.1) INTRODUÇÃO..... | 67 |
| 4.1.1) Glicose..... | 67 |
| 4.1.3) Quantificação da glicose..... | 70 |
| 4.2) PARTE EXPERIMENTAL ESPECÍFICA | 73 |
| 4.2.1) Reagentes | 73 |
| 4.2.2) Amostras | 73 |
| 4.2.3) Eletrodos e Instrumentação..... | 74 |
| 4.2.4) Procedimento..... | 75 |

| | |
|--|-----------|
| 4.3) RESULTADOS E DISCUSSÕES | 76 |
| 4.3.1) Mel..... | 76 |
| 4.3.1.1) Eletrodo e potencial de oxidação..... | 76 |
| 4.3.1.2) Vazão e volume da alça de amostragem..... | 76 |
| 4.3.1.3) Comprimento do percurso analítico, quantidade de enzima e seletividade..... | 78 |
| 4.3.1.4) Curva analítica..... | 80 |
| 4.3.1.5) Análise das amostras | 81 |
| 4.3.2) Água de coco..... | 84 |
| 4.3.2.1) Condições de análise | 84 |
| 4.3.2.2) Curva analítica..... | 85 |
| 4.3.2.3) Análise das amostras | 86 |
| 4.3.3) Forrageira | 88 |
| 4.3.3.1) Condições de análise | 88 |
| 4.3.3.2) Curva analítica..... | 88 |
| 4.3.3.3) Análise das amostras | 89 |
| 4.4 CONSIDERAÇÕES FINAIS | 90 |
| 5. IMOBILIZAÇÃO DA ENZIMA ASCORBATO OXIDASE PARA A DETERMINAÇÃO AMPEROMÉTRICA DIFERENCIAL DE ÁCIDO ASCÓRBICO EM AMOSTRAS ALIMENTÍCIAS. | 92 |
| 5.1) INTRODUÇÃO..... | 92 |
| 5.1.1) Ácido ascórbico | 92 |
| 5.1.3) Quantificação de ácido ascórbico | 96 |
| 5.1.4) Tecidos e extratos brutos vegetais como fonte enzimática | 99 |
| 5.2) PARTE EXPERIMENTAL ESPECÍFICA | 103 |
| 5.2.1) Reagentes | 103 |
| 5.2.2) Preparação das amostras..... | 103 |
| 5.2.3) Procedimento..... | 104 |
| 5.3) RESULTADOS E DISCUSSÕES..... | 105 |
| 5.3.1) Quantificação amperométrica de vitamina C em mel, usando a ascorbato oxidase comercial imobilizada em reator tubular. | 105 |
| 5.3.1.1) Eletrodos e potenciais de oxidação | 105 |
| 5.3.1.2) Vazão e volume da alça de amostragem..... | 106 |

| | |
|---|------------|
| 5.3.1.3) Curva analítica..... | 107 |
| 5.3.1.4) Análise das amostras | 108 |
| 5.3.2) Extração da ascorbato oxidase, quantificação de proteínas no extrato e atividade enzimática. | 110 |
| 5.3.3) Quantificação amperométrica de vitamina C em sucos, usando a ascorbato oxidase comercial e a enzima obtida a partir de extratos de pepino, ambas imobilizadas em reatores tubulares..... | 113 |
| 5.3.3.1) Condições de análise | 113 |
| 5.3.3.2) Curva analítica..... | 113 |
| 5.3.3.3) Análise das amostras | 113 |
| 5.4 CONSIDERAÇÕES FINAIS | 116 |
| 6. USO DA ENZIMA URICASE PARA A DETERMINAÇÃO AMPEROMÉTRICA DIFERENCIAL DE ÁCIDO ÚRICO EM AMOSTRAS DE URINA. | 117 |
| 6.1) INTRODUÇÃO..... | 117 |
| 6.1.1) Ácido Úrico | 117 |
| 6.2) PARTE EXPERIMENTAL ESPECÍFICA | 125 |
| 6.2.1) Reagentes | 125 |
| 6.2.2) Amostras | 125 |
| 6.2.3) Procedimento..... | 126 |
| 6.3) RESULTADOS E DISCUSSÕES..... | 126 |
| 6.3.1) Eletrodos | 126 |
| 6.3.2) Tempo de reação enzima / substrato e volume de solução enzimática.. | 127 |
| 6.3.3) Vazão e volume da alça de amostragem..... | 128 |
| 6.3.4) Curva analítica..... | 129 |
| 6.3.5) Análise das amostras | 130 |
| 6.4 CONSIDERAÇÕES FINAIS | 132 |
| 7. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS | 133 |
| REFERÊNCIAS | 136 |

1 INTRODUÇÃO GERAL

A química analítica consiste em um conjunto de idéias e métodos de grande importância em diferentes áreas da ciência e tecnologia, principalmente, no controle de processos industriais, no monitoramento ambiental e em diferentes aplicações na medicina e na biotecnologia. O desenvolvimento de metodologias com alta frequência analítica, confiáveis e de baixo custo para a quantificação de espécies químicas vem evoluindo de maneira acentuada nos últimos anos. Uma das áreas de maior e mais rápido crescimento dentro da química analítica é o desenvolvimento de sensores, principalmente devido aos novos desafios impostos por amostras de interesse industrial, clínico e ambiental, que têm levado a uma crescente busca por sensores com melhores características, tais como alta sensibilidade, seletividade e estabilidade.

1.1 Sensores Químicos

A importância tecnológica dos sensores advém de sua ampla variedade de aplicações, dentre as quais podemos citar as atividades de análise e controle em áreas diversas como agricultura, engenharia civil, medicina, telecomunicações, segurança, meteorologia, transporte, indústria automobilística e monitoramento ambiental [1]. Tais dispositivos podem ser definidos como instrumentos capazes de responder a um sinal ou a um estímulo (alteração de quantidade, propriedade ou condição) [2-3].

Diversos tipos de sensores têm sido desenvolvidos ao longo dos últimos 50 anos com destaque para os sensores químicos o que é consequência da sua relativa facilidade de construção, da sua eficiência na detecção de analitos diversos, e da ampla quantidade de materiais que podem ser utilizados na sua fabricação.

Um sensor químico pode ser definido como um dispositivo que transforma a informação química, tanto relativa à concentração de um componente específico da amostra como de sua composição total, em um sinal analiticamente utilizável [4]. A detecção de espécies químicas por meio de sensores constitui hoje uma das áreas

mais investigadas em ciência e tecnologia, devido a sua grande importância e variedade de aplicações. Tal importância pode ser atribuída à capacidade destes transdutores em fornecer informações sobre a composição de um sistema em curtos intervalos de tempo. Características vantajosas também inerentes ao uso de sensores químicos referem-se à portabilidade, facilidade de automação, possibilidade de miniaturização e baixo custo.

As respostas produzidas pelos sensores químicos na presença de um analito têm origem na sua camada quimicamente seletiva. Tais respostas têm sido caracterizadas em termos de estabilidade, repetitividade, resposta linear, histerese e pelo tempo necessário para sua saturação [1, 3]. Contudo, a seletividade e a sensibilidade são os principais parâmetros que influenciam na aplicabilidade de um determinado sensor químico na detecção de um analito.

A seletividade é definida como a habilidade de um sensor em responder a apenas um analito quando a amostra é constituída por mais de um tipo de substância, enquanto que a sensibilidade descreve a concentração mínima ou a variação de concentração que pode ser determinada com êxito e de maneira reprodutiva pelo dispositivo [3].

Os princípios de detecção mais utilizados em sensores químicos estão apresentados na Figura 1, destacando-se os eletroquímicos que são subdivididos em: potenciométricos, amperométricos, e condutométricos, sendo os sensores amperométricos os de maior destaque [5].

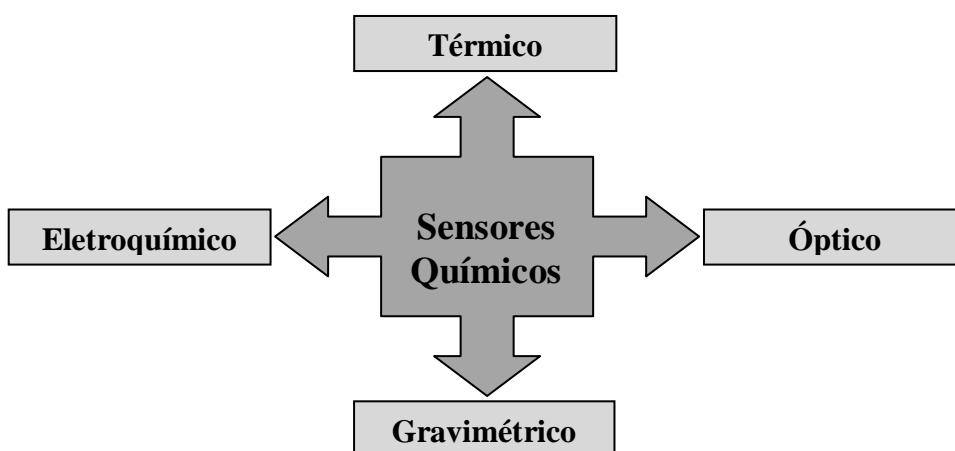


Figura 1: Princípios utilizados na detecção de sensores químicos

Os sensores térmicos são baseados na alteração da energia de um sistema (perda ou ganho de calor), é o princípio de detecção utilizado nos sensores térmicos (do tipo termopar). Estes são basicamente constituídos por um medidor de temperatura recoberto por um material quimicamente seletivo e, encontram maior aplicação na determinação de gases e vapores que reagem quimicamente com este material, pois a detecção é feita pelo acompanhamento da troca de calor envolvida nesta reação [3,6].

Os sensores ópticos foram os menos estudados até agora [5]. Entretanto, existe uma tendência crescente de desenvolvimento de tais dispositivos devido a possibilidade do uso do conhecimento adquirido ao longo dos anos em termos de espectroscopia ótica e tecnologia em fibra ótica para a obtenção de sensores óticos remotos [6].

Os sensores gravimétricos também podem ser chamados de sensores mássicos ou de microbalanças. Existem dois tipos de sensores químicos mássicos, que são os osciladores de onda acústica estrutural (BAW – Bulk Acoustic Wave), também chamado de microbalança de cristal de quartzo, e os osciladores de onda acústica superficial (SAW – Surface Acoustic Wave). Estes sensores são aplicados principalmente na detecção de analitos que adsorvem fisicamente à camada quimicamente seletiva, resultando em uma pequena alteração da sua massa. Assim sendo, a adsorção do analito pode provocar uma alteração da frequência de oscilação do cristal pizoelétrico no BAW ou uma alteração nas propriedades elásticas do filme no caso do SAW, promovendo sua detecção [3, 6 e 7].

Os sensores eletroquímicos predominam entre os demais tipos em termos de versatilidade. Isso porque eles podem ser divididos em três tipos de acordo com o modo de operação, sendo eles: potenciométrico (medição de diferença de potencial), amperométrico (medição de corrente) e condutimétrico (medição de condutividade ou resistividade) [3]. Nos sensores potenciométricos e amperométricos geralmente o eletrodo de trabalho é recoberto com o material seletivo, que reage quimicamente com o analito ou, então, é responsável pela modulação do transporte de carga na presença do mesmo, sendo assim detectado [6].

Entre os diversos sensores eletroquímicos conhecidos, o primeiro a ser utilizado com sucesso foi o eletrodo gotejante de mercúrio, sendo a característica que mais contribuiu para isto foi a possibilidade de renovação da gota após cada

análise (eletrodo descartável de área reproduzível). Esta característica possibilitou a obtenção de resultados bastante reproduzíveis e confiáveis, mesmo em meios onde havia envenenamento rápido do sensor. Problemas como toxicidade do metal, entupimento do capilar de vidro, intervalo estreito de potenciais anódicos para oxidação de analitos e dificuldade na modificação química de sua superfície, entre outros, motivaram os pesquisadores à substituição gradativa do eletrodo de mercúrio por sensores sólidos [8].

1.2 Eletroanalítica

A química eletroanalítica pode ser definida como uma aplicação da eletroquímica que visa resolver problemas analíticos em tempo real e compreende um conjunto de métodos analíticos quantitativos baseados nas propriedades elétricas de um analito em solução. As técnicas eletroanalíticas encontram aplicações nos mais diversos campos desde a pesquisa básica até a análise de rotina. As aplicações em áreas como biotecnologia, na química ambiental, na análise de alimentos, na quantificação ultratraços (traços em microamostras) em materiais utilizados em eletrônica e em novos materiais são reportadas na literatura. Estas técnicas apresentam como características: alta sensibilidade, excelente reprodutibilidade e razoável seletividade [9]. Por ser possível controlar tanto as características do meio em que a medição é executada, quanto as características do transdutor utilizado, a limitação de seletividade pode ser compensada. Dentre as numerosas técnicas eletroanalíticas, cabe destacar a voltametria cíclica e a amperometria.

1.2.1 Células Eletroquímicas

Aplicações envolvendo processos eletroquímicos tiveram início em 1922 com o advento da polarografia, que utilizava uma célula com dois eletrodos. Nesta célula, o eletrodo de trabalho era mercúrio (gotejante), e o segundo eletrodo fazia simultaneamente o papel de eletrodo de referência e auxiliar. Pelo fato do eletrodo

de trabalho ser bem menor que o eletrodo de referência, as variações de potenciais do mesmo eram pouco significativas.

Com a evolução da instrumentação, foi desenvolvido o potenciostato, que utiliza três eletrodos. Este instrumento é construído de forma a possibilitar a medição do potencial aplicado entre o eletrodo de trabalho e o eletrodo de referência sem, contudo permitir a passagem significativa de corrente entre estes eletrodos, evitando assim a polarização do eletrodo de referência (e conseqüente alteração do seu potencial). O processo redox vai ocorrer junto aos eletrodos de trabalho e o eletrodo auxiliar. Durante o processo redox, alterações do potencial do eletrodo de trabalho são compensadas pela alteração do potencial do eletrodo auxiliar, de forma que o mesmo potencial medido pelo eletrodo de referência em relação ao eletrodo de trabalho seja mantido. Esta operação é controlada pelo potenciostato [9].

1.2.2 Voltametria cíclica

A voltametria cíclica é uma das técnicas mais utilizadas para adquirir informações qualitativas sobre os processos eletroquímicos [9-12], pois apesar de nem sempre fornecer resultados com elevada sensibilidade, permite que se obtenha rapidamente informações sobre um sistema eletroquímico. A causa de sua menor sensibilidade (comparada com outras técnicas voltamétricas) é a variação contínua do potencial aplicado. Ao ser variado o potencial, gera-se corrente capacitiva, que vai se somar à corrente faradaica. Em baixas concentrações de analito, a contribuição da corrente capacitiva se torna significativa e como não pode ser distinguida da faradaica, inviabiliza a análise.

As técnicas voltamétricas geralmente envolvem a aplicação de uma perturbação de potencial a um eletrodo (na forma de uma rampa linear de potencial). Um voltamograma cíclico indica em que região de potencial determinada reação redox (composto eletroativo) irá ocorrer. A técnica também fornece outras informações a respeito de um sistema, como: se o processo é reversível, o número de elétrons envolvidos no processo, se ocorre formação de espécies intermediárias, etc. [9-12].

Para utilização das técnicas voltamétricas necessita-se de um potenciostato ou galvanostato. Além disso, utiliza-se uma célula composta por um sistema de três

eletrodos: um de trabalho (ET), um de referência (ER) e um auxiliar (EA), mergulhados em uma solução em repouso. O eletrodo mais importante, onde ocorre a reação de interesse, é o de trabalho, que pode ser constituído de diferentes materiais, dentre os quais, as várias formas de carbono (carbono vítreo, pirolítico, diamante, nanotubos e pó de grafite) e os metais nobres, que apresentam faixa de trabalho mais ampla. Metais menos nobres (cobre, níquel, cobalto,...) e outros podem ser utilizados para determinadas aplicações. O eletrodo auxiliar (construído geralmente por material inerte, na maioria das vezes platina) deve ter área superior à do eletrodo de trabalho e tem a função de fornecer a corrente necessária para sustentar a reação. O eletrodo de referência tem o papel de monitorar o potencial aplicado pelo eletrodo de trabalho. Dessa forma, o ER não pode sofrer alterações de potencial resultantes do fluxo de corrente. Nos potenciostatos modernos, a elevada resistência do circuito evita um fluxo de corrente significativo através do eletrodo de referência e a conseqüente alteração de seu potencial [9-12].

Em um voltamograma cíclico típico, o potencial é linearmente variado com o tempo, partindo de um valor inicial até atingir um potencial final. Neste ponto, a varredura é invertida até atingir o seu ponto de partida novamente. Como resultado, obtém-se um registro de corrente em função da variação do potencial, usualmente denominado voltametria cíclica. Os processos redox que acontece no ET são representados tanto por correntes de picos anódicos (o valor mais alto de corrente anódica) e catódicos (o valor mais alto de corrente catódica) quanto por potenciais de picos anódicos (potencial no qual a corrente anódica apresenta seu valor mais alto) e catódicos (potencial no qual a corrente catódica apresenta seu valor mais alto). A Figura 2 mostra o esquema representativo de um experimento de voltametria cíclica [9-12].

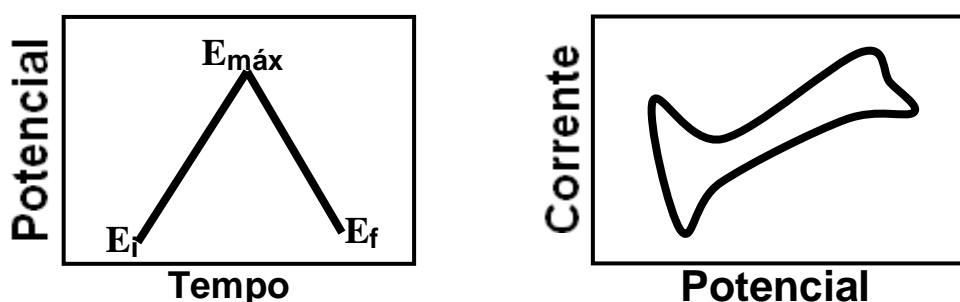


Figura 2: Esquema representativo de um experimento de voltametria cíclica. E_i : Potencial inicial; E_f : Potencial final e $E_{m\acute{a}x}$: Potencial máximo.

1.2.3 Amperometria

A amperometria constitui-se em técnica vastamente utilizada em eletroanálise, principalmente em aplicações típicas envolvendo titulações amperométricas, sensores amperométricos e células em fluxo. Este modo de detecção é utilizada com grande vantagem, comparada com a voltametria cíclica para a quantificação de baixas concentrações de analitos pelo fato de se utilizar um valor fixo de potencial, minimizando assim as variações de carga da dupla camada elétrica e em consequência da corrente capacitiva (que virtualmente deve ser igual a zero). Medidas amperométricas são muito úteis para avaliar biossensores e a forma mais utilizada para tais experimentos é a realização de medidas amperométricas em células convencionais e em fluxo [13].

Nas medições utilizando células eletroquímicas convencionais, inicia-se com o eletrodo de trabalho imerso em eletrólito e, sob agitação ou em um fluxo contínuo, são feitas adições do analito. A corrente inicial medida no eletrólito é muito baixa e resulta apenas de pequenas quantidades de impureza do eletrólito e de eventuais espécies adsorvidas na superfície do eletrodo. Estudos prévios envolvendo técnicas de varredura de potencial são fundamentais para selecionar o potencial de oxidação (ou redução) adequado à análise (bem como para minimizar o efeito dos interferentes). A cada adição, corresponde um aumento de corrente, que é proporcional ao analito adicionado. O registro resultante indica o tempo de resposta do eletrodo de trabalho (indicado pelo tempo necessário para que um novo patamar de corrente seja atingido) e a faixa de resposta que pode ser atingido, até a saturação do mesmo [13].

Medidas envolvendo análise em fluxo geram sinais transientes, que são proporcionais a diversos parâmetros, dentre os quais o volume da amostra injetado e o fluxo da solução. A técnica amperométrica quando associada a métodos de análise em fluxo, torna-se bastante atraente para aplicações práticas, em especial quando envolve um número significativo de análises [13].

Uma das limitações desta técnica consiste na sua baixa seletividade. Se a análise é realizada em potenciais extremos (positivos ou negativos), promove-se a oxidação ou a redução de todas as espécies que são eletroativas em potenciais abaixo do valor estabelecido. Portanto, é aconselhável empregar valores mínimos de potencial [13].

1.3 Eletrodos modificados

Fred Anson, na década de 60 e início da década de 70, trabalhou intensamente para entender as propriedades de processos de adsorção na superfície de eletrodos. A importância particular de seus estudos reside no fato de que muitos deles envolviam compostos de coordenação e destes estudos surgiram regras relativamente simples que descrevem as propriedades de uma ampla série de adsorventes [14].

Os primeiros trabalhos envolvendo a preparação de eletrodos com superfícies modificadas surgiram no início da década de 70. Até então, somente eletrodos inertes, tais como mercúrio, platina, ouro e carbono eram utilizados em química eletroanalítica. Nestes trabalhos, Lane (1973) e Hubbard (1973) [15, 16] modificaram deliberadamente a superfície de eletrodos de platina com várias olefinas funcionalizadas e, desta forma, exploraram a propensão de grupos alcenos adsorverem quimicamente sobre a superfície do eletrodo. Nestes trabalhos pioneiros foram realizadas observações importantes. Entre elas, foi verificada a capacidade do eletrodo de platina modificado com ácido 3-alil-salicílico aumentar o sinal da oxidação de Fe^{+2} e da redução de Fe^{+3} . Este fato possivelmente tenha sido a primeira indicação da utilidade analítica dos eletrodos quimicamente modificados, pois demonstrou a capacidade de um grupo imobilizado complexar um íon metálico e também a possibilidade de se direcionar a coordenação através da escolha do potencial aplicado. Nesta época, percebeu-se que a modificação da superfície inerte do eletrodo poderia conduzir à elaboração de vários sensores, para as mais diversas aplicações.

Em 1975, Moses e colaboradores [17] descreveram a modificação química da superfície de eletrodos de SnO_2 com organosilanos e introduziram o termo eletrodo quimicamente modificado. Modificar um eletrodo consiste em atribuir e controlar novas propriedades físico-químicas, por meio do acoplamento de espécies eletroativas (ou não) à sua superfície. Ao bloquear o acesso de espécies indesejadas à superfície do eletrodo, inibi-se alguns processos e promove-se outros. A modificação dos eletrodos tem por objetivo originar sinais de corrente mais elevados do que na ausência do modificador o que provoca uma melhor sensibilidade do método analítico.

A partir destes trabalhos pioneiros, a preparação e utilização de eletrodos quimicamente modificados têm se expandido de forma acentuada, como pode ser verificado pelo expressivo número de trabalhos publicados sobre o tema nos últimos anos (135 trabalhos publicados nos últimos dez anos. Fonte: www.periodicos.capes.gov.br) Além da eletroanálise, que tem se destacado como uma das áreas mais ativas neste campo, os eletrodos quimicamente modificados têm sido utilizados para outros fins que não analíticos, incluindo estudos básicos de eletrocatalise, de cinética de transferência eletrônica, de permeação de membranas, síntese eletroorgânica e fotoeletroquímica [18]. Por isso, a associação das vantajosas características dos eletrodos com os processos de modificação de superfícies tem sido amplamente explorada.

Em um eletrodo modificado sua superfície é propositadamente alterada por métodos de imobilização, como: (a) adsorção, (b) eletroadsorção, (c) formação de compósitos, (d) formação de ligação covalente e (e) recobrimento com membranas poliméricas.

(a) Adsorção:

A adsorção foi o processo pioneiro e é a maneira mais simples de fixar o agente modificador ao substrato do eletrodo base. Esse processo consiste na dissolução do agente modificador em um solvente apropriado e na exposição, em geral, por imersão do eletrodo à solução, sendo a adsorção devido a forças eletrostáticas, hidrofóbicas ou dispersivas na superfície do eletrodo. Eletrodos de carbono apresentam uma capacidade particular de quimisorverem reagentes que possuam sistemas de elétrons π estendidos, como por exemplo, compostos orgânicos aromáticos. Outro processo de modificação consiste na deposição de uma quantidade específica de solução modificadora com o auxílio de uma micropipeta sobre a superfície do eletrodo e a evaporação do solvente [18].

Vários eletrodos modificados por adsorção são apresentados na literatura recente, em que podemos destacar o eletrodo de carbono vítreo modificado com um filme de acetato de celulose contendo o polímero 2,6-diclorofenolindofenol, desenvolvido como sensor para análise de injeção em fluxo de amostras de resíduos urbanos [19]; o eletrodo de carbono vítreo modificado com hexacianoferrato de cobre para uso na determinação amperométrica de sulfito e dióxido de enxofre,

baseado na oxidação eletrocatalítica do analito pelo eletrodo modificado [20]; eletrodo de ouro modificado pela adsorção de dodecanotiol (98%), utilizado em medidas de impedância para análise da interação entre compostos aromáticos e a camada do tiol adsorvida [21].

Embora simples, esta técnica apresenta a desvantagens de produzir eletrodos quimicamente modificados com no máximo uma camada do modificador imobilizado, o que limita a faixa de resposta linear. Além disso, em se tratando o fenômeno de adsorção de um processo em equilíbrio, inevitavelmente ocorrerá a dessorção do modificador para o meio, durante sua utilização, o que acarreta em perda de reprodutibilidade, reduzindo, portanto a vida útil do eletrodo.

(b) Eletroadsorção:

A eletroadsorção ocorre a partir da adsorção efetuada pela aplicação de um potencial ao eletrodo. A quantidade depositada é uma função do tempo de deposição, sendo possível a formação de multicamadas. O potencial aplicado ao eletrodo determina a velocidade da reação e, por conseqüência, a estrutura da camada adsorvida. Uma velocidade de varredura baixa significa mais tempo disponível para formar uma camada com estrutura cristalina perfeita, que seria desejável, mas a baixa velocidade da eletroadsorção muitas vezes não compensa o uso de sobrepotenciais tão baixos. A aplicação de um potencial nas condições ideais e na presença de uma molécula suscetível de polimerizar pode produzir radical, iniciando a polimerização e a subsequente modificação do eletrodo [9]. Cabe destacar alguns trabalhos descritos na literatura usando este método de imobilização: eletrodo de carbono vítreo modificado por deposição eletroquímica de partículas de paládio, sendo utilizado como sensor amperométrico na determinação cromatográfica de sulfetos em soluções aquosas [22]; eletrodo de carbono vítreo modificado com cobre, sendo utilizado como sensor amperométrico na detecção eletroquímica de compostos de enxofre em meio alcalino [23]; eletrodo de carbono vítreo modificado com um filme de hexacianoferrato de índio tem sido utilizado na determinação de óxido de nitrogênio (NO) pela oxidação eletrocatalítica do filme modificador [24].

(c) Formação de compósitos:

Um compósito é uma mistura de componentes, portanto outra forma de preparar um “eletrodo quimicamente modificado” consiste em misturar o agente modificador com o substrato do eletrodo. É adequada para modificar eletrodos à base de pasta de carbono, grafite-epóxi, eletrodos impressos e pastilhas. Quando possível, preferencialmente, utiliza-se um método derivado daquele que foi descrito anteriormente, que consiste em misturar a grafite em pó a uma solução adequada de agente modificador. Após a evaporação do solvente as partículas de grafite ficam recobertas pelo modificador e isto resulta numa distribuição mais homogênea deste último. Em ambos os casos também podem ocorrer perda gradual do agente modificador para a solução prejudicando a reprodutibilidade. Para minimizar o problema o eletrodo pode ser recoberto com algum filme polimérico e, desta forma, diminuir ainda mais a perda do agente modificador para a solução [18].

Exemplos da confecção destes eletrodos são amplamente descritos na literatura atual, sendo que muitos deles são usados como sensores. Por exemplo, sensores de ouro e platina modificados com azul da Prússia foram desenvolvidos para a detecção amperométrica de peróxido de hidrogênio, estes sensores também foram usados como substrato na construção de biossensores modificados com a enzima *glucose oxidase* com membrana de náfion para a determinação de glucose [25], eletrodos impressos de carbono modificados com ftalocianina de cobalto usado na determinação de H₂S [26] e determinação de amostras gasosas de espécies sulfuradas [27]; eletrodo de pasta de carbono modificado com ftalocianina de cobalto usado como detector eletroquímico em cromatografia líquida para análises de cisteína em urina humana [28].

(d) Formação de ligação covalente:

O modificador também pode ser ligado covalentemente ao substrato do eletrodo. Por exemplo, existem as reações de silanização, envolvendo organosilanos e óxidos presentes à superfície do eletrodo. A maioria dos eletrodos metálicos, quando oxidados em meio ácido, são recobertos com uma fina camada de óxido, muito reativa em relação à silanos. Portanto, um metal após ser oxidado pode ser silanizado e, posteriormente, reagir com outra molécula, contendo o grupo funcional

que se queira imobilizar. O silano atuará como uma “ponte” para fixar um grupo funcional à superfície do eletrodo [18].

Superfícies de carbono apresentam grupos óxidos funcionais tais como alcoóis ou fenóis, cetonas ou quinonas, ácidos carboxílicos e anidridos, resultantes da oxigenação de átomos de carbono do plano vertical, contendo ligações incompletas. A concentração destas funções pode ser aumentada através de reações de oxidação, sendo inclusive passíveis de derivatização. Portanto, a modificação de superfície de eletrodos de carbono, via ligação covalente do agente modificador, é em grande parte baseada na manipulação da reatividade destes grupos funcionais, frente a reagentes como aminas, organosilanos, cloreto de tionila entre outros. Também é explorada a possibilidade de modificar covalentemente superfícies de eletrodos de carbono livres de óxidos. Nestes casos, as reações envolvem os próprios átomos de carbono do plano vertical. Tratamentos como abrasão mecânica ou fratura sob atmosfera inerte, “decapagem” por plasma de argônio ou termólise sob vácuo são capazes de gerar superfícies livres de óxidos com grande reatividade quando expostos a uma variedade de reagentes [18].

Os eletrodos modificados via ligação covalente são mais estáveis em relação aos obtidos pelos demais métodos, entretanto, são mais difíceis de preparar. Da mesma forma que a modificação por adsorção, esta metodologia também gera coberturas com no máximo uma monocamada imobilizada. Um biossensor para a determinação de glicose foi construído usando um eletrodo de carbono vítreo modificado com um filme de azul da Prússia e polipirrol ligado via ligação covalente com a enzima *glicose oxidase* [29]. Outro sensor para a detecção de glicose também foi construído, desta vez imobilizando glicose oxidase via ligação covalente usando glutaraldeído e náfion num eletrodo de carbono impresso modificado com azul da Prússia [30].

(e) Recobrimento com membranas poliméricas:

Trata-se de uma técnica bastante atrativa para a preparação de eletrodos modificados. Nesta técnica, os filmes poliméricos usados no recobrimento da superfície do eletrodo, são materiais condutores ou permeáveis ao eletrólito suporte e à espécie de interesse. Dependendo da aplicação pode ser escolhido um polímero eletroativo (quando o objetivo for uma eletrocatalise), quimicamente ativo (para

propriedades ligantes ou de troca iônica para pré-concentração) ou inerte (quando se quer apenas exclusão de interferentes). Os filmes eletroativos se subdividem em duas categorias principais que dependem de como o centro redox é imobilizado: polímero redox, se o centro redox é parte do esqueleto polimérico; polímeros de troca iônica, se o componente redox ativo é um contra-íon de um filme poli-iônico, como polovinilpiridina ou Nafion [18].

A cobertura polimérica pode ser obtida a partir de soluções de polímeros pré-formados, ou através de polimerização *in situ* a partir de unidades monoméricas. Neste último caso o recobrimento polimérico pode ser obtido via eletropolimerização ou por meio de métodos não eletroquímicos como, por exemplo: polimerização ativada por plasma, foto-indução por radiação ultravioleta ou polimerização de organosilanos [18].

Ao contrário da modificação por adsorção ou por formação de ligação covalente, a modificação com membranas poliméricas permite a imobilização de muitas monocamadas (1 a 2000) da espécie ativa na superfície modificada, o que resulta na ampliação da resposta eletroquímica. As melhorias de seletividade e sensibilidade em função das modificações feitas nas superfícies de eletrodos foram investigados por vários pesquisadores, inclusive brasileiros. Delbem e colaboradores (2002) [31] descreveram a descoberta catalítica de NADH usando eletrodo de pasta de carbono modificado por eletropolimerização de 3,4 – bis- hidroxibenzaldeído. Sotomayor e colaboradores (2003) [32] estudaram a construção e aplicação de um sensor amperométrico para dopamina, usando eletrodo de carbono vítreo modificado com membrana de Náfion e dopado com cloreto de 2-2 bipyridil de cobre (II). Mattos e Gordon (2001) [33] mostraram que biossensores de glicose podem ser construídos com filmes de prussiatos com superfícies azuis e excelente desempenho.

A escolha do material suporte, em que a superfície será modificada, também é um aspecto de extrema relevância na preparação de um eletrodo quimicamente modificado. Este substrato deve apresentar características eletroquímicas apropriadas e também ser adequado para o método de imobilização selecionado. Entre os materiais convencionais está o ouro, platina, carbono vítreo, mercúrio na forma de filme, pasta de carbono, material plástico condutor e vidros condutores.

A caracterização de eletrodos modificados pode ser efetuada por métodos eletroquímicos, espectroscópicos e microscópicos. Dos métodos eletroquímicos

realça-se a voltametria cíclica, a cronocoulometria e a espectroscopia de impedância eletroquímica, que juntos permitem determinar o número de centros redox, a condutividade do filme, a cinética dos processos de eletrodo, etc. [9].

1.4 Enzimas

A maior parte da história da bioquímica é a história da pesquisa sobre enzimas. A catálise biológica foi inicialmente reconhecida e descrita no início do século XIX, em estudos sobre a digestão da carne por secreções do estômago e a conversão do amido em açúcares simples pela saliva e por vários extratos vegetais. Na década de 50, Louis Pasteur concluiu que a fermentação do açúcar em álcool pela levedura é catalisada por “fermentos”. Ele postulou que esses fermentos, depois nomeados de enzimas, eram inseparáveis da estrutura das células vivas do levedo, uma hipótese que prevaleceu por muitos anos como verdadeira. A descoberta, por Eduard Buchner, em 1897, de que os extratos de levedo podiam fermentar o açúcar até álcool, provou que as enzimas envolvidas na fermentação continuavam funcionando mesmo quando removidas da estrutura das células vivas. Isto encorajou os bioquímicos a tentarem o isolamento das numerosas enzimas diferentes e a examinarem suas propriedades catalíticas. Então se sabe que as reações catalisadas por enzimas vêm sendo utilizadas pelo homem há muitos anos. Porém, o modo de ação dos catalisadores biológicos só recentemente foi elucidado, precedido por uma série de fatos que culminaram nos conhecimentos com diferentes propósitos como a determinação de fármacos, fenóis, inibidores, em fim, diferentes analitos de interesse científico, tecnológico e ambiental [27].

As enzimas são catalisadores muito potentes e eficazes, quimicamente são definidas como proteínas. As proteínas consistem de cadeias polipeptídicas muito longas, tendo de 100 a mais de 2000 aminoácidos unidos por ligações peptídicas (que é uma ligação química covalente que ocorre quando o grupo carboxila de uma molécula reage com o grupo amino de outra, a ligação resultante C-N é chamada ligação peptídica). Os aminoácidos apresentam em sua fórmula química um grupo carboxílico (-COOH), um grupo amino (-NH₂) e um radical R (cadeia carbônica) conforme, pode-se visualizar na Figura 3. Os aminoácidos são diferenciados de

acordo com o grupo R ligado ao carbono assimétrico, os quais variam em estrutura, tamanho e carga elétrica, e influenciam na solubilidade do aminoácido em água [27].

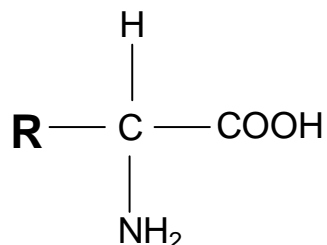


Figura 3: Representação esquemática da estrutura química de um aminoácido.

Um catalisador é uma substância que acelera uma reação química, ao diminuir a energia de ativação do sistema reacional. Como catalisadores, as enzimas são capazes de aumentar a taxa de certas reações em cerca de 10^{14} vezes, sem requerer condições extremas de temperatura, pressão e/ou pH. O contraste entre reações catalisadas por enzimas e utilizando catalisadores químicos é bem ilustrado pelo processo de fixação do nitrogênio (redução do N_2 a amônia). A *nitrogenase* catalisa a reação a temperaturas em torno de 300 K e pH próximo à neutralidade. Por outro lado, na síntese industrial da amônia a partir de nitrogênio e hidrogênio as condições usadas são: temperaturas entre 700 e 900 K, pressão entre 100 e 900 atm, na presença de ferro e outros óxidos metálicos como catalisadores [27].

Durante uma reação enzimática as enzimas convertem o substrato em produto e a velocidade da reação catalisada é aumentada devido à diminuição da energia de ativação. A atividade enzimática depende do pH do meio, da temperatura, da presença de determinadas moléculas, genericamente chamadas cofatores cuja natureza é muito variável, podendo ser, por exemplo, um ou mais íons metálicos (como o ferro), ou uma substância orgânica (como a vitamina B_{12}) e também depende de outras substâncias, que podem inibir a sua atividade, diminuindo-a ou eliminando-a totalmente; são os chamados inibidores enzimáticos [27].

Conforme representado na Figura 4, as enzimas por apresentarem estruturas terciária ou quaternária, são dotadas de dobramentos tridimensionais em suas ligações polipeptídicas, o que lhes confere uma forma característica e exclusiva;

assim, diferentes enzimas têm diferentes formas e, portanto, diferentes papéis biológicos [28].

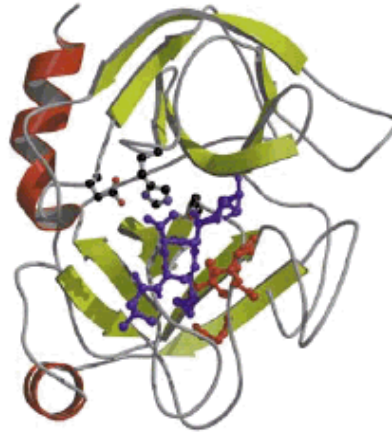


Figura 4: Representação da estrutura tridimensional de uma enzima
Fonte: www.ufrgs.br/alimentus/pao/imagens/enzima consulta em 05/07/2010.

Para que uma enzima atue, é necessário que os substratos "se encaixem" na enzima. Esse "encaixe", porém, depende da forma, isto é, do "contorno" da enzima. Por isso, substratos que se "encaixam" em uma determinada enzima não se "encaixam" em outras diferentes, e a reação não ocorre; daí a especificidade das enzimas quanto aos substratos em que atuam. Uma vez ocorrido o "encaixe", forma-se o complexo enzima-substrato, que se assemelha ao sistema "chave-fechadura". O local da enzima onde o substrato se "encaixa" é denominado sítio ativo (ou centro ativo). No caso de substâncias que reagem entre si, sob a ação catalisadora das enzimas, a reação é facilitada, tornando-se mais rápida, pois a proximidade entre as moléculas "encaixadas" acelera o processo reativo; após a reação, a enzima desliga-se do substrato e permanece intacta (Figura 5) [28].

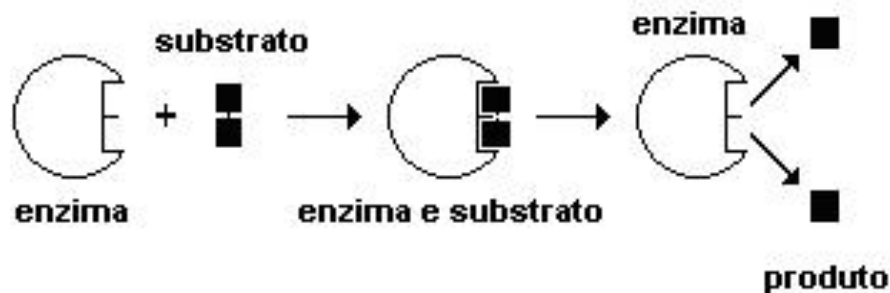


Figura 5: Representação esquemática do sistema "chave-fechadura".
Fonte: www.dombosco.com.br/Curso/estudemais/biologia/sist_digestorio consulta em 05/07/2010

Pelos critérios de classificação e nomenclatura, as enzimas são divididas em seis grupos de acordo com o tipo de reações que catalisam. Cada um desses grupos ainda é subdividido em classes e subclasses, numeradas de tal forma que cada enzima possa ser identificada sem ambiguidade [28]. A Tabela 1 trás a classificação geral das enzimas segundo sua atividade.

Tabela 1: Classes em que as enzimas são divididas segundo Marzzoco e Torres (2006) [28].

| Classes | Subclasses | Tipo de reação catalisada |
|----------------|-------------------|---|
| Classe 1 | Oxirredutases | Catalisam reações de oxirredução. Exemplo: desidrogenases e oxidases. |
| Classe 2 | Transferases | Transferem grupos químicos entre moléculas. Exemplo: Transaminases. |
| Classe 3 | Hidrolases | Utilizam a água como receptor de grupos funcionais de outras moléculas. Exemplo: Peptidases. |
| Classe 4 | Liasas | Formam ou destroem ligações duplas, respectivamente retirando ou adicionando grupos funcionais. Exemplo: descarboxilases. |
| Classe 5 | Isomerases | Transformam uma molécula em seu respectivo isômero. Exemplo: epimerases |
| Classe 6 | Ligases | Formam ligações químicas por reações de condensação, consumindo energia sob a forma de ATP. Exemplo: sintetases. |

As enzimas apresentam um leque de possibilidades de aplicações químicas, biotecnológicas, biomédicas e farmacêuticas. A sua alta seletividade (em alguns casos especificidade) e poder catalítico determinam suas possíveis aplicações industriais e biotecnológicas. Atualmente, elas são utilizadas em diferentes processos como: biossensores em bioengenharia, clinicamente em agentes terapêuticos, em modernos kits de diagnóstico e como catalisadores em reações químicas e bioquímicas [29-31].

Como mencionado anteriormente, o uso de enzimas em processos tecnológicos necessita de condições específicas para que se tenha atividade ótima da enzima, as quais são estreitamente dependentes de condições particulares de pH, temperatura e estequiometria. Por causa disto, muitas técnicas estão sendo

propostas a fim de superar estes problemas e melhorar as aplicações enzimáticas. Além disso, nas reações químicas e bioquímicas, são utilizadas enzimas purificadas, as quais apresentam alto custo e ainda tem que ser descartadas após cada reação, o que não torna o processo econômico [30, 31].

1.5 Imobilização enzimática

Um outro aspecto a ser ressaltado é o uso de diversas enzimas comerciais ou obtidas *in natura* na forma imobilizada, bem como suas aplicações na análise amperométrica usando eletrodos e/ou microeletrodos modificados com diferentes materiais e na análise espectrofotométrica para o monitoramento de substâncias de interesse ambiental, clínico e alimentício.

Desde a segunda metade do século XX, esforços tem sido aplicados no sentido de desenvolver suportes para a imobilização de enzimas a fim de possibilitar a utilização das mesmas em processos contínuos. Através da imobilização, detectou-se redução de custos através da separação da enzima do meio reacional mais eficiente por meio de filtração, além de possibilitar a reutilização da enzima e proporcionar um controle mais eficiente de processos em grande escala. Também foi possível melhorar o desempenho da enzima como: manutenção ou aumento da atividade, aumentar a estabilidade térmica e operacional em maiores faixas de pH e de temperatura, além de aumentar a seletividade da enzima pelo substrato [31-34].

O principal interesse em imobilizar uma enzima é obter um biocatalisador com atividade e estabilidade que não sejam afetadas durante o processo, idealmente, a enzima imobilizada deverá exibir uma atividade catalítica superior. Além disso, não deveram ocorrer alterações estruturais, bem como modificação no sítio ativo [35].

Atualmente, um grande número de materiais têm sido propostos como suporte para imobilização de enzimas, sejam eles sintéticos ou naturais, com diferentes formatos e tamanhos, porosos e não porosos, com diferentes graus de hidrofiliabilidade [30].

Segundo Cao, Lagen e Sheldon (2003) [36], o critério de seleção do suporte e seus parâmetros geométricos são especialmente dependentes do desenho e da configuração do reator (batelada, tanque com agitação, coluna, etc.). Deve-se considerar o meio reacional (aquoso, ácido ou alcalino, solvente orgânico ou em

duas fases) e ainda o sistema reacional (suspensão, líquido-líquido, sólido-líquido ou sólido-sólido), bem como as condições de pH e temperatura do processo. Além de atender os quesitos funcionais, um suporte ideal deve ser aplicável, de custo razoável e seguro para o uso. Na Tabela 2 são relacionados os parâmetros que devem ser avaliados para a escolha do suporte adequado ao tipo de reação, a fim de se obter um resultado mais eficiente.

A imobilização pode ocorrer através da adsorção ou ligação da enzima em um material insolúvel, pelo uso de um reagente multifuncional através de ligações cruzadas, confinamento em matrizes formadas por géis poliméricos ou encapsulação através de uma membrana polimérica (Figura 6) [37].

Imobilização via ligação

(a) Imobilização por adsorção: a enzima é imobilizada em um suporte sólido por ligações de baixa energia, tais como interações de Van der Waals ou hidrofóbicas, ligações de hidrogênio e iônicas, entre outras (Figura 6a). Vários materiais podem ser usados para este propósito e a escolha de um deles depende de suas propriedades, como força mecânica, estabilidade física e química, caráter hidrofóbico ou hidrofílico, capacidade de adsorção de enzima e custo [33]. O procedimento de adsorção é simples e é um dos métodos mais utilizados. Por exemplo, Carta e colaboradores. (1991) [38] estudaram a imobilização de *lipase* em Nylon 6, Basri e colaboradores (1996) [39] imobilizaram esta mesma enzima em três suportes diferentes: Amberlite XAD 7, poli(metilmetacrilato) (PMMA) e celite. Apesar da simplicidade, este método tem algumas desvantagens, tais como: lixiviação da enzima durante o processo analítico, desnaturação e baixa estabilidade da enzima e o “envenenamento” rápido do suporte, devido ao fato da enzima se encontrar exposta ao meio [40, 41].

Tabela 2: Parâmetros a serem considerados na escolha do suporte para imobilização de enzima segundo Cao, Langen e Sheldon (2003) [36].

| Parâmetros | Requisitos | Benefícios |
|--|---|---|
| Suporte | <p>Partícula de tamanho e formato adequado.</p> <p>Fácil de separar.</p> <p>Alta estabilidade mecânica.</p> <p>Alta estabilidade química.</p> | <p>Facilitam separação e melhor controle da reação.</p> <p>Rapidez, disponibilidade, custo/benefício.</p> <p>Sem alterações significantes em sua estrutura interna.</p> <p>Não se decompor, não se contaminar.</p> |
| Enzima | <p>Alta atividade por volume (U/g).</p> <p>Seletividade pelo substrato.</p> <p>Estabilidade térmica.</p> <p>Estabilidade operacional.</p> <p>Estabilidade conformacional.</p> | <p>Alta produtividade em menor volume e menor tempo de reação.</p> <p>Controle de reações secundárias em paralelo a reação principal, facilidade de separação do produto final.</p> <p>Redução do tempo reacional por aumento da temperatura.</p> <p>Apresentar custo/benefício.</p> <p>Modulação das propriedades enzimáticas.</p> |
| Enzima imobilizada | <p>Reutilização.</p> <p>Aplicabilidade.</p> <p>Reprodutibilidade.</p> <p>Facilidade de uso e manuseio.</p> | <p>Baixar custos.</p> <p>Tolerância de variações dentro do processo.</p> <p>Garantia da qualidade do produto.</p> <p>Facilitar.</p> |
| Considerações econômicas e ecológicas | <p>Volume pequeno.</p> <p>Descarte fácil.</p> <p>Segurança para o uso</p> | <p>Facilitar o manuseio, armazenamento e descarte.</p> <p>Comprometimento ambiental.</p> <p>Atender as normas de segurança</p> |

(b) Imobilização por ligação covalente: envolve a formação de ligações covalentes entre os grupos funcionais presentes na superfície do suporte e os grupos funcionais

dos resíduos de aminoácidos da enzima [(-NH₂) da lisina e arginina, o -CO₂H do ácido aspártico ou glutâmico, a (-OH) da serina ou tionina e o grupo (-SH) da cisteína], sendo, portanto, necessário um conhecimento prévio da estrutura química da enzima e da natureza do suporte. Nesse procedimento estão envolvidas duas etapas químicas: na primeira, os grupos funcionais do suporte (aminoalquila, aminoarila, 3-glicidoxipropil-carboxila, etc.) são ativados por reagentes específicos como, por exemplo, o glutaraldeído (GLU), que introduz um grupo carbonila, susceptível a reações com os grupos nucleofílicos da enzima, segunda etapa do processo (Figura 7) [37]. Tem como vantagens: minimização da lixiviação e uma maior estabilidade do complexo enzima/suporte em relação aos efeitos da variação do pH, da força iônica e do solvente. Entretanto, outras ligações químicas adicionais podem ocorrer durante a imobilização e provocar a desativação parcial ou total da enzima [40,41].

A imobilização da enzima via ligação covalente pode envolver dois processos: (1) formação de uma ligação covalente da enzima com um material insolúvel em água (Figura 6b) ou (2) pela formação de ligações cruzadas em um suporte, contendo a enzima e vários agentes bifuncionais (Figura 6c).

O segundo processo é o mais amplamente utilizado e baseia-se na formação de ligações cruzadas entre os grupos amino do suporte com os grupos amino da enzima, ou então na formação de ligações cruzadas intermoleculares com a formação de partículas insolúveis macroscópicas, pela utilização de reagentes bi- ou multifuncionais (glutaraldeído, isocianatos, carbodiimida, entre outros) [40]. As principais vantagens deste método são a simplicidade de execução e a forte interação da enzima com o suporte, o que diminui a lixiviação e proporciona ao eletrodo uma maior estabilidade. O procedimento também apresenta desvantagens bem menos irrelevantes quando comparadas às associadas à imobilização por adsorção.

Tan e colaboradores (2002) [42] obtiveram monossacarídeos por hidrólise do óleo de palma utilizando *lipases* imobilizadas em membranas de quitosana, álcool polivinílico e mistura de quitosana/ álcool polivinílico, utilizando glutaraldeído ou epicloridrina como agente multifuncional. Amorim e colaboradores (2003) [43] imobilizaram esta mesma enzima em filmes de quitosana, utilizando também como agente multifuncional o glutaraldeído.

Imobilização via encapsulação

(c) Imobilização por encapsulação: a imobilização via confinamento em matrizes, formadas por géis poliméricos (Figura 6d), ou encapsulação através de uma membrana polimérica consiste em “confinar” uma proteína em um polímero insolúvel ou em uma microcápsula (Figura 6e e 6f). Os dois processos são muito similares, porém no caso da microencapsulação (encapsulação por membrana) a enzima está totalmente envolvida pelo sistema, que é constituído por uma célula artificial delimitada por uma membrana porosa, onde moléculas grandes, tais como enzimas, não são capazes de difundir através desta membrana, diferentemente do que ocorrem com pequenas moléculas como substratos e produtos [41].

A vantagem de utilização de ambas as técnicas é que a enzima não interage quimicamente com o polímero evitando, assim, a sua desnaturação. Porém, a transferência de massa através da membrana pode ser um problema. A velocidade de difusão dos substratos e produtos através da membrana é um fator limitante e geralmente, são necessárias altas concentrações de substratos a fim de minimizar esta influência. As enzimas encapsuladas (em matriz ou membranas) apresentam atividade mais elevada com substratos de baixa massa molecular, pois estes compostos se difundem pela membrana e se aproximam com mais facilidade do sítio ativo enzimático [33].

Stamakis & Xanakis (1999) [44] utilizaram agentes gelificantes naturais, como gelatina, agarose e k-carragenanas como matrizes para a imobilização de *lípsases* e conseguiram manter a atividade catalítica desta enzima na esterificação do ácido láurico com propanol.

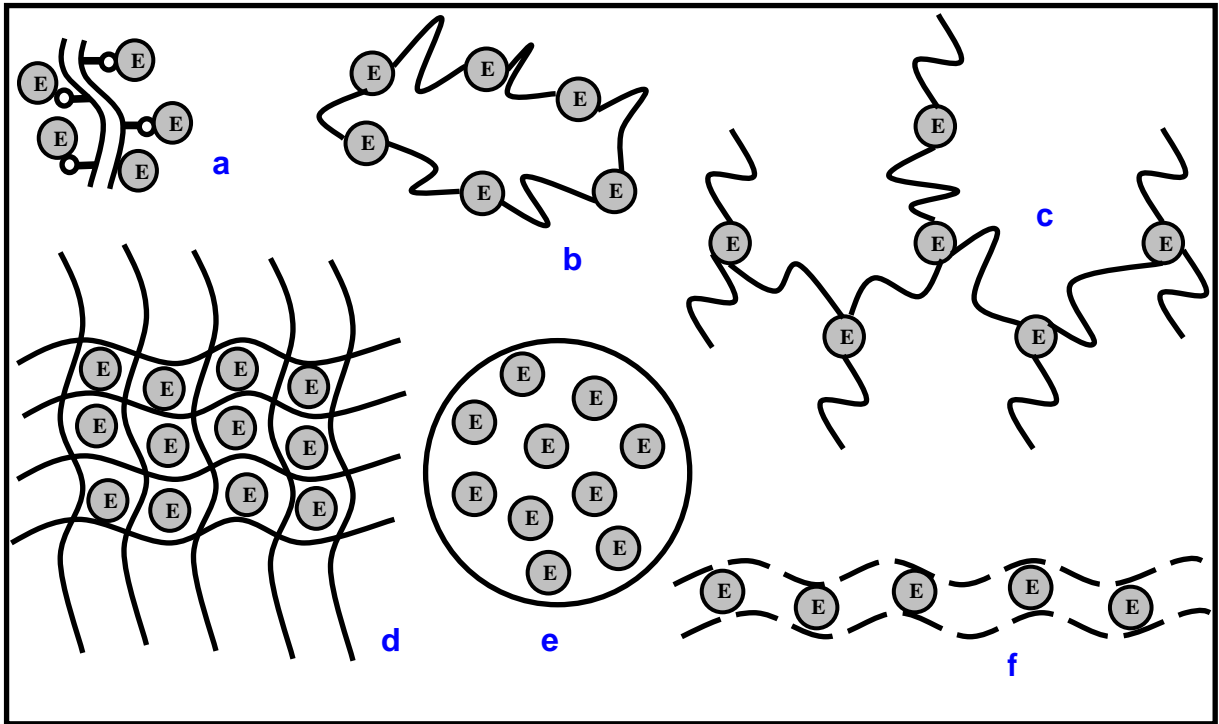


Figura 6: Métodos de imobilização enzimática: (a) adsorção; (b) ligação covalente no suporte; (c) ligação cruzada; (d) encapsulação em matriz; (e) encapsulação em membrana microcápsulas e (f) encapsulação em membrana macroscópicas.

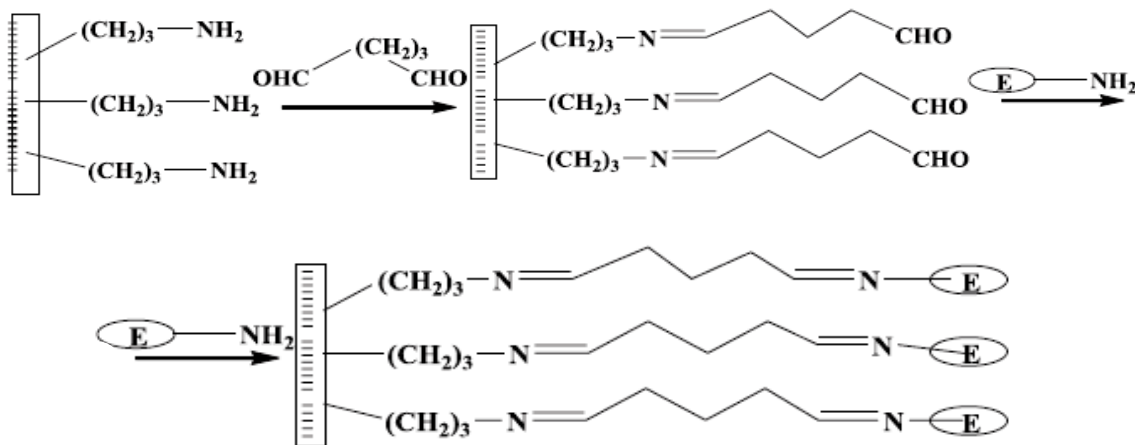


Figura 7: Reação de suportes aminopropilados para imobilização covalente, usando glutaraldeído como agente de ativação. Fonte: Cardoso, Moraes e Cass (2009) [45].

Embora a formação das ligações covalentes múltiplas dependa da escolha adequada do suporte e do grupo ativador, a seleção de uma condição ideal para imobilização é fundamental para uma boa atividade enzimática. Mateo (2007) [46] destacam algumas dessas variáveis críticas:

- (A) *Tempo de reação*: embora o processo de imobilização seja muito rápido, a interação múltipla em pontos não complementares da enzima e em seus suportes é um processo lento e dependente do tempo. É necessário um correto alinhamento entre os grupos, os já imobilizados e os parcialmente enrijecidos na superfície do suporte;
- (B) *pH*: apesar da maioria das imobilizações acontecer em meio neutro, em muitos casos o processo de imobilização ocorre em meio alcalino, onde a reatividade de nucleófilos das proteínas (e.g.: aminoácido lisina) é melhorada com uma maior atividade no complexo suporte enzimático. Alguns grupos amino terminais tem pK_b entre 7 e 8, enquanto da lisina apresenta um valor de 10,5;
- (C) *Temperatura*: temperaturas moderadamente altas podem favorecer as vibrações na enzima e no suporte, aumentando a possibilidade de maiores ligações entre enzima e suporte;
- (D) *Tampões*: não devem interferir na reação. Exemplo: tampão borato pode comprometer a reação entre aldeídos e aminas; compostos aminados (tris, etanolamina) modificam suportes epóxidos ou competem com a lisina por grupos aldeídos;
- (E) *Inibidores ou protetores enzimáticos*: a presença de inibidores ou outros compostos protetores podem reduzir a imobilização covalente múltipla e a atividade enzimática.

1.6 Análise por injeção em fluxo (FIA)

Um dos problemas encontrados com a eletroanalítica está relacionado com a baixa seletividade, pois mais de uma espécie eletroativa pode responder a certas condições estabelecidas. Assim, o uso de eletrodos modificados associados a métodos de automação de análises constitui-se em uma poderosa ferramenta para a resolução rápida e confiável de análises de amostras complexas.

A análise por injeção em fluxo (FIA) foi proposta na metade dos anos 70 e introduzida no Brasil em 1976 por pesquisadores do Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA) da Universidade Federal de São Paulo. Ela pode ser definida como um processo de automatização de procedimentos analíticos, no qual a amostra em solução aquosa (e eventualmente os reagentes) é introduzida em um fluxo contínuo e não segmentado de um fluido transportador [47]. A zona de amostra sofre dispersão durante o transporte, sendo então misturada com as soluções transportadora e reagente. A zona de amostra resultante é conduzida em direção ao sistema de detecção, gerando um sinal transiente, que é registrado em um sistema de aquisição de dados e usualmente quantificado em relação à altura máxima. Durante o transporte, a amostra pode sofrer tratamentos em linha através de colunas contendo reagentes sólidos para separação e pré-concentração, ou conversão a outra espécie mais adequada para a quantificação [47]. Estes estudos representaram um avanço significativo no campo da automação em química analítica [48], contribuindo sensivelmente na evolução dos processos de introdução de amostras, sistemas de detecção e propulsão [49, 50]. A facilidade em se controlar o tempo do procedimento de injeção a partir de dispositivos eletrônicos e com a construção/acoplamento de detectores controlados por microcomputador permitiu que os sistemas assumissem características automáticas [51].

O esquema de um sistema de análise por injeção em fluxo com detecção amperométrica pode ser observado na Figura 8. A solução carregadora passa pelo detector impulsionada, por exemplo, por uma bomba peristáltica. A amostra é introduzida na solução carregadora pelo injetor, que tem uma alça de amostragem a ser preenchida pela sucção da amostra com uma seringa hipodérmica ou sistema similar.

A representação gráfica típica do resultado é denominada de fiograma e este apresenta proporcionalidade direta entre a altura ou a área dos picos e a concentração da amostra [50]. Devido à facilidade, praticidade e comodidade, prefere-se trabalhar com a altura do pico.

Quando se injeta uma amostra ao fluxo carregador, ocorre a formação de uma zona que é transportada para um detector. Este mede continuamente a absorvância, corrente em um eletrodo ou outros parâmetros físicos que sofrem alteração quando de passagem desta zona de amostragem pelo detector no sistema em fluxo [52].

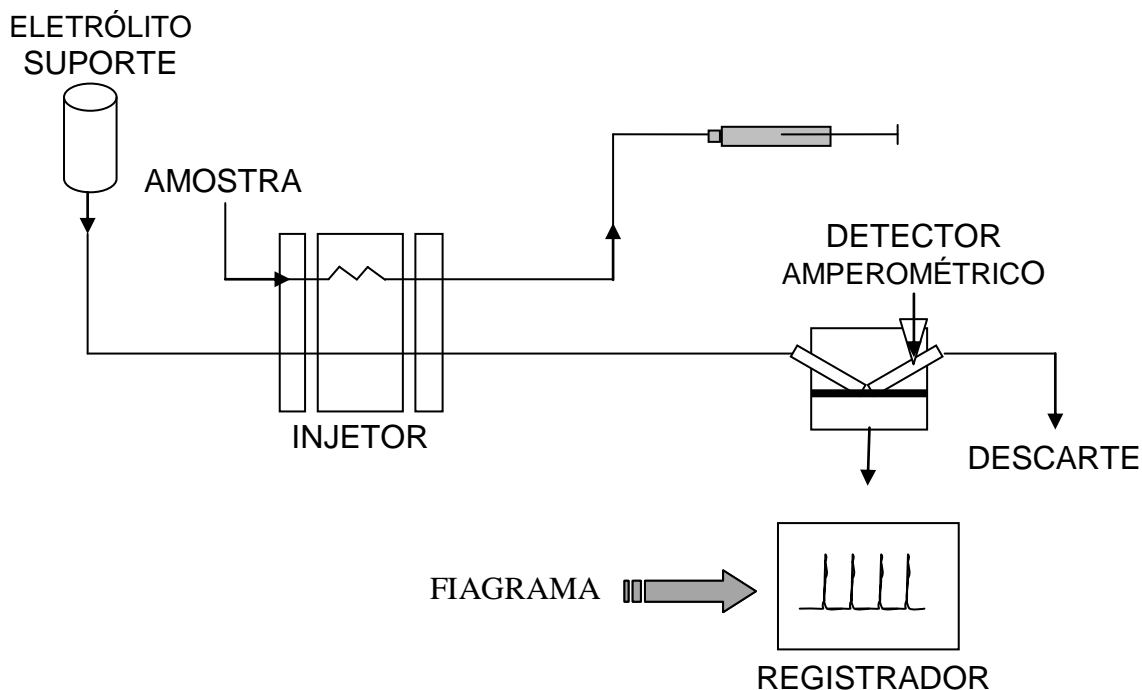


Figura 8: Esquema básico de um sistema de análise por injeção em fluxo (FIA) com detecção amperométrica e propulsão de fluidos por ação gravitacional.

Um sistema de análises em fluxo típico consiste de quatro partes iguais [47]:

1- Sistema de propulsão de fluidos, que pode ocorrer à vazão constante, empregando geralmente uma bomba peristáltica, ou a pressão constante, podendo ser empregados dispositivos de ação gravitacional. Porém, neste caso, o módulo de análise é usualmente limitado à configuração em linha única e a vazão depende da viscosidade das soluções e dimensões do percurso analítico.

2- Sistema de injeção, que é o dispositivo fundamental do sistema, pois além de introduzir amostras e reagentes, também pode ser empregado para selecionar diferentes vazões, introduzir componentes e redirecionar o fluxo, aumentando a versatilidade do processo. Existem vários tipos de injetores, mas os mais comuns são a válvula de seis vias e o injetor proporcional, ou injetor comutador (desenvolvido por pesquisadores do CENA/USP). Este último, consiste em três partes de acrílico, sendo duas fixas e uma parte móvel, que pode ser deslocada em relação as laterais, um passo para frente ou para trás. Por meio deste movimento, o injetor coleta uma alíquota da amostra e a insere no percurso analítico, podendo ser empregado também para inserção de reagentes e outras soluções que por ventura sejam necessárias.

3- Percurso analítico, considerado todo o espaço pelo qual o fluido transportador conduz a zona de amostra desde o injetor até o sistema de detecção. É onde ocorrem as reações químicas necessárias à detecção do analito. Seu dimensionamento deve levar em consideração a cinética da reação química empregada, e conseqüentemente o tempo de residência da zona da amostra, definido também em função das vazões do transportador e dos reagentes.

4- Sistemas de detecção, podendo ser empregados praticamente todos os detectores usuais em química analítica.

Uma particularidade do sistema de FIA que contribuiu para sua propagação como técnica analítica é a repetibilidade das operações envolvidas no sistema, como injeção, propulsão das soluções e a regulação do tempo dessas operações. Com isso, sistemas de análises por injeção em fluxo permitem que sejam realizadas análises químicas, sem que a reação química tenha se completado, fator primordial para metodologias utilizadas em bateladas. Considerando-se essas características dos sistemas em fluxo, podem-se empregar reagentes instáveis em diversas determinações analíticas com boa precisão e exatidão, uma vez que a velocidade de decomposição do reagente pode ser controlada. O tempo de residência de um reagente no sistema de análise por injeção em fluxo é da ordem de 1 minuto, assim, o tempo de vida em que um reagente necessita ser estável não deve ser muito superior a este tempo [53].

Embora a metodologia FIA seja uma das mais recentes técnicas baseadas em fluxo, a sua aplicação compreende já mais de 5000 artigos publicados, abrangendo desde analitos inorgânicos a enzimáticos, desde íons a macromoléculas, desde quantidades traços a altas concentrações de analito, podendo ser utilizada em meios aquosos ou não aquosos [54, 55]. O próprio conceito e definição de análise por injeção em fluxo tem evoluído, devido ao fato das potencialidades que a técnica foi oferecendo ao longo dos tempos e à sua grande versatilidade de aplicação.

1.7 Amostras

1.7.1 Mel

O mel é utilizado como alimento desde a antiguidade, registros relatam que a apicultura e o uso de produtos apícolas já eram utilizados pelos egípcios há cinco mil anos atrás. Muitos povos consideravam o mel como o alimento dos deuses e o utilizavam em oferecimento a divindades como agradecimento, penitência ou reparação nos rituais religiosos, foi também utilizado para conservação de múmias e frutas [56]. O interesse pelo mel durante muitos anos se manteve grande, principalmente devido às características adoçantes como o único produto natural com essa propriedade até 1900 quando foi gradualmente substituído pelo açúcar da cana [56].

A matéria prima do mel é o néctar das flores ou exsudatos sacarídeos das partes vivas das plantas, que é coletado pelas abelhas e transformado em mel, originando uma substância viscosa, aromática e açucarada (Figura 9) [57]. Podem ser classificados em: monofloral, constituído do néctar de uma única espécie floral ou quando a maior predominância for de uma única espécie floral; polifloral, quando constituído do néctar de mais de uma espécie floral e extrafloral que não provem do néctar, sendo produzido a partir de exsudato de plantas ou restos de frutas [58].

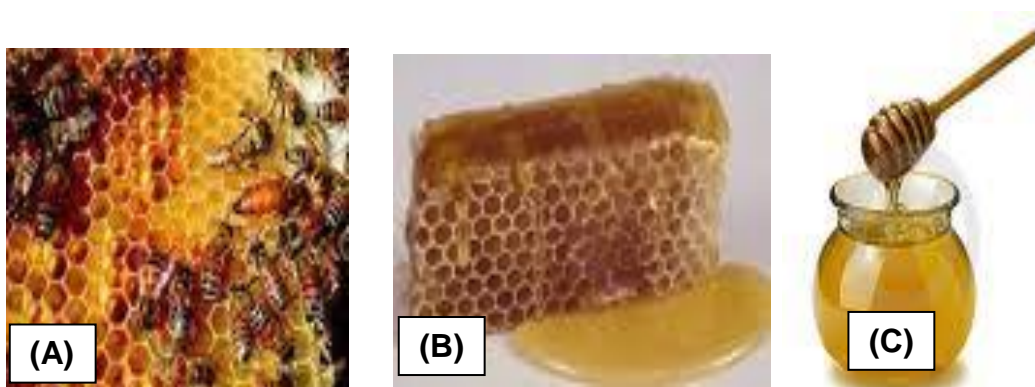


Figura 9: (A) Abelhas da espécie *Apis Melífera*. **Fonte:** www.clubesat.com/noticias/piaui-supera-a-expectativa-na-exportacao-de-mel-907, consulta em 18/08/2010. (B) Favo de mel. **Fonte:** www.sol4web.eu/oliveira/artigosdetalhe.php?codArtigo=17, consulta em 18/08/2010. (C) Amostra de mel. **Fonte:** www.viapalhoca.com.br/article/xi-feira-do-mel-no-largo-da-alfndega, consulta em 18/08/2010.

No estado de Minas Gerais são encontrados, com facilidade, três tipos de mel, principalmente o de flores silvestres, devido à vasta diversidade de espécies botânicas, que florescem o ano todo, o mel de flor de eucalipto (*Eucalyptus spp*), provenientes das grandes áreas de reflorestamento e o mel de flor de laranjeira (*Citrus spp*), que possuem maior procura devido a suas características próprias obtidas a partir do néctar cítrico [58].

O mel contém frutose e glicose (60-85%) como os monossacarídeos predominantes, maltose e sacarose (7-10%) como dissacarídeos, melezitose como trissacarídeo e outros oligossacarídeos de baixo peso molecular. Entre outros compostos, podemos encontrar também antioxidantes, ácidos, proteínas, minerais, flavonóides, vitaminas e enzimas [59].

Entre as diversas vitaminas encontradas no mel temos: riboflavina (Vitamina B2) 1,5 mg/Kg, aneurina (Vitamina B1) 0,1 mg/Kg, ácido pantatênico (Vitamina B3) 2 mg/Kg, ácido nicotínico (Vitamina B5) 1 mg/Kg, piridoxina (Vitamina B6) 5 mg/Kg, ácido ascórbico (Vitamina C) 30 a 34 mg/Kg, além das vitaminas E, K e carotenóides (pró-vitamina A). As vitaminas e os sais minerais, juntamente com as enzimas, dão ao mel um valor importante de alimento regulador em função dos açúcares, das enzimas e vitaminas [60].

A utilização do mel na nutrição humana não deveria limitar-se apenas a sua característica adoçante, como excelente substituto do açúcar, mas principalmente por ser um alimento de alta qualidade, rico em energia e inúmeras outras substâncias benéficas ao equilíbrio dos processos biológicos de nosso corpo.

Além de sua qualidade como alimento, esse produto único é dotado de inúmeras propriedades terapêuticas, sendo utilizado pela medicina popular sob diversas formas e associações como fitoterápicos. Apresenta propriedades antimicrobianas, antissépticas, antibacteriana, antianêmica, emoliente, antiputrefante, digestiva, laxativa e diurética [61].

Em função da complexidade de sua matriz surge a necessidade da comunidade científica identificar e quantificar outros componentes possivelmente encontrados no mel. A determinação de sua composição química tem vários propósitos analíticos como a verificação da adulteração do alimento, determinação da origem geográfica e botânica e identificação de compostos farmacologicamente ativos. Os dois primeiros exemplos são típicos de controle de qualidade do alimento

e o último, um dos mais revistos nas pesquisas, é o estudo do uso potencial do mel na medicina moderna como agente antimicrobiano e antioxidante.

A adulteração no mel ocorre principalmente, com produtos de menor valor comercial, como glicose comercial, solução ou xarope de sacarose, melado e solução de sacarose invertida [58]. Para isso, foram criados métodos específicos para análise de mel pela “Association of Official Analytical Chemists” (AOAC) e “Codex Alimentarius Commission” (CAC), que pudessem estabelecer um controle da qualidade por intermédio de análises físico-químicas adequadas [62]. Muitos destes métodos de análises, estabelecidos mundialmente, foram utilizados pela legislação brasileira e são utilizados não somente para constatar adulteração, mas também como indicador da qualidade do mel. No Brasil, os parâmetros de qualidade do mel estão regulamentados pela Instrução Normativa 11, de 20 de outubro de 2000 do MAPA (Tabela 3). Esta normalização é baseada nas normas e diretivas do MERCOSUL (Resolução MERCOSUL GMC, 15/94) as quais estão descritas na Portaria 367 de 4 de setembro de 1997 do MAPA. [63, 64].

Tabela 3: Parâmetros físico-químicos estabelecidos pela Instrução Normativa 11 do MAPA. Fonte: Pataca (2006) [64].

| Parâmetro | Valores estabelecidos | Métodos de análise |
|----------------------------|--|---|
| Açúcares Redutores | Mel Floral: mínimo 65 %. Melato ou Mel de Melato: mínimo 60%. | CAC ^a / Vol. III, Supl. 2, 1990, 7.1. |
| Umidade | Máximo 20 % | AOAC ^b 16 th Edition, Rev. 4 th , 1998 – 969.38B |
| Sacarose aparente | Mel Floral: mínimo 6 %. Melato ou Mel de Melato: mínimo 15 %. | CAC / Vol. III, Supl. 2, 1990, 7.2. |
| Sólidos Insolúveis em Água | Máximo 0,1%. Para mel prensado: máximo 0,5% | CAC / Vol. III, Supl. 2, 1990, 7.4. |
| Minerais (cinzas) | Máximo 0,6 %. Melato ou Mel de Melato: máximo 1,2 % | CAC / Vol. III, Supl. 2, 1990, 7.5. |
| Acidez | Máximo de 50 meq Kg ⁻¹ | AOAC 16 th Edition, Rev. 4 th , 1998 – 962.19 |
| Hidroximetilfurfural | Máximo de 60 mg Kg ⁻¹ | AOAC 16 th Edition, Rev. 4 th , 1998 – 980.23B |
| Atividade diastásica | Mínimo de 8 na escala de Gothe | CAC / Vol. III, Supl. 2, 1990, 7.7. |

(a) *Codex Alimentarius Commission* (CAC). Programa Conjunto da Organização das Nações Unidas para a Agricultura e a Alimentação e da Organização Mundial da Saúde e (b) AOAC: *Association of Official Analytical Chemists*.

1.7.2 Água de coco

O coqueiro, cientificamente chamado de *Cocos nucifera L.* pertence ao gênero *Cocos* e à família *Palmae*, é originário do Sudeste Asiático [65]. É de importância mundialmente reconhecida, sendo cultivado em mais de 86 países situados nos trópicos, tanto para consumo “in natura” como para fins industriais, com 360 modalidades de aproveitamento [66] (Figura 10).



Figura 10: Fotos de coqueiro e seu fruto, o coco. **Fonte:** www.es.gov.br/site/noticias/show.aspx?noticiald=99687274, consulta em 20/08/2010.

A produção brasileira de coco, que em 2001 chegou a 1,3 bilhões de frutos, está distribuída por quase todo o território nacional, com exceção dos estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina, em função das suas limitações climáticas durante parte do ano. Em 1985 a área colhida com coqueiro no Brasil situava-se em torno de 166 mil hectares. E entre 1985 e 2001 houve um incremento na área colhida que ultrapassou os 100 mil hectares, dos quais se estima que 70% são representados pela variedade de coqueiro anão, 15% com coqueiro híbrido e 15% com coqueiro gigante.

Nesse mesmo período, verificaram-se um deslocamento das áreas tradicionais de produção de coco em direção às demais regiões do país, principalmente para o Norte e Sudeste, como mostrado na Tabela 4. Pode-se constatar que a região Nordeste detinha em 1985, mais de 94% da produção e mais de 96% da área colhida com coco, diminuindo sua participação em 2001, para 71,2% da produção brasileira e para 87,6% da área total colhida. Em contrapartida, somando-se as produções das regiões Norte e Sudeste, observa-se que a participação destas, na produção total, passou de 5,6% para 28,8% entre 1985 e 2001. O aumento significativo tanto no percentual de produção e principalmente do rendimento por hectare, observado para estas regiões, pode ser atribuído à utilização da variedade anã que se caracteriza por uma maior produção de frutos por hectare.

A participação dessas duas regiões no total da área colhida não acompanhou a evolução registrada pela produção naquele período, devido aos altos índices de rendimento obtidos em áreas de expansão recente da cultura, onde são utilizados

sistemas de produção intensivos e alto grau de tecnologia, como aconteceu no Sudeste que, em 2001 chegou a atingir rendimento acima dos 14.869 frutos/ha, tendo como destaque o estado do Espírito Santo que conseguiu médias superiores aos 15.169 frutos/ha (Tabela 4).

Tabela 4: Evolução do rendimento e dos percentuais de participação regional na produção e área colhida com coco, entre 1985 e 2001. Fonte: IBGE- Produção Agrícola Regional.

| Região | % de produção | | % de área colhida | | Rendimento/ha | |
|----------|---------------|------|-------------------|------|---------------|------|
| | 1985 | 2001 | 1985 | 2001 | 1985 | 2001 |
| Nordeste | 94,4 | 71,2 | 96,2 | 87,6 | 3,3 | 4,1 |
| Norte | 3,8 | 14,8 | 2,3 | 7,7 | 5,6 | 9,7 |
| Sudeste | 1,8 | 14,0 | 1,5 | 4,7 | 4,2 | 14,9 |

No Brasil existem três variedades específicas de coqueiro: anão, gigante e híbrido [67, 68]. Os coqueiros híbridos são obtidos do cruzamento entre o coqueiro anão e o gigante. Porém, no Brasil esse cultivo é bastante escasso, pois plantações homogêneas de híbridos requerem custos elevados, uma vez que, há a necessidade de se ter híbridos geneticamente controlados e não híbridos naturais [67].

Os coqueiros anões apresentam precocidade de formação de frutos (2 a 3 anos) e alta produtividade (100 a 200 frutos por ano) quando comparados aos coqueiros gigantes (precocidade: 6 anos e produtividade: 50 a 60 frutos por ano). Em função dessas características, o coqueiro anão é destinado a suprir o mercado de água de coco e o coqueiro gigante abastece, principalmente, a agroindústria, que utiliza a polpa para produção de leite de coco, o coco ralado e óleo de coco [67,68].

Uma das maneiras de aproveitamento do fruto do coqueiro é o consumo da água de coco (Figura 11). A água de coco é o líquido do endosperma encontrado dentro da cavidade do coco que começa a se formar 2 meses depois da abertura natural da inflorescência e atinge seu volume máximo nos frutos com idade entre 6 e 7 meses [68, 69].



Figura 11: (A): Água de coco pronto para ser consumido na forma natural. **Fonte:** www.chamamed.com/homeclinic/index.php?option=com_content&view=article&id=2188:dicas-para-o-emagrecimento&catid=16, consulta em 24/08/2010. (B): carrinho usado para comercialização de água de coco. **Fonte:** www.permutalivre.com.br/186863/carrinho-para-agua-de-coco, consulta em 24/08/2010.

A água de coco é uma bebida saborosa, nutritiva e pouco calórica (27 kcal/100g) [70]. Corresponde a 25% do peso do fruto e a quantidade de água varia de 300 a 600 mL/coco. É mais palatável cerca de 7 meses após a polinização e o conteúdo de sólidos totais é próximo a 5% em peso. O sabor é doce e levemente adstringente [71].

Os maiores constituintes químicos da água de coco são os açúcares e minerais que conferem o sabor agradável à água e a tornam uma bebida isotônica natural. Em média, a água de coco apresenta a seguinte composição: sacarose (280 mg/100 mL de água de coco), frutose (2400 mg/100 mL), glicose (2378 mg/100 mL), cálcio (17,10 mg/100 g), fósforo (7,4 mg/100 g), sódio (7,05 mg/100 g), magnésio (4,77 mg/100 g) e potássio (156,86 mg/100 g). Os menos presentes são as gorduras e as substâncias nitrogenadas. As concentrações de sais minerais podem variar, principalmente em função da variedade da palmeira, grau de maturação, tipo de solo cultivado e do uso de fertilizantes [69, 70].

Os açúcares, presentes nesta bebida, encontram-se na forma dissolvida e a quantidade de sacarose e glicose variam de acordo com o grau de maturação do fruto [72]. Ocorre uma perda de 2% nos teores de açúcar no intervalo de sete a doze meses. O conhecimento dos níveis desses açúcares na água de coco associado à idade do fruto é de fundamental importância para se determinar a melhor época de colheita, quando o fruto se destina ao mercado consumidor como coco verde, onde

a água é o principal produto e, conseqüentemente, sendo o sabor da mesma o principal atributo de avaliação [73].

No ano de 2000, já haviam no país cerca de 80 indústrias de pequeno e três de grande porte, envasando a água de coco que concorre diretamente com o mercado de refrigerantes. Segundo a Associação Brasileira das Indústrias de Alimentação (ABIA) são consumidos no país 10 bilhões de litro/ano de refrigerantes. O consumo de água de coco representa 1,4% deste mercado, ou seja, 140 milhões de litro [74].

1.7.3 Forrageira

Forrageiras são plantas e grãos usados na alimentação de ruminantes. O gênero *Brachiaria* tem fornecido importantes espécies forrageiras para as regiões tropicais tanto na África e Austrália, e, mais recentemente (década de 40) na América do Sul. Nestas áreas, espécies de *Brachiaria* formam pastagens que se adaptam às mais variadas condições de solos (Figura 12). De um modo geral, pode-se atribuir o crescente papel que o gênero *Brachiaria* vem assumindo nas regiões pecuárias, às seguintes características: são gramíneas de alta produção de matéria seca, as principais espécies são estoloníferas (ou seja, a partir de um nó, no colmo da planta, são emitidas raízes de uma nova planta), adaptam-se a uma grande gama de tipos de solos, não apresentam problemas limitantes de doenças e seu crescimento é bem distribuído durante a maior parte do ano [75]. A importância atual destas forrageiras tem determinado um amplo esforço da pesquisa, visando conhecer com mais profundidades suas qualificações e limitações.



Figura 12: Forrageira do gênero *Brachiaria*, espécie *Brizantha*. **Fonte:** www.ourofino.com/portal/node/3119, consulta em 24/08/2010, www.grupofacholi.com.br/facholi/bracharia_xaraes, consulta em 24/08/2010, www.pontodoleite.com.br, consulta em 24/08/2010, respectivamente.

Grande parte da massa sólida das forragens são constituídas por carboidratos, principal fonte de energia para os ruminantes, sendo que seu aproveitamento é feito após o desdobramento em ácidos graxos voláteis e em outros ácidos através do processo de fermentação do rúmen.

As forrageiras de clima tropical, em relação aos carboidratos, comparadas a de clima temperado, são caracterizadas com baixos teores de carboidratos solúveis e altos teores de carboidratos estruturais tendo, portanto, maiores proporções de parede celular em razão da sua natureza anatômica com alta proporção de tecido vascular [76].

As características nutritivas dos carboidratos das forrageiras dependem dos açúcares que os compõem, das ligações entre eles estabelecidas e de outros fatores de natureza físico-química. Assim, os carboidratos das plantas podem ser agrupados em duas grandes categorias, conforme sua maior ou menor degradabilidade, em estruturais e não estruturais, respectivamente [76].

Os carboidratos estruturais são aqueles que formam a parede celular, sendo que os mais importantes são as celuloses, hemiceluloses e a pectina. A natureza e a concentração dos carboidratos estruturais da parede celular são os principais determinantes da qualidade da forragem, onde que de 30-80% da matéria seca é oriunda da parede celular. Os níveis destes tipos de carboidratos são bem mais elevados nas folhas que no caule [77].

Quanto aos carboidratos não estruturais pode-se dizer que são carboidratos do conteúdo celular tais como os mais simples, glicose e frutose, e os carboidratos de reserva da planta, como amido e a sacarose. Estes carboidratos de reserva têm uma solubilidade de média a elevada, e o amido destaca-se com sendo o mais importante, porém, na parte aérea das forragens em relação à sacarose sua concentração é pequena e varia entre as espécies tropicais e temperadas [76].

A relação entre carboidratos estruturais e não estruturais é importante na alimentação de ruminantes, uma vez que alimentos onde a concentração de não estruturais é muito mais elevada que os dos estruturais podem conduzir a distúrbios digestivos em razão dos produtos intermediários de fermentação, como é o caso da acidose metabólica, e é por essa causa que um ruminante deve consumir dietas com um mínimo de 18% de fibra bruta [78]. Fibra bruta é a porção dos carboidratos totais, sendo em maior parte constituída por celulose, que apresenta baixa digestibilidade para a maioria dos animais, se tornando fonte de energia, promovendo o bom funcionamento intestinal e estimulando os movimentos peristálticos [79].

1.7.4 Suco de Frutas

A moderna tecnologia possibilitou nos últimos anos o aparecimento progressivo de novos produtos alimentícios, cujo consumo pela população, aumentou rapidamente, devido à intensa e sofisticada propaganda veiculada através dos diferentes meios de comunicação, principalmente nos grandes centros urbanos.

Um exemplo refere-se aos sucos industrializados de frutas, que surgiram no mercado nacional há mais de duas décadas, inicialmente restringindo-se a duas espécies frutíferas (uva e tomate) e estendendo-se aos poucos a diversas espécies; hoje em dia pode-se dispor de grande número de variedades de sucos, capazes de satisfazer às exigências da maioria dos consumidores.

Os sucos de fruta, de acordo com a Lei 8.918/1994 conforme Decreto 2314/1997, podem ser definidos como todos os produtos obtidos por extração de frutas maduras por processos tecnológicos adequados. Os sucos são sistemas complexos que consistem de uma “mistura” aquosa de vários componentes orgânicos voláteis e instáveis, responsáveis pelo sabor e aroma do produto, além de

açúcares, ácidos, sais minerais, vitaminas e pigmentos [80]. A Tabela 5 trás a classificação dos sucos em diferentes categorias.

Tabela 5: Classificação dos sucos [81].

| Quanto à natureza da fruta | Quanto à concentração | Quanto à forma de preservação |
|--|---|---|
| Cítrico Exemplo: laranja, limão, tangerina e pomelo. | Simples: prontos para beber, com concentração de sólidos solúveis na faixa de 8 a 13 graus Brix. | Congelados: preservados pela temperatura baixa de estocagem e comercialização (cerca de -18°C) |
| Frutas Tropicais Exemplo: maracujá, caju, abacaxi, goiaba, manga | Integrais: com concentração de sólidos variável, em função do tipo de fruta. | Estáveis: conservados pela ação de conservantes químicos. |
| Outros Exemplo: uva, maçã | Concentrados: teor de sólidos solúveis de 55 a 66 graus Brix. | Refrigerados: vida útil curta, comercializados na cadeia de refrigeração (4 a 8°C) |

Devido à composição rica em ácidos orgânicos, geralmente, os sucos apresentam valores de pH entre 2,0 e 4,5 (pH de sucos concentrados: maracujá 2,7-3,7; caju 3,8-4,0; abacaxi 3,2-3,8; limão 1,8-2,4). O pH depende do tipo e concentração de ácido da fruta, da sua espécie, grau de maturação, entre outros fatores. O conteúdo de açúcares (carboidratos) é elevado e constituído principalmente por glicose, frutose, várias pentoses e pectinas [82].

A conservação dos sucos de frutas é determinada, primeiramente, pela prevenção do desenvolvimento de microorganismos deteriorantes e pela inibição da ação de enzimas naturais, o que é obtido por meio do tratamento térmico a que é submetido o produto e/ou pelo uso de conservantes químicos ou comercialização sob refrigeração/ congelamento [82].

Uma vez controlados esses fatores, a estabilidade dos sucos de frutas está relacionada com a ocorrência de reações químicas complexas que comprometem suas qualidades organolépticas (aroma, cor, sabor, consistência, estabilidade da turbidez, separação das fases sólido / líquido, etc.) e que também acarretam perdas nutricionais (de vitaminas) [82].

As perdas nutricionais são representadas, principalmente, pela oxidação da vitamina C e de carotenóides (compostos precursores da vitamina A). De modo

geral, todas as frutas apresentam essas vitaminas, no entanto, as fontes mais ricas são: goiaba, cítricas, abacaxi, maracujá, laranja e manga [82].

A oxidação da vitamina C (ácido ascórbico) também produz compostos com radical carbonila que reagem com grupos amino e por polimerização produzem pigmentos escuros, os quais são responsáveis pelo escurecimento dos sucos que contêm ácido ascórbico. Apesar do efeito acelerador do oxigênio sobre a degradação do ácido ascórbico, esta ocorre preferencialmente em condições anaeróbicas e produz igualmente reações de escurecimento [82].

A oxidação dos carotenóides também traz como inconveniência a perda da cor característica do suco (descoloração). Os carotenóides são pigmentos responsáveis pelas cores desde amarelo até vermelho alaranjado da maioria das frutas. As reações de escurecimento e de natureza oxidativa, envolvendo os diversos constituintes dos sucos cítricos, são muito complexas e exercem efeito catalítico umas sobre as outras. No caso de sucos de maçã e pêra concentrados, o escurecimento é causado principalmente por reação de Maillard (que ocorre entre açúcares redutores e grupos amino de aminoácidos, peptídeos e proteínas) [82].

As frutas consistem em fonte nutricional de vitaminas, minerais e carboidratos solúveis, sendo que algumas possuem teor mais elevado de um ou de outro nutriente como, por exemplo, a acerola, que apresenta elevada quantidade de vitamina C. Outras frutas não são ricas no fornecimento de algum nutriente específico, como é o caso do abacaxi, que inclusive possui baixo teor de vitamina C (10 a 25 mg de ácido ascórbico por 100 g de fruto); entretanto, apresentam grande aceitação sensorial por parte dos consumidores [82].

Os sucos de frutas são consumidos e apreciados em todo o mundo, não só pelo seu sabor, mas, também, por serem fontes naturais de carboidratos, carotenóides, vitaminas, minerais e outros componentes importantes (Figura 13). O Brasil consumiu em 2003 aproximadamente 2,2 bilhões de litros de sucos, nas mais diferentes formas [83].



Figura 13: Sucos naturais e industrializados. **Fonte:** <http://www.sucoverdesaude.com/2009/10/suco-de-frutas>, consulta em 04/09/2010, <http://adietasedicas.blogspot.com/2010/06/alguns-suco-que-ajudara-na-sua-dieta>, consulta em 04/09/2010, <http://www.abril.com.br/blog/dieta-nunca-mais/tag/sucos-industrializados>, consulta em 04/09/2010.

Sucos de frutas nacionais, em embalagem cartonada longa vida, são populares entre famílias brasileiras e seu armazenamento é conveniente por não requerer refrigeração antes de sua utilização, o que possibilita seu transporte e comercialização em todo território nacional. Os sucos de frutas, juntamente com as bebidas lácteas e refrigerantes estão entre as bebidas mais consumidas por crianças e adultos [84]. Uma mudança apropriada na dieta em relação à inclusão de componentes encontrados em frutas e sucos de frutas pode ser importante na prevenção de doenças e para uma vida mais saudável. Diante desta importância, informações nutricionais tornam-se necessárias para que as famílias sejam orientadas e possam melhor balancear suas dietas com relação à ingestão desta bebida [85-87].

1.7.5 Urina

O sistema urinário é um conjunto de órgãos responsáveis pela filtração do sangue, produzindo urina e controlando o equilíbrio hídrico do corpo.

A urina é o produto final, resultante da excreção renal. A urina humana, assim como a urina de outros animais, é composto principalmente de água (96%, em média), mas contém também ureia, ácido úrico, sais e outras substâncias, sendo expelida durante o ato de urinar. O volume, a acidez e a concentração de sais na urina são regulados por hormônios, entre os quais o hormônio antidiurético e a aldosterona, sendo que estes hormônios atuam nos rins para garantir que a água, os

sais e o equilíbrio ácido-base do organismo se mantenham dentro de estreitos limites. A presença na urina de açúcar, albumina, pigmentos biliares ou quantidades anormais de algumas substâncias, incluindo os constituintes habituais, é indicador de doenças. A urina é normalmente estéril quando é expelida e tem apenas um vago odor. O cheiro desagradável da urina deteriorada deve-se à ação de bactérias que provocam a liberação de amoníaco.

Um adulto saudável de dieta comum pode produzir entre 1000 e 2000 mL de urina por dia [88]. O volume mínimo de urina necessário para remover do organismo todos os produtos residuais é de cerca de 0,5 L em um homem de 70 kg; todo o volume produzido acima deste consiste em excesso de água. Uma grande ingestão de líquidos aumenta a quantidade de urina produzida; uma grande perda de líquido através da transpiração, vômitos ou diarreia conduz à sua produção diminuída. O volume de urina eliminado durante o dia é o dobro do produzido na noite, nos humanos saudáveis. Em desordens patológicas esta constante pode ser alterada passando o indivíduo eliminar igual volume nos dois períodos ou mais durante a noite.

A análise clínica em amostras de urina é usada como exame diagnóstico complementar desde o século II. Trata-se de um exame indolor e de simples coleta, o que o torna muito mais agradável para os pacientes do que as análises de sangue, por exemplo. A avaliação da urina pode fornecer pistas importantes sobre doenças sistêmicas, principalmente as doenças renais. Como na maioria dos exames laboratoriais, a qualidade dos resultados depende da coleta. A urina deve ter sido colhida recentemente, com um volume mínimo de 20 mL, sem adição de preservativos, refrigerada e nunca congelada, para garantir sua melhor preservação. Deve estar claramente identificada e colhida em recipiente adequado. Se necessário, a amostra poderá ser colhida a qualquer tempo, lembrando-se da existência, durante o dia, de variações em relação à dieta, exercício físico, concentração da urina e uso de medicamentos [89].

O fato da amostra de urina ser de fácil e rápida obtenção, muitas vezes, induz certos descuidos no tratamento da amostra após sua coleta. Alteração na composição de urina ocorrem não só in vivo mas também in vitro, havendo portanto necessidade de técnicas corretas no manuseio de amostra após a coleta. Há 3 regras importantes quanto aos cuidados com a amostra de urina que na realidade se aplicam a todas as amostras recebidas no laboratório: a amostra deve ser colhida

em recipiente limpo e seco, o recipiente da amostra deve ser devidamente etiquetado com o nome do paciente, data e hora da coleta e a amostra deve ser entregue imediatamente ao laboratório e analisada dentro de uma hora [89].

2. OBJETIVOS

O aumento da demanda das análises químicas e a necessidade do desenvolvimento de metodologias rápidas, confiáveis e de baixo custo capazes de fornecer informações sobre a composição de um sistema *on-line* para o monitoramento de espécies químicas têm evoluído de maneira muito acentuada. Nas últimas décadas, poucos temas geraram tanto interesse e agregaram tantas áreas distintas como o desenvolvimento de sensores químicos e a química enzimática.

A seletividade das enzimas e a sua capacidade de catalisar reações de substratos com baixas concentrações são de grande uso na análise química. Diversos métodos são descritos na literatura, desde a imobilização na superfície de um eletrodo até a imobilização sobre diferentes substratos, tais como, resinas de troca iônica, por meios químicos e/ou físicos, visando diversas aplicações, dentre elas os acoplados aos sistemas de detecção em tempo real. O desenvolvimento de técnicas de imobilização tem sido importante por proporcionar a reutilização das enzimas, facilitar a separação dos produtos, aumentar a estabilidade em solventes orgânicos e exibir uma atividade catalítica superior. Além disso, a diminuição de alterações estruturais, especialmente em seu sítio ativo, representa uma condição ímpar ao sistema com a manutenção dos parâmetros enzimáticos por períodos longos de tempo e análise.

A análise por injeção em fluxo tem como mérito desenvolver procedimentos com alta frequência analítica, instrumentação de baixo custo, versatilidade, precisão e exatidão nas medidas. A automação e a mínima intervenção do analista acoplada a sistemas de detecção espectrofotométricos e eletroanalíticos proporcionam uma robusta ferramenta para o monitoramento, em tempo real, das espécies químicas provenientes de uma reação enzimática. Em especial, os compostos eletroativos podem ser detectados em um sistema de eletrodos conforme a variável a ser determinada (potencial, corrente, concentração e tempo).

Os sensores químicos eletroanalíticos podem responder a mais de uma espécie eletroativa ao mesmo tempo, ocasionando problemas durante a metodologia de identificação ou quantificação de um determinado componente. Por conseguinte, o uso de eletrodos modificados e biossensores associados a métodos de automação

de análises constituem em uma poderosa ferramenta para a resolução rápida e confiável de análises de amostras complexas, especialmente o mel.

Modificar um eletrodo consiste em atribuir e controlar novas propriedades físico-químicas, através do acoplamento de espécies químicas ativas (ou não) à sua superfície. Em um eletrodo modificado sua superfície é propositadamente alterada por adsorção, por recobrimento físico, ou pela ligação de espécies específicas. O resultado consiste em bloquear o acesso ao eletrodo, inibindo alguns processos químicos, porém sendo seletivo a outros com propriedades peculiares. A caracterização de eletrodos pode ser efetuada por métodos eletroquímicos, espectroscópicos e microscópicos. Os eletrodos modificados freqüentemente originam correntes mais elevadas do que na ausência do modificador.

Diante destas considerações a principal proposta deste trabalho foi a combinação entre as pesquisas na área de eletrodos modificados e imobilização enzimática no desenvolvimento de estratégias para a pesquisas na área de sensores químicos para determinação de analitos de relevância alimentícia e clínica. Com este propósito, este projeto apresentou os seguintes objetivos específicos:

1. Estudar a utilização de eletrodos modificados com metais nobres;
2. Desenvolver uma metodologia analítica para quantificação de glicose a partir da concentração de peróxido de hidrogênio gerada pela ação da enzima glicose oxidase imobilizada em reatores tubulares;
3. Desenvolver metodologia analítica para a quantificação de ácido ascórbico em amostras alimentícias por amperometria diferencial;
4. Utilizar *ascorbato oxidase* extraída de tecido vegetal de *Cucumis sativus* L. (pepino) imobilizada sobre resina de troca iônica;
5. Determinar ácido úrico em amostras de urina, usando a técnica de amperometria diferencial, fazendo uma comparação entre as quantificações pela curva analítica e adição de padrão.

3. PARTE EXPERIMENTAL GERAL

3.1) Reagentes

Todas as soluções usadas foram preparadas com reagentes de grau analítico. Mono- e di-hidrogeno fosfato de potássio foram obtidos da Merck (Darmstadt, Alemanha). A solução de tampão fosfato foi preparada dissolvendo-se os sólidos em água deionizada. A resina de troca iônica Amberlite IRA – 743 e o glutaraldeído foram obtidos da Aldrich (Milwaukee, Winsconsin, EUA).

3.2) Imobilização enzimática

O procedimento adotado para imobilizar enzimas é indicado no esquema da Figura 14. A resina de troca iônica Amberlite IRA-743 (250 mg) foi inicialmente tratada com 100 μ L de glutaraldeído 0,1 % por 5 minutos, sob agitação, depois foi adicionada a enzima deixando em contato por 10 minutos, também sob agitação. A próxima etapa foi a preparação do reator tubular (tubo de teflon com aproximadamente $\phi = 0,26$ cm, 2,2 cm de comprimento) com a resina modificada (Figura 15) e lavagem com eletrólito suporte para retirar o excesso de enzima. Quando os reatores não estavam sendo usados eles foram armazenados sob uma temperatura de -20 °C [90].

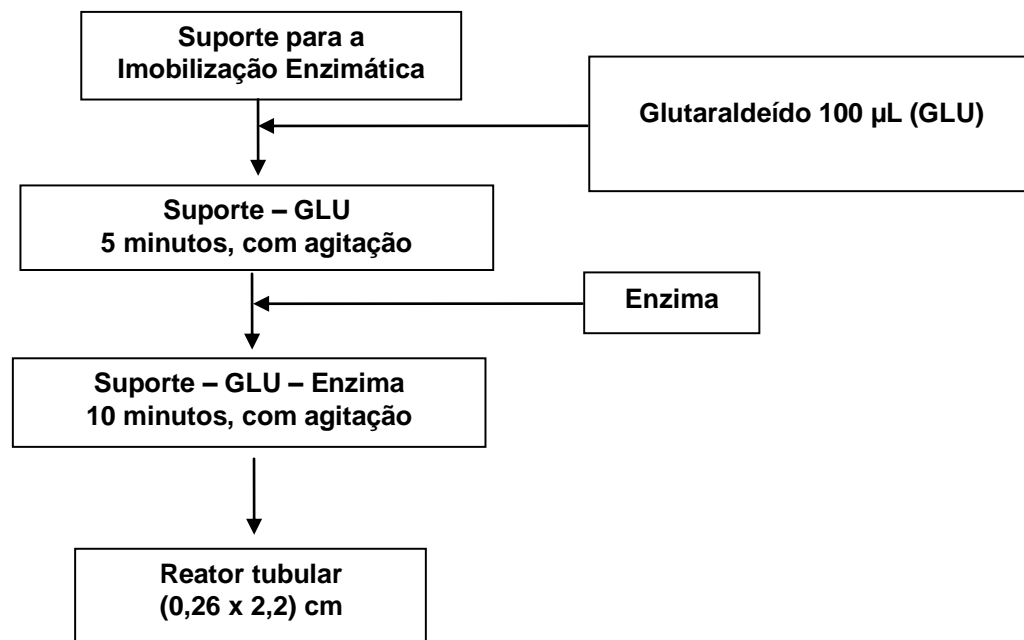


Figura 14: Diagrama esquemático da imobilização enzimática.



Figura 15: Reator tubular com enzima imobilizada (0,26 x 2,2 cm).

3.3) Eletrodos e Instrumentação

Utilizou-se um eletrodo de ouro (3,0 mm de diâmetro) modificado com paládio, platina ou platina/paládio. A modificação foi feita pela deposição eletroquímica destes metais usando solução dos sais K_2PtCl_6 e K_2PdCl_6 na concentração de $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ em pH 4,8 e aplicando-se um potencial de $-1,00 \text{ V}$ por 15 minutos. O eletrodo modificado dessa forma permaneceu estável por uma semana sob intensa utilização (aproximadamente 8 horas diárias). O eletrodo de referência foi um

pequeno eletrodo de $\text{Ag}/\text{AgCl}_{(\text{sat.})}$ construído em nosso laboratório [91] e uma agulha de seringa (1,22 mm de diâmetro) foi utilizado como eletrodo auxiliar.

Um sistema de fluxo foi empregado, onde as soluções eram bombeadas por pressurização utilizando inicialmente uma bomba de aquário e mais tarde substituída por uma bomba peristáltica (Gilson Minipuls 3) e tubos de teflon de 0,5 mm de diâmetro interno. Um potenciostato (μ -AUTOLAB) operando no modo amperométrico foi utilizado para as medidas eletroanalíticas (Figura 16).

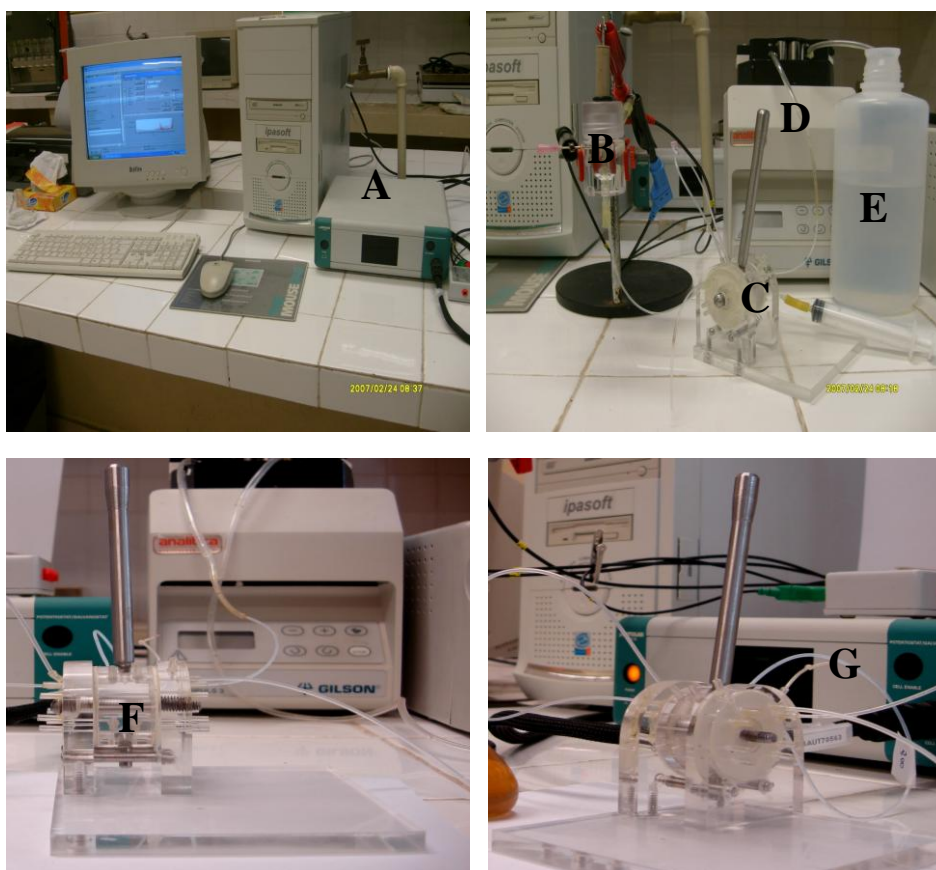


Figura 16: Foto do potenciostato, sistema FIA utilizado. A – potenciostato; B – Célula eletroquímica; C – Válvula de injeção; D – Bomba peristáltica; E – Reservatório de eletrólito; F – Injetor Manual e G – Alça de amostragem.

4. IMOBILIZAÇÃO DA ENZIMA *GLICOSE OXIDASE* PARA A DETERMINAÇÃO AMPEROMÉTRICA DIFERENCIAL DE GLICOSE EM DIFERENTES MATRIZES.

4.1) *Introdução*

4.1.1) *Glicose*

Os carboidratos são poliidroxialdeídos ou poliidroxicetonas ou substâncias que liberam tais compostos por hidrólise. O termo sacarídeo é derivado do grego *sakcharon* que significa açúcar. Por isso, são assim denominados, embora nem todos apresentem sabor adocicado. O termo carboidratos denota hidratos de carbono, designação oriunda da fórmula geral $(CH_2O)_n$ apresentada pela maioria dessas moléculas. Os carboidratos podem ser divididos em três classes principais de acordo com o número de ligações glicosídicas: monossacarídeos, oligossacarídeos e polissacarídeos [92, 93].

Na Figura 17 estão mostradas as estruturas da glicose e a da frutose, os dois monossacarídeos mais abundantes na natureza. Glicose e frutose são os principais açúcares de muitas frutas, como uva, maçã, laranja, pêssego etc. A presença da glicose e da frutose possibilita, devido à fermentação, a produção de bebidas como o vinho e as sidras cujo processo é anaeróbio e envolve a ação de microorganismos. Nesse processo, os monossacarídeos são convertidos, principalmente, em etanol e dióxido de carbono com liberação de energia [94].

Nos seres humanos, o metabolismo da glicose é a principal forma de suprimento energético, fornece quatro calorias de energia por grama. A partir da glicose, uma série de intermediários metabólitos pode ser suprida, como esqueletos carbônicos de aminoácidos, nucleotídeos, ácidos graxos etc. A glicose também é um dos principais produtos da fotossíntese e inicia a respiração celular em procariontes e eucariontes na temperatura ambiente [94].

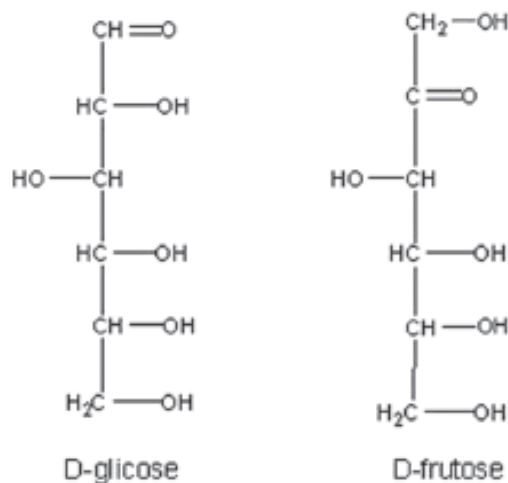


Figura 17: Representação das estruturas químicas da D-Glicose e D-Frutose. Fonte: Junior Francisco (2008) [94].

Os monossacarídeos consistem somente de uma unidade de polioidroxialdeídos ou cetonas, as quais podem ter de três a sete átomos de carbono. Devido à alta polaridade, são sólidos cristalinos em temperatura ambiente, solúveis em água e insolúveis em solventes não polares. Suas estruturas são configuradas por uma cadeia carbônica não ramificada, na qual um dos átomos de carbono é unido por meio de uma dupla ligação a um átomo de oxigênio, constituindo assim um grupo carbonila. O restante dos átomos de carbono possui um grupo hidroxila (daí a denominação de polioidroxi). Quando o grupo carbonila está na extremidade da cadeia, o monossacarídeo é uma aldose. Caso o grupo carbonila esteja em outra posição, o monossacarídeo é uma cetose [27].

Por maior simplicidade, os monossacarídeos são representados na forma de cadeia linear. Todavia, aldoses com quatro carbonos e todos os monossacarídeos com cinco ou mais átomos de carbono apresentam-se predominantemente em estruturas cíclicas quando em soluções aquosas. Outra importante característica dos monossacarídeos é a presença de pelo menos um carbono assimétrico (com exceção da diidroxicetona), fazendo com que eles ocorram em formas isoméricas opticamente ativas [27].

Uma importante propriedade dos monossacarídeos é a capacidade de serem oxidados por íons cúpricos (Cu^{2+}) e férricos (Fe^{3+}). Os açúcares com tal propriedade são denominados açúcares redutores. O grupo carbonila é oxidado a carboxila com a concomitante redução, por exemplo, do íon cúprico (Cu^{2+}) a cuproso (Cu^+). Tal princípio é útil na análise de açúcares e, por muitos anos, foi utilizado na

determinação dos níveis de glicose no sangue e na urina como diagnóstico da *diabetes mellitus* [94].

O *diabetes mellitus* é uma doença crônica, caracterizada pelo excesso ou a desregulada concentração de glicose no sangue. De acordo com a Associação Americana de Diabetes, para o diagnóstico da doença são necessárias concentrações acima de 126mg/dL de glicose em dois dias diferentes, sendo o exame feito em jejum. Em indivíduos com fatores de risco para diabetes, como obesidade, histórico de familiar em primeiro grau com a doença e/ou hipertensão, o rastreamento precoce, mesmo em fase assintomática, minimiza os danos à saúde. Diabetes é uma situação clínica freqüente, acometendo cerca de 7,6% da população adulta entre 30 e 69 anos e 0,3% das gestantes, sendo que 50% destes portadores de diabetes desconhecem o diagnóstico [95].

Embora existam quadros diabéticos associados a patologias específicas (diabetes secundária, associada à desnutrição e fibrocalculoso, entre outras), os tipos mais prevalentes são o tipo I, II e a diabetes gestacional.

- a) Diabetes tipo I: é mais freqüente em pessoas com menos de 35 anos, embora possa acometer indivíduos em qualquer idade. Ocorre quando o organismo deixa ou diminui a produção de insulina no pâncreas, demandando doses diárias desta substância para manter os níveis normais de glicose sanguínea. É acompanhada de sintomas do tipo: emagrecimento, sensação de falta de força, fome e sede intensas, necessidade de urinar diversas vezes, náuseas, etc. [95].
- b) Diabetes tipo II: ocorre geralmente após os 40 anos, é muito mais prevalente que a do tipo I e está fortemente associada à obesidade e baixa atividade física. Do contrário ao que ocorre no tipo I, na Diabetes do tipo II o organismo produz insulina, mas ocorre uma incapacidade de absorção por parte do tecido adiposo e muscular. Em muitos casos, não se faz necessário o uso diário e doses de insulina, porém é acompanhada de sintomas que afetam a visão, dificuldade de cicatrização, sensação de “formigamento” e freqüentes quadros infecciosos [95].
- c) Diabetes Gestacional: é um quadro de alteração que, semelhante ao tipo II, o organismo apresenta dificuldades de absorção da insulina produzida. Em muitos casos, os sintomas desaparecem após o parto. Os fatores de risco

também são similares ao tipo II, sendo mais freqüente em pessoas acima de 25 anos, com quadro de obesidade ou ganho excessivo de peso e ritmo de vida sedentário [95].

4.1.3) Quantificação da glicose

Atualmente várias técnicas enzimáticas são usadas para a determinação de glicose, as quais incluem o uso da *glicose oxidase* (*Gox*).

A *Gox* é uma proteína dimérica com um peso molecular de 160 kDa. Apresenta uma forma elipsoidal, com um alto conteúdo de estrutura secundária (28% hélice e 18% folha). É usualmente obtida de *Aspergillus Níger*, é uma flavoproteína que catalisa a oxidação da β -D-Glicose à D-Glucono-1, 5-lactona e peróxido de hidrogênio, usando oxigênio molecular como receptor de elétrons. O produto inicial de oxidação da glicose é o D-Glucono-1, 5-lactona que hidrolisa espontaneamente em ácido glucônico (Figura 18). Esta enzima tem $\text{pH}_{\text{ótimo}} = 5,6$, $\text{pI} = 4,2$, estabilidade frente ao pH entre 4,0 e 7,0, mantendo cerca de 50% de sua atividade inicial em pH 3,5 a 7,5. A GOX atua bem em temperaturas entre 30 e 40°C, tornando-se instável acima de 50°C [96].

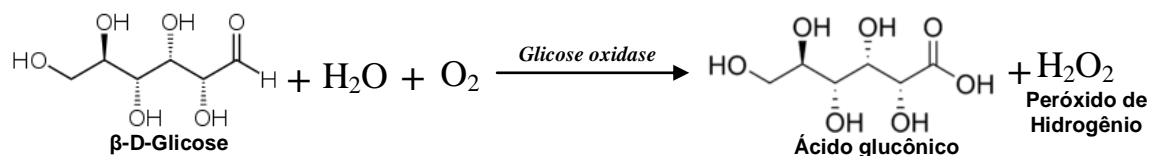


Figura 18: Reação de oxidação da glicose.

A ação da *Gox* é efetiva em duas fases. Na primeira, que consiste na redução do grupo prostético FAD para FADH_2 , dois átomos de hidrogênio são transferidos da glicose para o grupo prostético FAD, formando-se a D-glucono-1,5-lactona. Na segunda, que consiste na oxidação do FADH_2 , a enzima transfere os dois átomos de hidrogênio diretamente para o oxigênio molecular (O_2) originando o H_2O_2 . A D-glucono-1,5-lactona reage com a água, espontaneamente, ou por ação da enzima gluconolactonase, formando o ácido glucônico. O peróxido de hidrogênio, devido ao

seu potencial redox elevado, interfere na ação da Gox em alguma extensão, já que o mecanismo da enzima envolve a alternância entre os estados oxidado e reduzido de seu grupo prostético [97]. Segundo Tomotani e colaboradores (2005) [98], o H_2O_2 em concentração acima de $1,22 \text{ mmol L}^{-1}$ causa inibição reversível não competitiva da Gox, provavelmente por interferir no grau de oxidação do átomo de ferro existente em cada uma de suas cadeias peptídicas. A atividade da Gox é favorecida, quando os átomos de ferro da molécula encontram-se em seu menor estado de oxidação (Fe^{+2}). Por isso, torna-se importante o uso da catalase para decompor o H_2O_2 em água e oxigênio molecular. A Gox comercial já vem “contaminada” com catalase, porém em quantidade insuficiente para decompor o H_2O_2 formado durante a oxidação da glicose, sendo necessária sua adição no processo.

A *glicose oxidase* pode ser usada tanto na forma solúvel quanto na forma imobilizada, devido a sua alta especificidade pela glicose. Ela apresenta importância comercial considerável na indústria de alimentos, usada em associação com a catalase para a desglicosação de ovos e como agente estabilizador das propriedades organolépticas de alimentos em geral [99]. Em outras aplicações, a GOX é usada em associação com a peroxidase em kits enzimáticos para dosagem de glicose em solução e na presença de ortodiansidina como indicador colorimétrico [100], em medicamentos anticancerígenos, para produzir o radical livre peróxido ($\text{HOO}\cdot$) de forma a auxiliar na morte de células tumorais [101], em biossensores na forma não associada [102] e na forma associada a outras enzimas, a complexos inorgânicos ou complexos orgânicos [103], na remoção de oxigênio em refrigerantes e enlatados [104] e na estimativa da transferência do oxigênio em processos fermentativo semi-sólido [105].

No caso do emprego da Gox para a conversão da glicose em ácido glucônico, dispõem-se de reatores de dimensões reduzidas para fins puramente analíticos (dosagem de glicose “on line”, acoplados a aparelhos analíticos ou diretamente ao reator principal ou de maior porte). Dentre estes últimos, observa-se da literatura que os reatores usados são do tipo leito fixo em sua maioria, porém, quando raramente do tipo reator com membrana, a Gox acha-se unida à membrana [106]. Reatores do tipo leito fluidizado são também usados na conversão glicose/ácido glucônico, estando a Gox aprisionada dentro de polímeros [107] ou dentro de lipossomas ligados covalentemente à quitosana [108]. Recentemente, Neves e Vitolo (2007) [109] descreveram a oxidação da glicose em ácido glucônico pela Gox solubilizada

no meio reacional, usando um reator com membrana unimodular, ao qual foi acoplada em sua base uma membrana de ultrafiltração de caráter hidrofílico e constituída por celulose regenerada. Esta mesma reação também foi executada usando a Gox imobilizada em resina trocadora de íons, a qual foi mantida em suspensão no meio reacional. Neste caso, o reator com membrana unimodular foi acoplado a uma membrana de microfiltração, permitindo realizar a reação de modo contínuo e em regime permanente com tempo de residência menor [110].

Os produtos dessa reação podem ser determinados espectrofotometricamente, reagindo o peróxido de hidrogênio para produzir um produto colorido [111-113]. Outra forma possível de detecção é a eletroquímica, através da quantificação de produtos eletroativos, como o H_2O_2 , empregando-se geralmente, eletrodos ou microeletrodos modificados de ouro, platina ou carbono vítreo [90, 114-116]. Os potenciais típicos aplicados são em torno de +0,7 a +0,9V quando usado como eletrodo de referência o eletrodo saturado de calomelano [117]. Entretanto, muitas substâncias podem interferir nas medições e por isso a utilização de biossensores com enzimas imobilizadas está sendo vastamente empregada para a análise de peróxido de hidrogênio, incluindo métodos espectrofotométricos [118, 119], fluorimétricos [120, 121], quimioluminescentes [122, 123] e eletroquímicos [90].

Outras técnicas também são descritas para a quantificação de glicose em diferentes matrizes como eletroforese capilar com detecção ultravioleta/visível [124], cromatografia a gás com detector de ionização de chama após a derivatização da amostra [125] e cromatografia a líquido de alta eficiência (HPLC) com detector ultravioleta/visível [126-128].

4.2) Parte experimental específica

4.2.1) Reagentes

A glicose foi obtida da Merck (Darmstadt, Alemanha). A enzima *glicose oxidase* (EC 1.1.3.1.4 - 159 U mg⁻¹), *peroxidase* (EC 1.11.1.7-115 U mg⁻¹), fenol e 4-aminoantipirina foram obtidos da Sigma Aldrich® (St. Louis, MO, EUA). Soluções diluídas de glicose foram preparadas diariamente utilizando tampão fosfato (pH 7,4; 0,1 mol L⁻¹).

4.2.2) Amostras

Trabalhou-se com oito amostras de mel de diferentes regiões e floradas. Para a determinação de glicose nestas amostras, usando a análise amperométrica, uma massa aproximada de 250 mg de amostra foi pesada diretamente em um balão de 10,00 mL (solução A) dissolvida em tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ pH=7,4. Em seguida, uma alíquota de 80 µL desta solução foi diluída em um balão de 25,00 mL e injetada no sistema em fluxo. Para a análise espectrofotométrica 20 µL da solução A foi adicionada a 200 µL de 4-aminoantipirina (3 mmol L⁻¹), 500 µL de fenol (16 mmol L⁻¹), 500 µL de solução de *peroxidase* (60 U mL⁻¹) e 500 µL de solução de *glicose oxidase* (82 U mL⁻¹) em um volume final de 10,00 mL.

Para a análise de glicose em água de coco foram usadas seis amostras, sendo cinco delas processadas e uma natural. Para a análise amperométrica, um volume de 65 µL de amostra foi transferido diretamente para um balão de 100,00 mL que teve seu volume completado com tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ pH=7,4. Para a análise espectrofotométrica 2,00 mL da amostra foi diluída em 25,00 mL de tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ pH=7,4, em seguida à 80µL desta solução foram adicionados 200 µL de 4-aminoantipirina (3 mmol L⁻¹), 500 µL de fenol (16 mmol L⁻¹), 500 µL de solução de *peroxidase* (60 U mL⁻¹) e 500 µL de solução de *glicose oxidase* (82 U mL⁻¹) em um volume final de 10,00 mL.

Para a forrageira, a análise foi feita com 6 amostras do gênero *Brachiaria* espécie *Brizanta*, as quais passaram por um processo de extração onde aproximadamente 1 g de amostra foi adicionada à 75,00 mL de etanol 80% e

deixada no ultrassom por 1 h. O sobrenadante foi descartado e o resíduo sólido foi seco em estufa ($T = 120^{\circ}\text{C}$) por 3 h. Então 250 mg desse material seco foi tratado com 5,00 mL de H_2SO_4 12 mol L^{-1} e deixado em um banho ultratermostático ($T=30^{\circ}\text{C}$ por 1h, em seguida adicionou-se aproximadamente 45,00 mL de H_2O e esta mistura permaneceu por mais 1 h em uma chapa de aquecimento ($T = 100^{\circ}\text{C}$). Para finalizar, a amostra foi filtrada, o resíduo sólido descartado e a solução teve seu volume ajustado para 100,00 mL [129].

4.2.3) Eletrodos e Instrumentação

Utilizou-se um eletrodo de ouro (3,0 mm de diâmetro) modificado com platina/paládio, para as amostras de água de coco e forrageira, e somente com platina para a amostra de mel. O sistema de fluxo utilizado consistia de duas etapas, na primeira a amostra era introduzida diretamente no sistema de detecção, na segunda a amostra era inserida na linha contendo o reator enzimático (*glicose oxidase*), antes do sistema de detecção.

Para as amostras de mel foram usados dois reatores: o primeiro com *peroxidase* e o segundo com *glicose oxidase*, isto porque o mel tem H_2O_2 naturalmente em sua composição [118] e este passa pelo reator de *glicose oxidase* sem ser eliminado e é detectado juntamente com o H_2O_2 gerado pela oxidação da glicose.

Para análise espectrofotométrica utilizou-se um espectrofômetro modelo UV-1601PC (SHIMADZU, Kyoto, Japan) (Figura 19), equipado com emissão de duplo feixe simultâneo, celas de quartzo, com caminho ótico de 1 cm e operando em um comprimento de onda de 510 nm.



Figura 19: Espectrofotômetro Shimadzu® UV 1601 PC.

4.2.4) Procedimento

O método proposto para determinação de glicose usando a técnica amperométrica foi baseado na detecção do peróxido de hidrogênio produzido na reação de oxidação da β -D-glicose pela *glicose oxidase*, que gerou o ácido glucônico e o H_2O_2 (produto eletroativo). O método proposto consiste em duas injeções: (1) amostra sem tratamento enzimático (sinal referente à concentração dos interferentes) e (2) amostra com tratamento enzimático (sinal referente à concentração dos interferentes e H_2O_2 gerado), por diferença é possível quantificar a glicose nas amostras. Como as amostras de mel contêm H_2O_2 [118], fez-se necessário a utilização de dois reatores enzimáticos, um contendo a enzima peroxidase e outro a enzima glicose oxidase, a primeira com a função de eliminar o peróxido de hidrogênio presente na amostra e a segunda de oxidar a glicose a ser analisada.

No método espectrofotométrico, a glicose da amostra sofreu a ação da *glicose oxidase* em presença de oxigênio produzindo peróxido de hidrogênio; este, em presença de fenol e de 4 - aminoantipirina sofre a ação da peroxidase produzindo um composto róseo-avermelhado (antipirilquinonimina) com máximo de absorção em 510 nm.

4.3) Resultados e discussões

4.3.1) Mel

4.3.1.1) Eletrodo e potencial de oxidação

Os seguintes eletrodos foram estudados: ouro sem modificação (Au), ouro modificado com platina (AuPt) e ouro modificado com paládio (AuPd). Na Figura 20 é mostrado que o eletrodo de ouro modificado com platina mostrou-se mais sensível quanto a detecção de H_2O_2 , observando-se um aumento na corrente de oxidação. Pode ser observado também, na mesma figura, que o potencial de oxidação, +0,6 V (vs. Ag/AgCl) mostrou-se mais favorável a ser aplicado ao eletrodo de ouro modificado com platina.

4.3.1.2) Vazão e volume da alça de amostragem

Na Figura 21 é mostrado a influência do volume da alça de amostragem (figura 21A) e a influência do fluxo (figura 21B) no sinal analítico. Foram estudadas alças com volume interno variando de 50 a 300 μL . Pode-se observar que quando o volume aumenta a corrente também aumenta, isto é mais significativo até o volume de 250 μL . O volume de 250 μL foi escolhido para os estudos subseqüentes.

A vazão estudada variou de 0,8 a 3,5 mL min^{-1} , para taxa de vazão mais altas a enzima imobilizada no reator não foi capaz de converter toda glicose em peróxido de hidrogênio. Uma vazão de 1,5 mL min^{-1} foi escolhida como a mais adequada, devido ao fato de combinar boa reprodutibilidade, alta eficiência, menor consumo de solução carregadora (tampão fosfato) e completa transformação da glicose em peróxido de hidrogênio e D-gluconato.

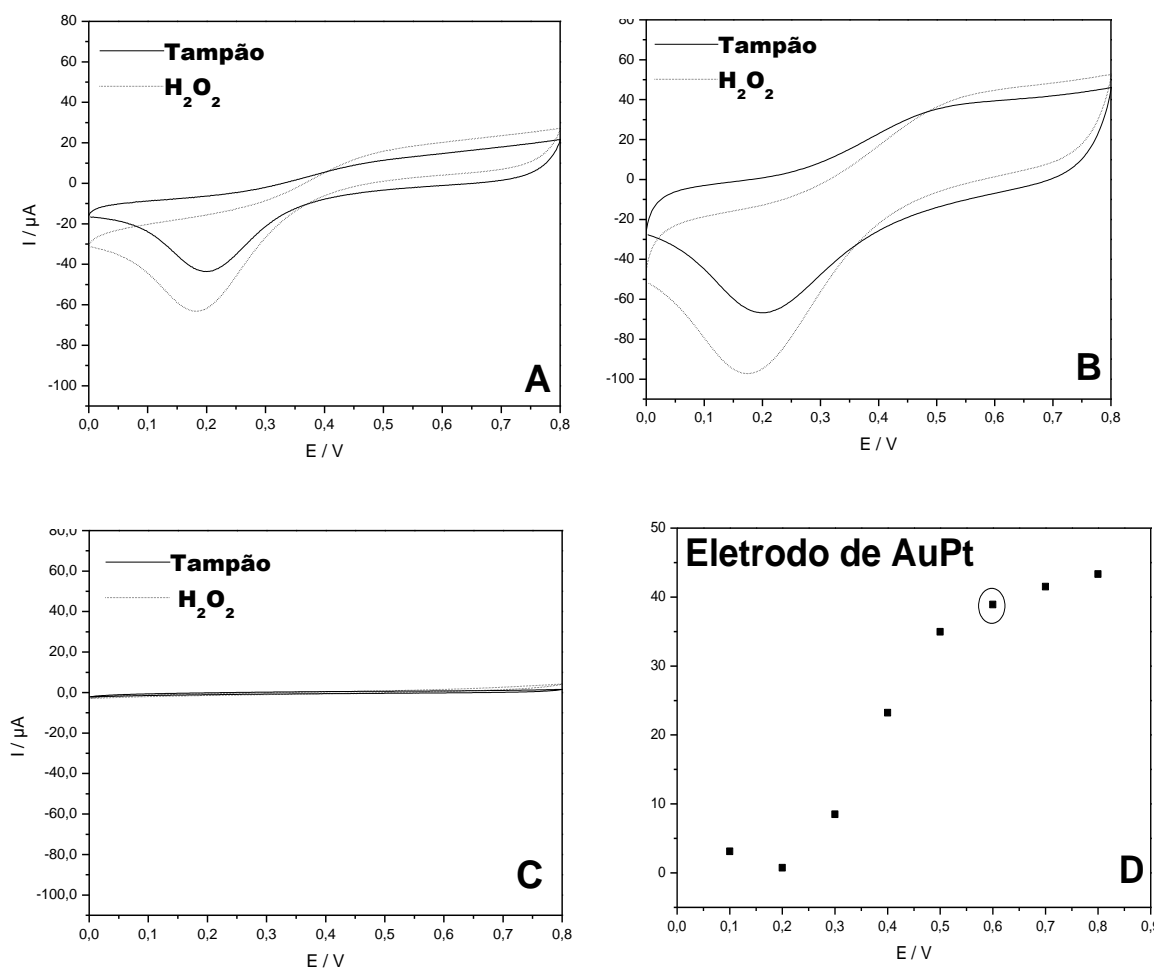


Figura 20: Voltamogramas cíclicos de H_2O_2 10 mmol L^{-1} em tampão fosfato (pH 7,4; 0,1 mol L^{-1}) usando eletrodos de AuPd (A), AuPt (B) e Au (C). Velocidade de varredura: 100 mVs^{-1} . Potenciais de oxidação do eletrodo de AuPt.

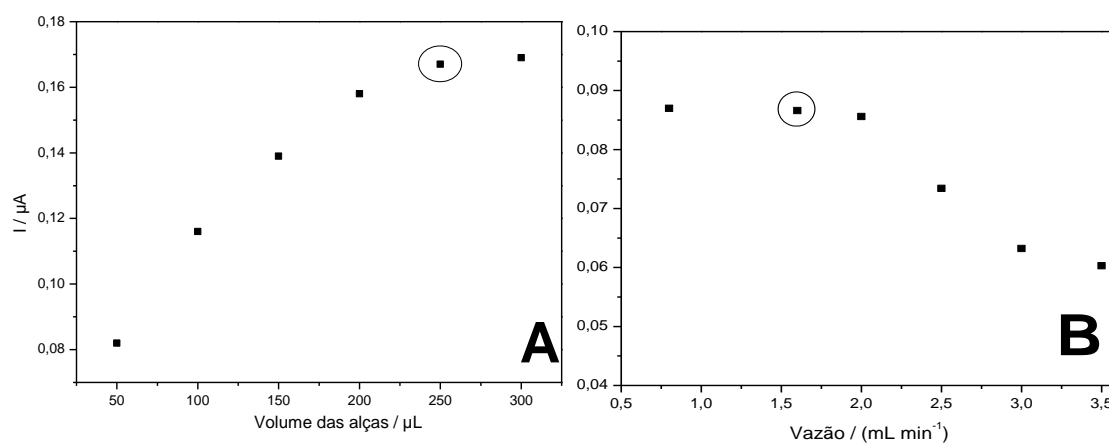


Figura 21: Injeções de glicose 80 $\mu\text{mol L}^{-1}$ para a escolha da melhor condição de trabalho. (A) Volume de amostra de 50 a 300 μL e (B) vazão de 0,8 a 3,5 mL min^{-1} . As medidas foram feitas com um eletrodo de ouro modificado por eletrodeposição de platina. Potencial aplicado + 0,6 V (vs. $\text{Ag/AgCl}_{(\text{sat})}$).

4.3.1.3) Comprimento do percurso analítico, quantidade de enzima e seletividade

Um fator que influencia na dispersão dos sinais transientes e sensibilidade das análises é o comprimento do caminho percorrido pela amostra desde o ponto de injeção até a célula eletroquímica. Percursos analíticos extensos aumentam o tempo de residência da amostra no sistema e originam picos de oxidação alargados com baixa precisão nas análises.

A Figura 22 mostra a influência do comprimento do percurso analítico (figura 22A) e a quantidade de enzima usada na construção do reator (figura 22B) sobre o sinal da corrente.

Foram estudados comprimentos de percurso que variaram de 20 a 105 cm. Assim, pode-se observar que quanto mais longo o percurso menor o sinal analítico, isto deve-se ao fato de ocorrer uma maior dispersão da zona da amostra. O comprimento do percurso escolhido foi de 20 cm.

A quantidade de enzima deve ser suficiente para converter completamente a β -D-glicose para H_2O_2 (produto eletroativo), por isso fez-se necessário o estudo para verificar a quantidade ideal de enzima a ser empregada. Para isso usou-se uma solução de glicose de $80 \mu\text{mol L}^{-1}$ e variou-se a quantidade de enzima de 1 a 12 mg (159 U mg^{-1}) e pode-se observar que acima de 8 mg não ocorre mais ganho de corrente, então esta quantidade foi escolhida como sendo suficiente.

Como a amostra de mel é constituída de 31 % de glicose e 38 % de frutose foi feito um teste injetando glicose e glicose + frutose para verificar a influência deste analito no método, ou seja verificar se a enzima *glicose oxidase* era realmente seletiva a glicose, os resultados confirmaram que a *glicose oxidase* é altamente seletiva.

A Tabela 6 resume as condições otimizadas para a quantificação de glicose nas amostras de mel.

Tabela 6: Condições otimizadas na análise de glicose em amostras de mel.

| Parâmetros | Condições Otimizadas |
|-----------------------------------|--------------------------------|
| Eletrodo de trabalho | AuPt |
| Potencial de Oxidação | + 0,6 V |
| Vazão | 1,5 mL min ⁻¹ |
| Volume da alça de amostragem | 250 µL |
| Comprimento do percurso analítico | 20 cm |
| Quantidade de enzima | 8 mg (159 U mg ⁻¹) |

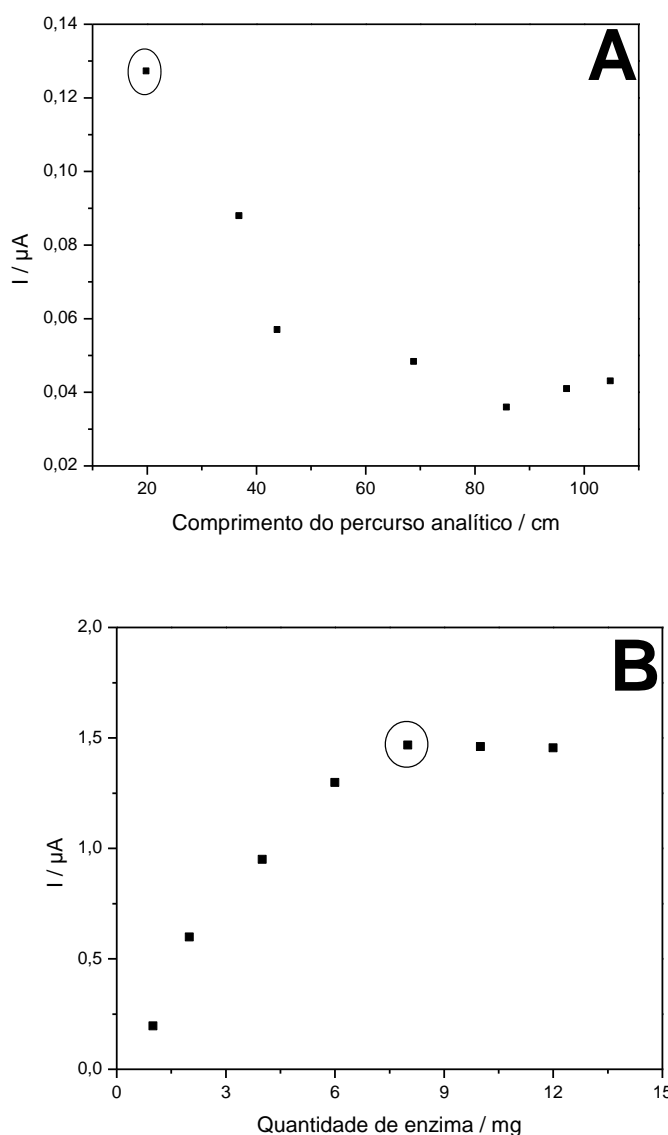


Figura 22: Injeções de glicose 80 µmol L⁻¹ para a escolha da melhor condição de trabalho. (A) Comprimento do percurso analítico de 20 a 105 cm e (B) Quantidade de enzima de 1 a 12 mg (159 U mg⁻¹). As medidas foram feitas com um eletrodo de ouro modificado por eletrodeposição de platina. Potencial aplicado + 0,6 V (vs. Ag/AgCl_(sat)).

4.3.1.4) Curva analítica

A Figura 23 mostra a resposta amperométrica do eletrodo de ouro modificado com platina para sucessivas injeções de 250 μL de glicose de $5,2 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ a $20 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$. A proporcionalidade entre as correntes de oxidação e as concentrações de glicose foram confirmadas através da curva analítica, a qual obteve a seguinte equação da reta: $I(\text{A}) = 1,104 \times 10^{-7} + 0,008 [\text{glicose}] (\text{mol L}^{-1})$; e coeficiente de correlação, 0,999. O limite de detecção e quantificação foram calculados a partir das equações 1 e 2 respectivamente, tendo sido obtidos os valores $8,54 \mu\text{mol L}^{-1}$ para o limite de detecção e $25,9 \mu\text{mol L}^{-1}$ para o limite de quantificação nas condições adotadas no presente estudo. A repetitividade de medição para 50 injeções apresentou um desvio padrão relativo (R.S.D.) menor que 5%.

$$LD = 3,33 \frac{DP}{B} \quad (1)$$

$$LQ = 10 \frac{DP}{B} \quad (2)$$

Onde:

LD e LQ, Limite de detecção e de quantificação, respectivamente;

DP é o desvio padrão do branco;

B é o coeficiente angular da reta de calibração

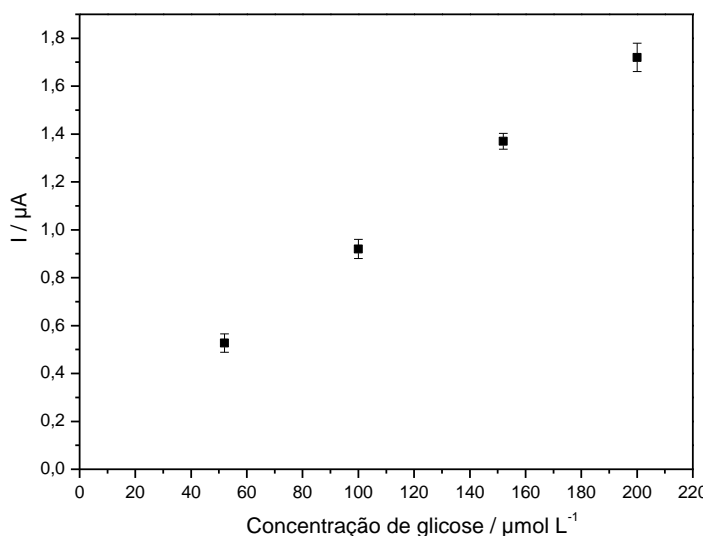


Figura 23: Curva analítica para a quantificação da glicose nas amostras de mel com concentrações variando de 52 a 200 $\mu\text{mol L}^{-1}$.

4.3.1.5) Análise das amostras

Sob as condições otimizadas, o método acoplado amperometria-FIA utilizado para a determinação de glicose em oito amostras foi baseado em duas etapas de injeção em fluxo: (1) injeção das soluções padrões tratadas enzimaticamente com Gox imobilizada e (2) injeções das amostras tratadas enzimaticamente com *Pox* (*peroxidase*) e Gox imobilizadas. O reator com *Pox* imobilizada foi capaz de eliminar completamente o H_2O_2 presente na amostra, uma condição fundamental para aplicação nas amostras, visto que mel contém H_2O_2 [118]. As respostas de corrente para as amostras A1-A8 estão mostradas no fiagrama da figura 24.

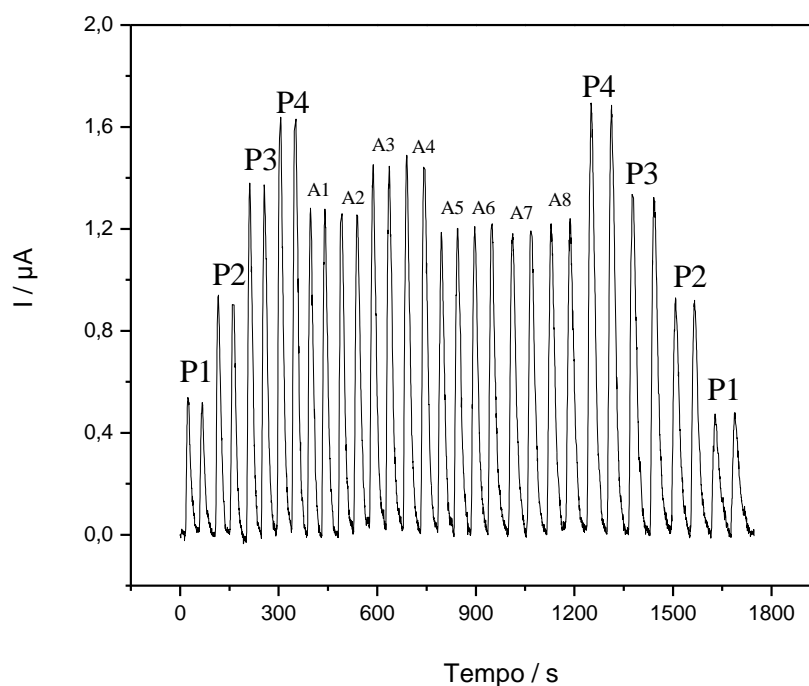


Figura 24: Fiagrama da curva analítica (P1-P4) para a quantificação da glicose com concentrações variando de $5,2$ a $20 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ e 8 amostras de mel (A1 a A8).

Na Tabela 7 e na Figura 25 são comparados os resultados das análises por amperometria desenvolvida neste trabalho e usando a detecção espectrofotométrica para oito amostras diferentes de mel. O teste t Student (aplicado para comparar dois métodos diferentes com medições simples em amostras diferentes) mostra que os valores ($t_{\text{experimental}} < t_{\text{teórico}}$; $2,0 < 2,4$, $n=7$, $P=0,05$) não apresentaram diferença significativa, o que é um indicativo forte da ausência de erros sistemáticos. Também foi realizado o teste de recuperação nas amostras, os valores oscilaram entre 89 e 105%, sugerindo a exatidão do método. A principal desvantagem do presente

método é a inativação da *Gox* após 60 injeções, requerendo a construção de um novo reator. Uma boa correlação entre os métodos amperométricos e espectrofotométricos foi encontrada ($R=0,71$), o intervalo de confiança para a inclinação e intercepto foram ($11,58 \pm 7,45$) e ($0,60 \pm 0,24$)% m/m, respectivamente, para um nível de confiança de 95%. Também de acordo com a Tabela 8 e com o coeficiente de correlação linear obtido ($R=0,71$) conclui-se, que existe uma correlação de grau FORTE entre os níveis de glicose quantificados pela metodologia espectrofotométrica e amperométrica diferencial.

Tabela 7: Resultados obtidos na análise de glicose (% m/m \pm desvio padrão) em amostras de mel.

| Amostra | Origem geográfica (Florada predominante) | Glicose (% m/m) (Amperométrica) | Glicose (% m/m) (Espectrofotométrica) |
|--------------|--|---------------------------------|---------------------------------------|
| A1 | Juiz de Fora (Laranjeira) | 32,8 \pm 0,7 | 31,3 \pm 0,4 |
| A2 | Teresópolis (Laranjeira) | 32,6 \pm 0,9 | 32,0 \pm 0,8 |
| A3 | Viçosa (Silvestre) | 29,7 \pm 1,1 | 30,8 \pm 1,1 |
| A4 | Santa Bárbara (Velame) | 32,6 \pm 1,2 | 29,1 \pm 0,1 |
| A5 | Feira de Santana (Cassutinga) | 28,8 \pm 0,8 | 28,2 \pm 0,3 |
| A6 | Japão (Rengue) | 28,5 \pm 1,1 | 28,5 \pm 0,7 |
| A7 | Teresópolis (Eucalipto) | 30,0 \pm 0,4 | 31,0 \pm 1,0 |
| A8 | Teresópolis (Bracatinga) | 27,7 \pm 0,5 | 27,1 \pm 0,1 |
| Média | - | 30,4 | 29,8 |
| Valor mínimo | - | 27,7 | 27,1 |
| Valor máximo | - | 32,8 | 32 |

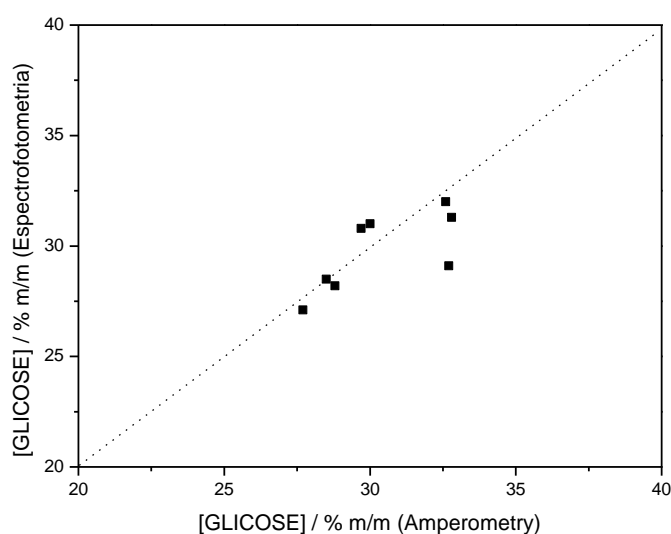


Figura 25: Comparação de resultados obtidos pelos métodos de amperometria e espectrofotometria para análise de glicose em oito diferentes amostras de mel. Intercepto e inclinação, respectivamente (valor \pm desvio padrão): $11,58 \pm 7,45$ % e $0,60 \pm 0,24$.

Tabela 8: Avaliação qualitativa do grau de correlação de Pearson entre duas variáveis

| R | A correlação é dita |
|--------------|----------------------------|
| 0 | NULA |
| 0 ... 0,3 | FRACA |
| 0,3 ... 0,6 | REGULAR |
| 0,6 ... 0,9 | FORTE |
| 0,9 ... 1 | MUITO FORTE |
| 1 | PLENA OU PERFEITA |

Fonte: Callegari-Jaques (2003) [130]

4.3.2) Água de coco

4.3.2.1) Condições de análise

Através da técnica de voltametria cíclica foram testados os seguintes eletrodos: ouro sem modificar (Au), ouro modificado com platina (AuPt) e ouro modificado com paládio (AuPd) também testou-se a utilização de eletrodo de ouro modificado com uma mistura equimolar de paládio e platina depositados simultaneamente (AuPdPt). Na Figura 26 é mostrado que o eletrodo AuPdPt mostrou-se mais eficaz quanto a detecção de H_2O_2 , observando-se um aumento da corrente de oxidação e também um menor tempo de deposição. Parte do aumento da corrente deve ser, provavelmente, ao aumento da área superficial efetiva do eletrodo. Quanto aos potenciais de oxidação, +0,6 V (vs. Ag/AgCl) mostrou-se ser o mais favorável a ser aplicado em comparação com o eletrodo de ouro modificado com platina e paládio.

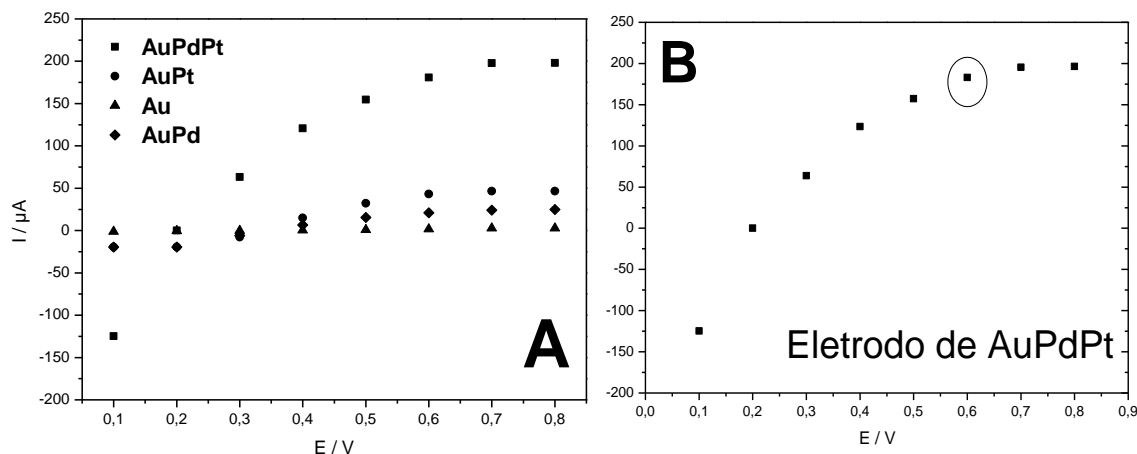


Figura 26: (A) Estudo do eletrodo de trabalho, utilizando a voltametria cíclica. Dados: $[\text{H}_2\text{O}_2]$ 10 mmol L^{-1} ; eletrólito: tampão fosfato (pH 7,4; 100 mmol L^{-1}), eletrodos estudados: de Au, AuPd, AuPt e AuPdPt, Velocidade de varredura: 100 mVs^{-1} . (B) Potenciais de oxidação do eletrodo de AuPdPt.

Na Figura 27 é mostrada a influência do volume da alça de amostragem (em 27A) e do fluxo (em 27B) sobre o sinal analítico. Foram estudadas alças com volume interno variando de 50 a 300 μL e vazões de 1,5 a 4 mL min^{-1} .

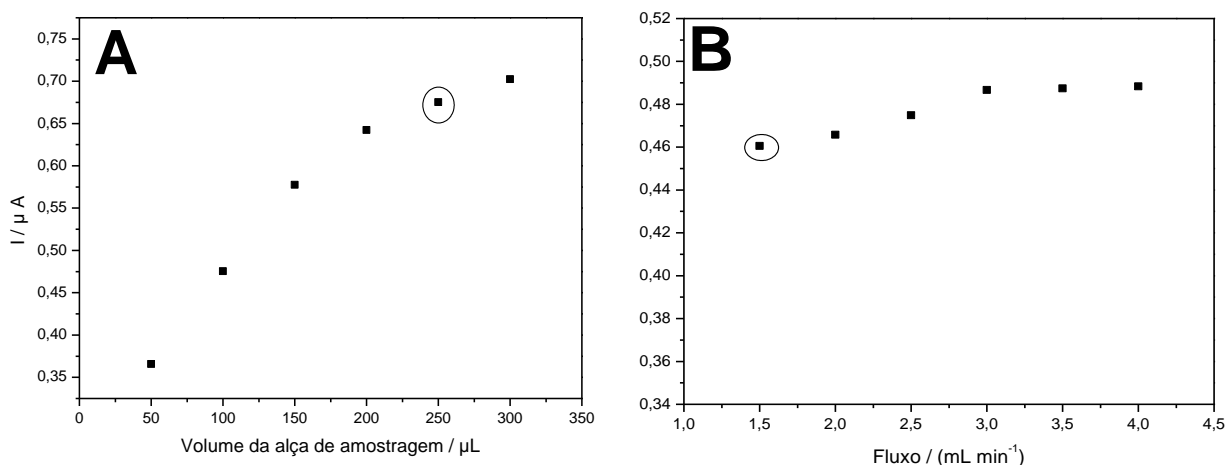


Figura 27: Injeções de glicose $80 \mu\text{mol L}^{-1}$ para a escolha da melhor condição de trabalho. (A) Volume da alça de amostragem de 50 a 300 μL e (B) taxa de vazão de 1,5 a 4,0 mL min^{-1} . As medidas foram feitas com um eletrodo de ouro modificado por eletrodeposição de platina e paládio. Potencial aplicado 0,6 V (vs. $\text{Ag/AgCl}_{(\text{sat})}$).

Na Tabela 9 estão condições de análise otimizadas para a quantificação de glicose nas amostras de água de coco são resumidas.

Tabela 9: Condições utilizadas na análise de glicose em amostras de água de coco.

| Parâmetros | Condições Otimizadas |
|-----------------------------------|----------------------------------|
| Eletrodo de trabalho | AuPdPt |
| Potencial de Oxidação | + 0,6 V |
| Vazão | 1,5 mL min^{-1} |
| Volume da alça de amostragem | 250 μL |
| Comprimento do percurso analítico | 20 cm |
| Quantidade de enzima | 8 mg (159 U mg^{-1}) |

4.3.2.2) Curva analítica

A proporcionalidade direta entre as correntes de oxidação e as concentrações de glicose [(P1) $30 \mu\text{mol L}^{-1}$ a (P6) $130 \mu\text{mol L}^{-1}$] foram confirmadas através da curva analítica, mostrada na Figura 28, da qual obteve a seguinte equação da reta: $I(\text{A}) = 7,81 \times 10^{-9} + 4,58 \times 10^{-3}[\text{glicose}] (\text{mol L}^{-1})$; com coeficiente de correlação, 0,998. A repetitividade da medição da amostra apresentou um R.S.D. menor que 5%.

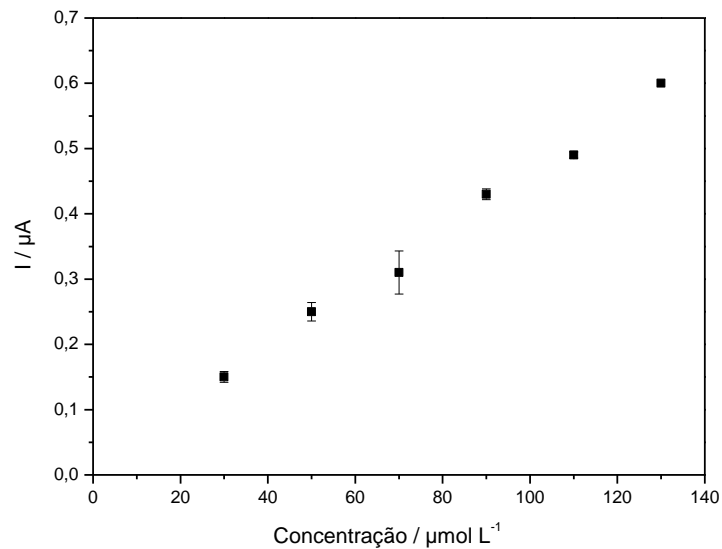


Figura 28: Curva analítica para a quantificação da glicose nas amostras de água de coco com concentrações variando de 30 a 130 $\mu\text{mol L}^{-1}$.

4.3.2.3) Análise das amostras

O método acoplado amperometria-FIA utilizado para a determinação de glicose nas seis amostras de água de coco foi baseado em uma única etapa, onde as soluções padrões e as amostras foram tratadas enzimaticamente com Gox imobilizada. A Figura 29 mostra o diagrama com as respostas de corrente para os padrões (P1-P6) e as amostras (A1-A6).

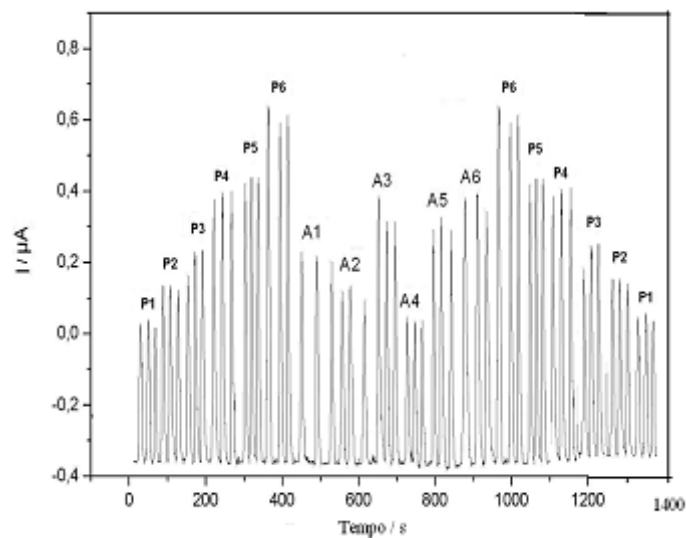


Figura 29: Diagrama da curva analítica (P1-P6) com concentrações variando de 30 a 130 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e 6 amostras de água de coco (A1 a A6).

Na Tabela 10 e na Figura 30 são comparados os resultados das análises por amperometria desenvolvida neste trabalho e usando a espectrofotometria como método de comparação para seis amostras diferentes de água de coco. O teste t Student mostra que os valores ($t_{\text{experimental}} < t_{\text{teórico}}$; $1,88 < 2,57$, $n=5$, $P=0,05$) não apresentaram diferença significativa. Uma correlação positiva grau MUITO FORTE (com coeficiente de correlação de Pearson, $R= 0,99$) entre os métodos amperométricos e espectrofotométricos foi encontrado, o intervalo de confiança para a inclinação e intercepto foram $(0,97 \pm 0,10)$ e $(0,46 \pm 2,69) \text{ gL}^{-1}$, respectivamente, para um nível de confiança de 95%.

Tabela 10: Resultados obtidos na análise de glicose ($\text{gL}^{-1} \pm$ desvio padrão) em amostras de água de coco.

| Amostras | Glicose (gL^{-1}) Amperometria | Glicose (gL^{-1}) Espectrofotometria |
|--------------|--|--|
| A1 | $19,85 \pm 0,18$ | $20,60 \pm 0,20$ |
| A2 | $19,53 \pm 0,11$ | $19,78 \pm 0,14$ |
| A3 | $35,73 \pm 0,31$ | $34,20 \pm 0,35$ |
| A4 | $19,11 \pm 0,02$ | $17,24 \pm 0,21$ |
| A5 | $25,90 \pm 0,05$ | $25,03 \pm 0,08$ |
| A6 | $28,19 \pm 0,16$ | $29,94 \pm 0,21$ |
| Média | 24,72 | 24,46 |
| Valor mínimo | 19,11 | 17,24 |
| Valor máximo | 35,73 | 34,20 |

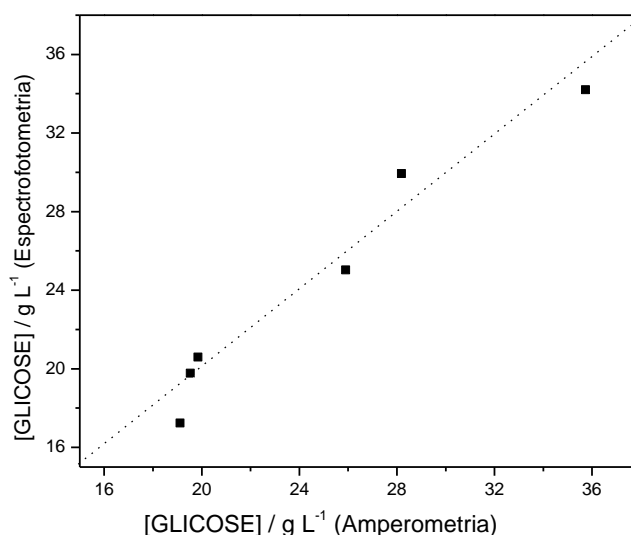


Figura 30: Comparação de resultados obtidos pelos métodos de amperometria e espectrofotometria para análise de glicose em seis diferentes amostras de água de coco. Intercepto e inclinação, respectivamente (valor \pm desvio padrão): $(0,46 \pm 2,69) \text{ g L}^{-1}$ e $(0,97 \pm 0,10)$.

4.3.3) Forrageira

4.3.3.1) Condições de análise

Na Tabela 11 são resumidas as condições usadas na análise de glicose em amostras de forrageira.

Tabela 11: Condições usadas na análise de glicose em amostra de forrageira.

| Parâmetro | Condição Otimizada |
|-----------------------------------|---------------------------|
| Eletrodo de trabalho | AuPtPd |
| Potencial de oxidação | +0,6 V |
| Vazão | 1,5 mL min. ⁻¹ |
| Volume da alça de amostragem | 250 µL |
| Comprimento do percurso analítico | 20 cm |
| Quantidade de enzima | 8 mg |

4.3.3.2) Curva analítica

A proporcionalidade direta entre as correntes de oxidação e as concentrações de glicose [(P1) 30 µmol L⁻¹ a (P5) 110 µmol L⁻¹] foram confirmadas através da curva analítica, mostrada na Figura 31, da qual obteve a seguinte equação da reta: $I(A) = 6,69 \times 10^{-8} + 0,00424 [\text{glicose}] (\text{mol L}^{-1})$; com coeficiente de correlação, 0,997. A repetitividade da medição apresentou um R.S.D. menor que 5%.

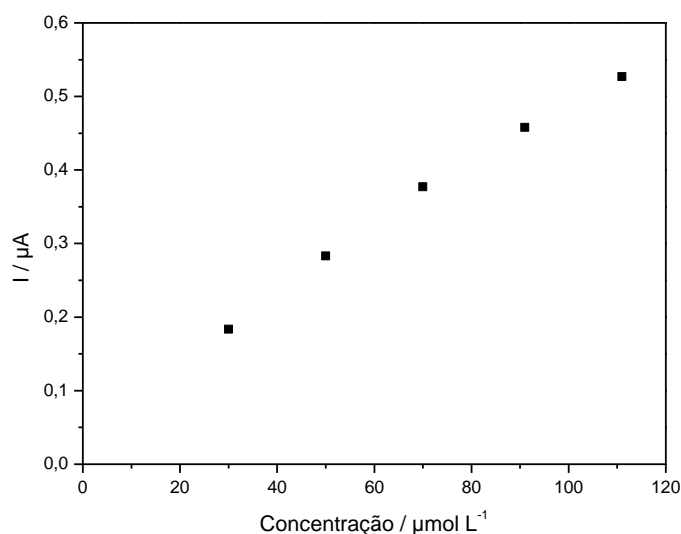


Figura 31: Curva analítica para a quantificação da glicose nas amostras de forrageira com concentrações variando de 30 a 110 µmol L⁻¹.

4.3.3.3) Análise das amostras

O método utilizado para a determinação de glicose nas seis amostras de forrageira foi baseado em uma única etapa onde as soluções padrões e as amostras foram tratadas enzimaticamente com Gox imobilizada. A Figura 32 mostra o diagrama com as respostas de corrente para os padrões (P1-P5) e as amostras (A1-A6).

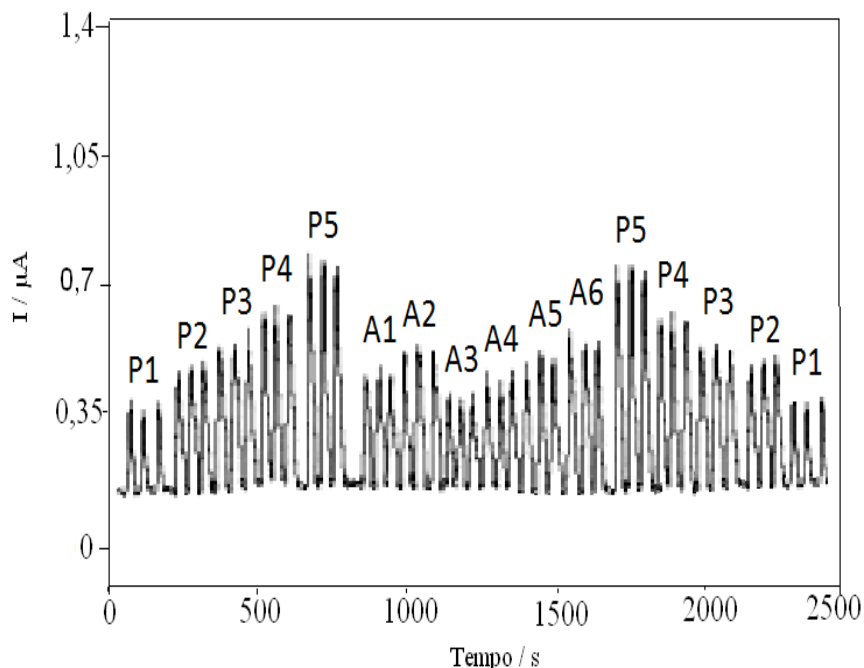


Figura 32: Diagrama da curva analítica (P1-P5) com concentrações variando de 30 a 110 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e 6 amostras de forrageira (A1 a A6).

Na Tabela 12 e na Figura 33 são comparados os resultados das análises por amperometria e usando a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) como método de comparação para seis amostras diferentes de forrageira. O teste t Student mostra que os valores ($t_{\text{experimental}} < t_{\text{teórica}}$; $0,70 < 2,57$, $n=5$, $P=0,05$) não apresentaram diferença significativa. Uma correlação positiva grau MUITO FORTE (com coeficiente de correlação de Pearson, $R= 0,96$) entre os métodos amperométricos e cromatográficos foi encontrado, o intervalo de confiança para a inclinação e intercepto foram $(0,89 \pm 0,08)$ e $(12,41 \pm 12,51) \text{ mg g}^{-1}$, respectivamente, para um nível de confiança de 95%.

Tabela 12: Resultados obtidos na análise de glicose ($\text{mg g}^{-1} \pm$ desvio padrão) em amostras de forrageira

| Amostras | Glicose (mg g^{-1}) Amperometria | Glicose (mg g^{-1}) HPLC |
|--------------|--|--|
| A1 | $101,2 \pm 1,0$ | $101,2 \pm 4,7$ |
| A2 | $156,7 \pm 2,6$ | $141,6 \pm 0,9$ |
| A3 | $102,4 \pm 2,9$ | $102,4 \pm 4,9$ |
| A4 | $109,9 \pm 2,1$ | $118,9 \pm 3,1$ |
| A5 | $162,1 \pm 2,6$ | $159,5 \pm 2,1$ |
| A6 | $191,0 \pm 8,1$ | $188,4 \pm 3,2$ |
| Média | 137,2 | 135,3 |
| Valor mínimo | 101,2 | 101,2 |
| Valor máximo | 191,0 | 188,4 |

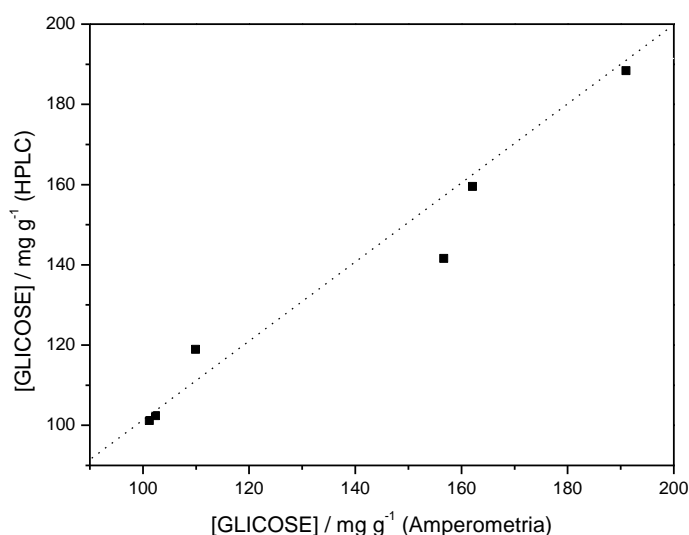


Figura 33: Comparação de resultados obtidos pelos métodos de amperometria e cromatografia para análise de glicose em seis diferentes amostras de forrageira. Intercepto e inclinação, respectivamente (valor \pm desvio padrão): $(12,41 \pm 12,51) \text{ g L}^{-1}$ e $(0,89 \pm 0,08)$.

4.4 Considerações Finais

A metodologia amperométrica para determinação de glicose associada ao sistema por injeção em fluxo e o uso de reatores tubulares enzimáticos imobilizados demonstrou ser uma técnica confiável para a quantificação dos teores deste analito em amostras de mel, água de coco e forrageira. A importância da adaptação da imobilização enzimática no sistema FIA e a metodologia descrita reforça o potencial do estudo frente a matrizes complexas como as estudadas.

Na otimização dos parâmetros FIA foi demonstrado que o volume de injeção de 250 μL , vazão de 1,5 mL min^{-1} e percurso analítico de 20 cm originaram sinais transientes pouco dispersos, bem resolvidos, sem alterar a magnitude dos resultados, com menor consumo de reagentes, economia de material e de tempo. Pelos estudos, demonstrou-se também que tanto o eletrodo de ouro modificado com platina quanto o eletrodo de ouro modificado com paládio e platina são sensíveis à presença de H_2O_2 (produto gerado na oxidação da glicose pela enzima glicose oxidase), podendo ambos serem usados na quantificação deste analito.

Com a otimização dos principais parâmetros da metodologia obteve-se curvas analíticas bastante precisa com elevado grau de concordância entre os resultados alcançados nas análises para as injeções das soluções padrão de glicose. Valores baixos de limite de detecção (8,54 $\mu\text{mol L}^{-1}$) e quantificação (25,9 $\mu\text{mol L}^{-1}$) demonstraram a sensibilidade da metodologia amperométrica nesse tipo de determinação. Durante a quantificação de glicose nas amostras de mel os resultados variaram entre 27,7 %m/m (Bracatinga Teresópolis) e 32,8 %m/m (Laranjeira Juiz de Fora), com valores médios de glicose para as 8 amostras analisadas de 30,4 %m/m. Para as amostra de água de coco estes resultados variaram entre 35,73 g L^{-1} e 19,11 g L^{-1} , com valores médios para as 6 amostras de 24,72 g L^{-1} . E para as amostras de forrageira os resultados variaram entre 101,2 mg g^{-1} e 191,0 mg g^{-1} , com valores médios para as 6 amostras de 137,2 mg g^{-1} . A amperometria diferencial provou ser uma técnica com alta sensibilidade, precisão, robustez e elevada frequência analítica (cerca de 90 determinações h^{-1}) na determinação dos teores de glicose em diferentes amostras.

5. Imobilização da Enzima *Ascorbato Oxidase* para a Determinação Amperométrica Diferencial de Ácido Ascórbico em Amostras Alimentícias.

5.1) Introdução

5.1.1) Ácido ascórbico

O isolamento e a identificação química do “ácido ascórbico” também denominado vitamina C é um dos grandes desafios da química moderna [131]. Em 1928, o bioquímico húngaro Albert Szent-Györgyi, estudioso de reações de oxidação de nutrientes e da produção de energia, trabalhando em Cambridge, isolou uma pequena quantidade de um agente redutor da glândula adrenal com fórmula $C_6H_8O_6$. Ele obteve o mesmo composto do repolho e pensou que poderia ser a vitamina C, mas um teste biológico em um animal não apresentou qualquer evidência de que este prevenia doenças causadas por falta de vitamina C. Tal descoberta foi publicada na revista *Biochemical Journal* com o nome de ácido hexurônico [132]. Uma dúvida permanecia: seria este composto a vitamina C?

Na mesma época, em Pittsburg, um químico americano, Glen King, também estava trabalhando no isolamento da vitamina C com algum grau de sucesso. Ele criou um teste simples, usando porquinhos-da-índia, para mostrar a presença dessa vitamina. Um de seus estudantes, Joseph Svirbely, filho de húngaros, retornou à terra natal e apareceu, inesperadamente, no laboratório de Szent-Györgyi, com conhecimento do procedimento experimental necessário para mostrar que o ácido hexurônico era idêntico à vitamina C. Szent-Györgyi realizou o teste simples, confirmando que o ácido era a vitamina C, e pensou ter sido o primeiro a isolá-la. Então, Svirbely escreveu ao seu mentor em Pittsburg e descreveu seus resultados.

Pouco tempo depois, Glen King publicou um artigo na revista *Science*, descrevendo o primeiro isolamento da vitamina C. Se o mérito da descoberta deveria ter sido dado a King ou a Szent-Györgyi é algo ainda discutido no meio científico [131]. Szent-Györgyi enviou uma amostra do ácido hexurônico a Norman Haworth, professor de Química Orgânica da Universidade de Birmingham, para elucidação de sua estrutura.

Haworth concluiu que a estrutura continha dois grupos hidroxila (OH) ligados a dois átomos de carbono, os quais estavam ligados por uma dupla ligação. Com o propósito de confirmar a estrutura, Haworth decidiu sintetizar a vitamina em laboratório. Tal síntese foi feita por Edmund Hirst, um pesquisador do grupo de Haworth, em 1933, o que confirmou a estrutura da vitamina C. Em 1935, Haworth, Hirst e Szent-Györgyi publicaram a síntese total da vitamina C (Figura 34).

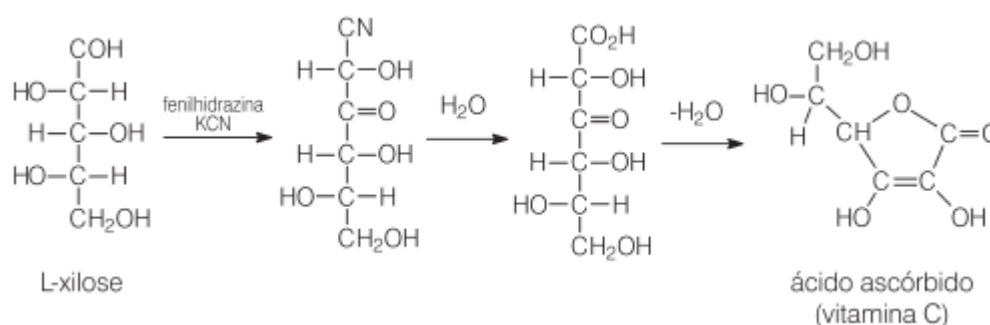


Figura 34: Esquema da síntese de vitamina C [119].

Em 1937, Haworth e Szent-Györgyi receberam o Prêmio Nobel de Química e o de Medicina, respectivamente. A síntese inicial de 1933 foi seguida pelo desenvolvimento de métodos mais simples e efetivos de preparação da vitamina C; porém, sua importância é indiscutível. Pela primeira vez, uma vitamina foi preparada artificialmente por manipulação química, uma possibilidade não confirmada, até então, pelos cientistas. Do ponto de vista prático, a vitamina C poderia ser preparada industrialmente e se tornaria disponível ao público em grandes quantidades a um custo acessível.

O nome químico da vitamina C, ácido ascórbico, representa duas de suas propriedades: uma química e outra biológica. Em relação à primeira propriedade, a vitamina é um ácido, embora não pertença à classe dos ácidos carboxílicos. Sua estrutura (Figura 35) contém um grupo hidróxi-enólico, tautômero da α -hidroxicetona, o que lhe fornece não somente capacidade redutora, mas também um comportamento ácido [133]. A natureza ácida em solução aquosa deriva da ionização do grupo enólico ligado ao C-3 ($pK_a = 4,25$), em relação ao carbono da lactona (monoéster cíclico), como mostrado na Figura 36. Adicionalmente, a palavra *ascórbico* representa seu valor biológico na proteção contra a doença *escorbuto* (do latim *scorbutus*).

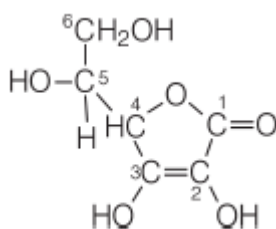


Figura 35: Representação da fórmula estrutural da vitamina C (ácido ascórbico) [132].

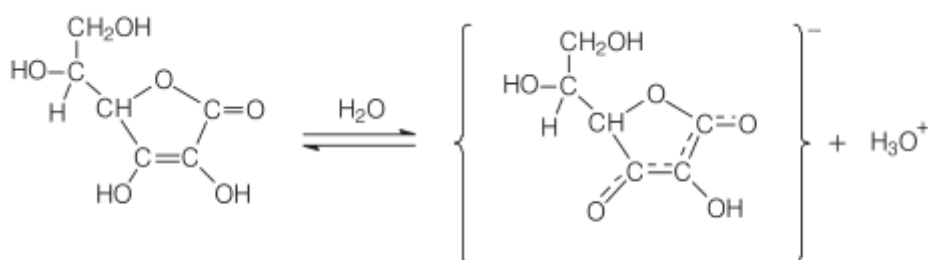


Figura 36: Esquema representativo da primeira ionização do ácido ascórbico [132].

O ácido ascórbico possui um centro assimétrico (C-5) e a sua atividade antiescorbútica deriva quase que totalmente do isômero L (levógiro), que tem uma rotação específica em água de 24° [134]. O ácido L-ascórbico é um agente redutor poderoso, em solução aquosa. A excepcional facilidade com que essa vitamina é oxidada faz com que ela funcione como um bom antioxidante: um composto que pode proteger outras espécies químicas de possíveis oxidações, devido a seu próprio sacrifício.

A primeira etapa de sua oxidação é facilmente reversível e produz ácido dehidroascórbico, como representada na Figura 37. Na presença de oxigênio e um catalisador, o ácido ascórbico é oxidado ao ácido dehidroascórbico, que é bastante estável em pH menor que 4. O ácido dehidroascórbico (forma oxidada da vitamina C) apresenta 75-80% da atividade vitamínica do ácido ascórbico, embora a atividade exata não esteja satisfatoriamente elucidada. Em valor de pH maior que 4, o ácido dehidroascórbico sofre rearranjo irreversível a material biológico inativo. O ácido dehidroascórbico também é rapidamente convertido a ácido 2,3-dicetogulônico por um processo catalisado por Cu(II) e outros íons metálicos de transição. Portanto, a perda de ácido ascórbico presente em vegetais e frutas é acelerada quando esses alimentos são cozidos em recipientes de cobre ou de ferro [132].

Nos últimos anos, com o aparecimento de tantos males que atacam a população, tem havido uma maior preocupação, por parte dos consumidores, em relação à qualidade nutricional dos alimentos. No caso do ácido ascórbico existe um interesse tanto dos consumidores quanto dos fabricantes de alimentos, uma vez que este nutriente é um dos mais sensíveis às condições de processamento e de armazenagem, e a sua degradação está relacionada com diversos fatores como: exposição ao oxigênio, pH, luz, temperatura, umidade e tem sido tema de diversos trabalhos [135 -138]. Por exemplo, no processo de desidratação, a perda de ácido ascórbico é afetada principalmente pela aplicação de altas temperaturas. Zanoni e colaboradores (1999) [138] estudando a degradação de ácido ascórbico durante a secagem de tomate na temperatura de 80° e 110°C verificaram que a taxa de degradação foi dependente tanto da temperatura quanto do conteúdo de umidade, não tendo sido detectado ácido ascórbico nas amostras com 50% de umidade e temperatura de 110°C. Porém eles obtiveram um resíduo de 10% deste ácido na temperatura de 80°C com uma umidade aproximada de 10%.

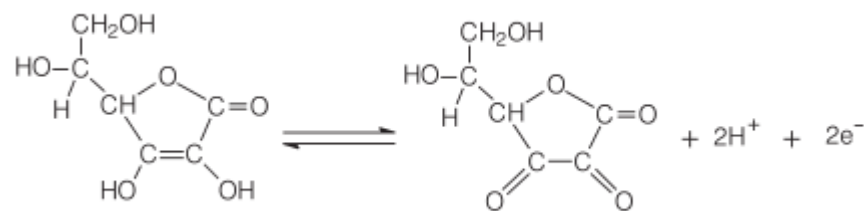


Figura 37: Oxidação do ácido ascórbico ao ácido dehidroascórbico [132]

As necessidades de ingestão desta vitamina são vitais para a saúde e até mesmo para a sobrevivência do homem, isto porque o fígado dos primatas não possui a enzima *gulonolactona oxidase*, que gera o ácido ascórbico a partir do ácido gulônico. Sendo assim, a vitamina C é adicionada em muitos alimentos como em suco de frutas, por exemplo, como suplemento e na medicina usado na forma de pílulas como componentes de tabletes multivitamínicos [139].

A vitamina C, sendo essencial à saúde desempenha um papel fundamental no desenvolvimento e regeneração dos músculos, pele, dentes e ossos, na formação do colágeno, na regulação da temperatura corporal, na produção de diversos hormônios e no metabolismo em geral. Sabe-se que o ácido ascórbico também diminui a lesão oxidativa do DNA em linfócitos de fumantes [140],

demonstrando assim a importância do ácido ascórbico como agente antioxidante. A anormalidade dessa vitamina no organismo aumenta a propensão a doenças. A carência severa torna o organismo vulnerável a doenças mais graves, como por exemplo, o escorbuto. Entretanto, consumida em altas doses, pode provocar efeitos colaterais, tais como: diarreia, dor abdominal e cálculos renais em pessoas geneticamente predispostas. A necessidade diária de vitamina C varia conforme idade e condições de saúde [139]. No Brasil, a Ingestão Diária Recomendada (IDR) é de 60 mg [141].

O ácido ascórbico presente em sucos de frutas naturais oxida-se rapidamente e, em sucos comercializados, a oxidação desse ácido depende da concentração e tipo de antioxidante utilizado, bem como das características da embalagem e condições de armazenamento do produto. Assim, a determinação e/ou monitoramento da vitamina C (ácido ascórbico) nesses e em outros produtos comercializados é de extrema importância. Também, muitos produtos disponíveis no mercado usam esse ácido como conservante ou agente de retardamento de diversos processos degradativos [29, 142, 143].

5.1.3) Quantificação de ácido ascórbico

A determinação do ácido ascórbico é bastante complexa, especialmente por dois motivos: primeiro, por se tratar de uma molécula extremamente instável que perde suas propriedades na presença do ar, calor, água ou luz; segundo, em função dos baixos níveis que pode ser encontrado nas amostras, além da presença de substâncias interferentes da matriz estudada que podem, inclusive, contribuir para a sua degradação [144].

No Brasil, para a quantificação de ácido ascórbico utiliza-se, como método oficial, a titulação iodométrica, sendo de difícil aplicação para dosar somente a vitamina C presente naturalmente nos alimentos e em outros tipos de amostra, por apresentar como desvantagens a dificuldade de visualização do ponto de viragem, quando se trabalha com amostras coloridas ou quando a concentração de ácido ascórbico é baixa [145].

Diferentes procedimentos e técnicas são reportados na literatura para a determinação de ácido ascórbico, como por exemplo: polarografia [146], voltametria

[147], fluorimetria [148], métodos enzimáticos [149], cromatografia [150], titulometria [151] e espectrofotometria de absorção molecular [152]. Cada um com suas vantagens e desvantagens. Métodos eletroanalíticos apresentam vantagens frente aos espectrofotométricos para determinações em amostras mais complexas devido à maior seletividade e possibilidade de se trabalhar com amostras coloridas. Com relação aos métodos cromatográficos, que já apresentam uma seletividade natural, as vantagens da detecção eletroquímica são o baixo custo, a simplicidade e o um menor tempo de análise.

Na literatura [153], métodos eletroanalíticos são utilizados para a detecção de ácido ascórbico em amostras complexas, como por exemplo, urina. No trabalho de Matos e colaboradores (2000) [153], os autores reportam a utilização de microeletrodos de ouro modificados com paládio para detecção simultânea de ácido úrico e ácido ascórbico em urina. A análise foi feita em dois potenciais diferentes 0,75 V e 0,55 V vs Ag/AgCl para ácido ascórbico e ácido úrico, respectivamente. A análise envolveu três medições: (1) amostra com adição de padrão, (2) amostra e (3) amostra tratada enzimaticamente, por diferença os analitos foram quantificados obtendo os valores médios de $0,74 \pm 0,01$ g de ácido úrico/24 horas e $24,7 \pm 0,3$ mg de ácido ascórbico/24 horas.

Muitas amostras apresentam uma composição complexa, o que pode resultar em uma grande quantidade de substâncias interferentes. Devido a essas possíveis interferências de matriz, a determinação de ácido ascórbico em condições de potencial menos drásticas consiste em alternativa vantajosa. Para isso, muitos autores se utilizam da modificação deliberada da superfície dos eletrodos [154-165] para diminuir a energia requerida para o processo de oxidação do ácido ascórbico. Brett e colaboradores [166] utilizaram um filme de cobre hexacianoferrato para a detecção de ácido ascórbico em diferentes matrizes (vinhos, chás e sucos). Foi observado um máximo de corrente para o processo de oxidação do ácido ascórbico por volta de +0,4 V vs ECS. Entretanto, tentando conferir maior seletividade ao sensor os autores sugeriram a possibilidade de detecção do ácido ascórbico em um potencial de +0,5 V vs ECS, o que torna a metodologia menos susceptível a possíveis interferências da matriz. Nessas condições, os autores obtiveram um limite de detecção da ordem de $2,1 \mu\text{mol L}^{-1}$. Outros trabalhos relacionados à determinação de ácido ascórbico em diferentes matrizes estão relacionados na Tabela 13, assim como as condições de trabalho.

Tabela 13: Trabalhos descritos na literatura para a quantificação de ácido ascórbico em diferentes matrizes [160].

| Trabalho (autores e ano) | Eletrodo | Amostra | Potencial de trabalho |
|---|---|---------------------|---|
| Pournaghi-Azar e Razmi-Nerbin, 1998 [157]. | Al/Níquel hexacianoferrato | - | 0,44 V vs ECS |
| Cai Xue e colaboradores., 2000 [159]. | GC/Cobalto hexacianoferrato | - | 0,6 V vs ECS |
| Bradshaw, Prenzler e colaboradores., 2002 [161]. | Hg | Vinho | 0,2 V vs Ag/AgCl (3 mol L ⁻¹) |
| Doherty, Stanley e colaboradores., 1995 [155]. | GC/[Osmio (2,2-bipridil) ₂ -(poli-4-vinilpiridina) ₁₀ Cl]Cl | - | 0,25 V vs ECS |
| Roy, Saha e colaboradores., 2004 [162]. | GC/N, N-dimetilanilina | Suco | 0,35 V vs Ag/AgCl (sat) |
| Li, Hu e colaboradores., 1996 [156]. | Cobalto (II) Ftalocianina dopada com iodo | - | Potenciométrico |
| Torkusic, Milicevie e colaboradores., 2000 [160]. | Tinta de carbono/MnO ₂ | Fármacos | 0,6 V vs Ag/AgCl |
| Shankaran & Narayanan, 1999 [158]. | GC/Cobre hexacianoferrato | Fármacos | 0,2 V vs ECS |
| Pauliukaite, Ghica e colaboradores., 2005 [163]. | GC/Cobre hexacianoferrato | Vinho, Chá e sucos. | 0,05 V vs ECS |
| Kulys & Dcosta, 1991 [154]. | Eletrodo impresso de grafite modificado com tetracianoquinodimetano | Suco | 0,05 V vs Ag/AgCl (sat) |
| Fang, Jiao e colaboradores., 2006 [164]. | Monocamada de ferroceno tioglicolato sobre ouro | Urina | 0,2 V vs ECS |
| Lin & Li, 2006 [165]. | Monocamada de 5-hidroxitriptofano sobre carbono vítreo. | Urina | 0,17 V vs ECS |
| Strochkova & Turyan e colaboradores., 1997 [168]. | Eletrodo Rotativo de GC | Urina | 1,81 V vs Ag/AgCl |
| Chen & Zu, 2007 [169]. | Pt/flúor-surfactante | Urina | 0,2V vs ECS |
| Zare, Nasiriza e colaboradores., 2005 [170]. | Pasta de carbono modificada com tetrabromo-p-benzoquinona | - | 0,06 V vs ECS |
| Salimi, Mamkhe e colaboradores., 2006 [171]. | Eletrodo de sol-gel carbono/cerâmica | Urina e sangue | 0,1 V vs ECS |
| Khoo e Chen, 2002 [172]. | GC/azul de metileno | Urina | 0,24 V vs Ag/AgCl (sat) |
| Lin & Jin, 2005 [173]. | GC/monocamada de propionilcolina | Urina | 0,02 V vs ECS |
| Matos, Augelli e colaboradores., 2000 [147]. | Arranjo de microeletrodos de ouro | Urina | 0,75 V vs Ag/AgCl (sat) |

5.1.4) Tecidos e extratos brutos vegetais como fonte enzimática

O Brasil tem uma grande variedade de vegetais que podem constituir em fontes inesgotáveis de enzimas para serem aplicados nas mais diversas áreas do conhecimento. Em química analítica, por exemplo, eles podem ser usados na construção de diversos tipos de biossensores e/ou procedimentos enzimáticos de análise. Há uma tendência recente de utilização de tecidos de vegetais e/ou extratos brutos no lugar de enzimas purificadas na confecção de biossensores e/ou procedimentos enzimáticos de análise [174-175]. O uso de extratos brutos e/ou tecidos vegetais pode apresentar em alguns casos, certa desvantagem na seletividade do método analítico, mas por outro lado são extremamente econômicos e geralmente possuem tempo de vida superior àqueles métodos que utilizam enzimas purificadas, visto que estas enzimas naturalmente imobilizadas nas células destes materiais biológicos (habitat natural) são mais estáveis e geralmente possuem o seu cofator disponível.

A grande maioria dos trabalhos descritos na literatura para determinação enzimática de ácido ascórbico utilizam a enzima *ascorbato oxidase* (EC: 1.1.0.3.3). A *ascorbato oxidase* catalisa a oxidação do ácido ascórbico na presença de oxigênio molecular produzindo o ácido deidroascórbico e água [142]. A reação enzimática pode ser facilmente detectada pela diminuição do coeficiente de extinção do ácido ascórbico a 268 nm (λ máximo na qual os produtos da reação não absorvem) ou pelo consumo do oxigênio medido polarograficamente. Pequenas quantidades de peróxido de hidrogênio podem ser produzidas como subproduto da reação, causando desnaturação enzimática. Este fenômeno é denominado de reação de inativação [176].

Essa enzima pode ser encontrada e extraída em diversos tecidos de vegetais, como por exemplo, pepino, abóbora, repolho, alface, uva, laranja, pimenta, tomate, pimentão, carambola e melão. Estudos de purificação, caracterização e expressão gênica foram realizados. Sabe-se que extrações, feridas e outras condições de tensão ou estresse da planta estão relacionados com a modificação dos níveis de ácido ascórbico [177].

Kato e Esaka (2000) [178] propuseram que a *ascorbato oxidase* pode ter um papel importante no crescimento da planta, na divisão celular e na regulação da expansão celular, talvez pelo controle dos processos de transporte através da

membrana. Também, a enzima pode ter uma função durante respostas de estresse modificando os níveis de ácido ascórbico.

A *ascorbato oxidase* é uma enzima dimérica, contém cobre como cofator e catalisa a redução de quatro elétrons de dois oxigênios para água, usando preferencialmente a molécula do ácido ascórbico como substrato. Esta enzima pertence à família das oxidases azuis multicobres que incluem *lacases* em plantas e microorganismos, e *ceruloplasminas* em animais [173].

As oxidases azuis multicobres formam um subgrupo de cuproproteínas, que são classificadas de acordo com suas propriedades espectroscópicas dos seus íons metálicos (Cu), dividindo-se em três grupos, cobre tipo 1 ou T1, tipo 2 ou T2 e tipo 3 ou T3 [180]. O cobre T1 é responsável pela intensa coloração azul da *ascorbato oxidase*, enquanto o cobre T2 pela transferência de elétrons para o O₂ [181]. Dois íons de cobre T3 são ligados através de uma ponte OH e acredita-se de atuar como receptores de elétrons [182]. Este último pode ainda formar o arranjo trinuclear T2/T3 [180]. A *ascorbato oxidase* de plantas são homodímeros com cada subunidade contendo um cobre Tipo T1 e um T2/T3 arranjo trinuclear [182].

Ascorbato oxidase, isolada de plantas pertencentes à família *Curcubitaceae*, foi caracterizada quanto às propriedades físico-químicas, como massa molar, ponto isoelétrico, pH ótimo e temperatura ótima para cada espécie vegetal. Baseado em análise cristalográfica da *ascorbato oxidase* de abobrinha (*Curcubita pepo medulosa*), foi observado que todos os resíduos de aminoácidos envolvidos na ligação com o cobre estão situados em quatro regiões ricas em histidina, a qual exibe uma sequência de notável homologia com as oxidases multicobres [183].

A estrutura da *ascorbato oxidase* consiste de duas subunidades idênticas com 552 resíduos de aminoácidos e formadas por três domínios, predominantemente em estado β -conformacional e foram encontradas poucas formas helicoidais [182]. A enzima apresenta uma molécula espectroscopicamente muito complexa (Figura 38) porque cada monômero contém 23 resíduos de tirosina e 14 resíduos de triptofano [184].

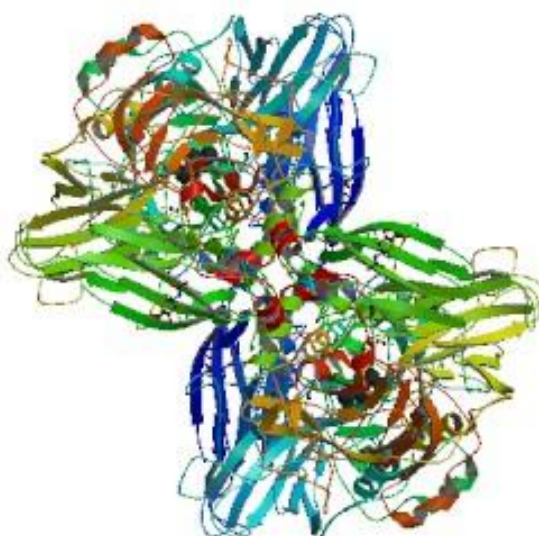


Figura 38: Estrutura da enzima ascorbato oxidase. Fonte: Protein Data Bank/PDB: 1AOZ [185].

A enzima *ascorbato oxidase* da *Cucurbita máxima* e da *Cucurbita pepo condensata* possuem massa molar de 150 kDa [176] e a extraída da *Curcubita pepo medulosa* tem massa molar de 140 kDa [186]. A *ascorbato oxidase* é constituída de duas subunidades idênticas ligadas por duas pontes dissulfeto, cada subunidades tem uma massa molar de 70 kDa [187].

A atividade da *ascorbato oxidase* de *Curcubita máxima* demonstrou seguir a lei de Michaelis-Menten, que depende da ligação com o ácido ascórbico e com o oxigênio [176]. A *ascorbato oxidase* de *Curcubita máxima* é considerada relativamente resistente ao calor, pois sua atividade permaneceu quase inalterada quando foi incubada a 0 - 40°C por 30 minutos, mas a atividade foi completamente perdida após 1 minuto a 100 °C [176]. A *ascorbato oxidase* dimérica, extraída do pepino, é uma das fontes naturais que contêm maiores quantidades desta enzima e que pode ser uma boa alternativa para a fonte estável da enzima. Há diversos procedimentos enzimáticos para determinação de ácido ascórbico descritos na literatura utilizando tecidos e/ou extratos brutos de vegetais como fonte da *ascorbato oxidase*.

Matsumoto e colaboradores (1974) [188] imobilizaram *ascorbato oxidase* de casca de pepino (*Cucumis sativus*) com glutaraldeído em uma membrana de colágeno e a afixaram em um eletrodo de oxigênio. Esse biossensor respondeu linearmente no intervalo de concentração de ácido ascórbico de $5,0 \times 10^{-5}$ a $5,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹. O tempo de vida desse biossensor foi de 3 semanas (aproximadamente 100

determinações/membrana enzimática) e foi utilizado na determinação desse ácido em sucos de tomate, laranja, limão e morango.

Dois procedimentos amperométricos para determinação de ácido ascórbico em sucos de frutas e fluídos biológicos foram propostos por um grupo de pesquisa pernambucano [189, 190] Esses pesquisadores usaram extrato de pepino (*Cucurbita maxima*) imobilizado com glutaraldeído em uma membrana de um eletrodo de oxigênio, usado como sensor base [189]. Esse biossensor apresentou uma resposta linear de 62,5 a 500 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de ácido ascórbico com um tempo de vida superior a 2 meses. Em um sistema de análise por injeção em fluxo [190], o extrato bruto de pepino foi imobilizado em esferas de vidro. Um eletrodo de oxigênio foi usado para monitorar o decréscimo linear da concentração de oxigênio na faixa de 0,05-3,00 mmol L^{-1} de ácido ascórbico. Com um reator acoplado nesse sistema foi possível realizar 600 determinações com uma frequência analítica de 90 h^{-1} .

Uchiyama e colaboradores (1988) [191] usaram suco de pepino (*Cucumis sativus L.*) como fonte da enzima *ascorbato oxidase* como reagente transportador em um sistema de análise por injeção em fluxo e determinaram amperometricamente ácido ascórbico. O consumo de oxigênio decresceu linearmente no intervalo de concentração de $5,0 \times 10^{-4}$ a $7,0 \times 10^{-3}$ mol L^{-1} de ácido ascórbico. Os autores enfatizaram a vantagem da não necessidade de purificação da enzima presente no suco de pepino (extrato bruto enzimático). A atividade enzimática permaneceu constante por 8 dias, quando o suco de pepino foi armazenado a 4°C e o procedimento em fluxo foi empregado apenas na determinação de ácido ascórbico em soluções de referência (padrão).

Uchiyama & Umetsu (1991) [192] impregnaram suco de pepino em uma fina camada de feltro de carbono de um eletrodo de oxigênio e determinaram amperometricamente ácido ascórbico em uma faixa linear de concentração de $2,5 \times 10^{-4}$ a $1,6 \times 10^{-3}$ mol L^{-1} . O teor desse ácido em sucos de laranja e de morango foi determinado e o sistema amperométrico necessitou de calibrações periódicas devido ao lixiviamento do suco de pepino do biossensor.

5.2) Parte experimental específica

5.2.1) Reagentes

O ácido ascórbico ($C_6H_8O_6$), o ácido clorídrico (HCl), o iodeto de potássio (KI) e o dicromato de potássio ($K_2Cr_2O_7$) foram obtidos da Merck (Darmstadt, Alemanha). A enzima *ascorbato oxidase* (EC 1.1.0.1.4 - 162 U mg^{-1}), foi obtida da Sigma (St.Louis, Missouri, EUA). Soluções diluídas de ácido ascórbico foram preparadas diariamente utilizando tampão fosfato (pH 7,4; 0,1 mol L^{-1}). Para a quantificação de proteínas totais foi utilizado um kit da marca Doles contendo 100,0 mL de reagente de biureto (mistura de cobre e hidróxido de sódio com o complexante tartarato de sódio usado para estabilizar o cobre na solução), 20,0 mL de hidróxido de sódio 6 mol L^{-1} e 3,0 mL de solução padrão de albumina 4 g dL^{-1} . Solução da enzima *ascorbato oxidase* (32,4 U mL^{-1}) foi preparada em tampão fosfato.

5.2.2) Preparação das amostras

Para testar o método, trabalhou-se com sete amostras de mel de diferentes regiões e floradas. Para a determinação de ácido ascórbico nestas amostras usando a análise amperométrica, uma massa aproximada de 2 g de amostra foi pesada diretamente em um balão de 25 mL dissolvida em tampão fosfato 0,1 mol L^{-1} pH 7,4 e em seguida foi injetada no sistema em fluxo. Para a titulação iodométrica (análise indireta), 4 g de amostra, 5 mL de solução de KI 4%, 1 mL de HCl 2,4 mol L^{-1} , 10 gotas de solução de amido e aproximadamente 50 mL de água foram adicionadas a um erlenmeyer de 250 mL. Esta solução foi então titulada com uma solução de $K_2Cr_2O_7$ 0,00167 mol L^{-1} até o ponto de viragem.

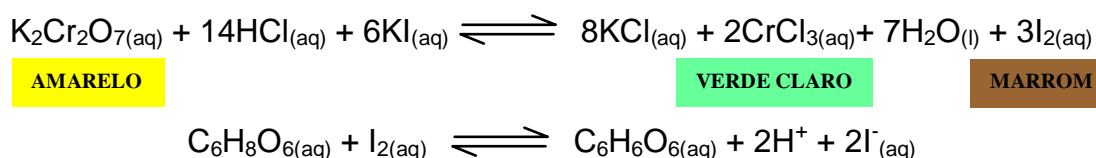
Para a análise de ácido ascórbico em sucos foram usadas cinco amostras de diferentes marcas sendo cada uma delas de um sabor (goiaba, laranja, manga, pêsego e tomate), todas vendidas comercialmente em embalagens cartonadas longa vida nos supermercados de Juiz de Fora. Para a análise amperométrica, um volume de 1 mL de amostra foi transferido diretamente para um balão de 25 mL que teve seu volume completado com tampão fosfato 0,1 mol L^{-1} pH 7,4. Para a análise

iodométrica 1 mL da amostra, 5 mL de solução de KI 4%, 1 mL de HCl 2,4 mol L⁻¹, 10 gotas de solução de amido e aproximadamente 50 mL de água foram adicionadas a um erlenmeyer de 125 mL. Esta solução foi então titulada com uma solução de K₂Cr₂O₇ 0,00167 mol L⁻¹ até o ponto de viragem.

5.2.3) Procedimento

Para a análise amperométrica utilizou-se um eletrodo de ouro (3,0 mm de diâmetro) modificado com paládio (K₂PdCl₆). O método proposto foi baseado em duas etapas envolvendo as seguintes injeções em fluxo: (1) os padrões de ácido ascórbico e as amostras com solução tampão e (2) as amostras tratadas enzimaticamente com *ascorbato oxidase* imobilizada em reator tubular. A primeira corrente medida corresponde à concentração de ácido ascórbico e outras substâncias eletroativas (interferentes) presentes na amostra (mel) e a segunda corrente é referente a concentração dos interferentes, então por diferença tem-se a concentração de ácido ascórbico nas amostras.

Na titulação iodométrica, usando o amido como indicador e o dicromato de potássio como titulante, temos as seguintes reações envolvidas:



À medida que o K₂Cr₂O₇ vai sendo adicionado forma-se o I₂ (tornando a solução marrom), que reagirá com o ácido ascórbico presente na amostra. Quando todo ácido tiver sido consumido o I₂ reagirá com o amido formando um complexo com cor azul intensa, que é visível em concentrações bem baixas (2x10⁻⁵ mol L⁻¹) de ácido ascórbico. Através desta titulação indireta é possível quantificar a ácido ascórbico em diferentes amostras.

5.3) Resultados e discussões

5.3.1) Quantificação amperométrica de vitamina C em mel, usando a ascorbato oxidase comercial imobilizada em reator tubular.

5.3.1.1) Eletrodos e potenciais de oxidação

Foram estudados os seguintes eletrodos: ouro sem modificação (Au), ouro modificado com platina (AuPt), ouro modificado com paládio (AuPd), ouro modificado com irídio (AuIr) e ouro modificado com ródio (AuRh). Na Figura 39A é mostrado que o eletrodo de ouro modificado com paládio mostrou-se mais eficaz quanto a detecção de ácido ascórbico, observando-se um aumento da corrente de oxidação frente aos demais eletrodos. Quanto aos potenciais de oxidação, pode ser observado, na mesma Figura, que o potencial de +0,6 V (vs. Ag/AgCl) mostrou-se ser o mais favorável a ser aplicado contra o eletrodo de ouro modificado com paládio.

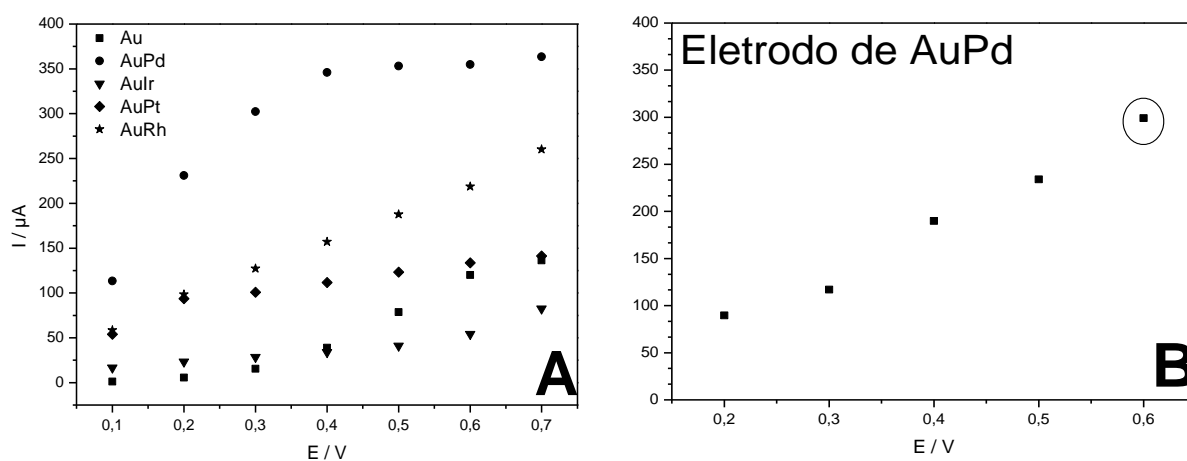


Figura 39: (A) Estudo do eletrodo de trabalho, utilizando a voltametria cíclica. Dados: [ácido ascórbico] 10 mmol L^{-1} , tampão fosfato (pH 7,4,4; $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$), eletrodos estudados: Au, AuPd, AuPt, AuIr e AuRh; (B) Potenciais de oxidação do eletrodo de AuPd.

5.3.1.2) Vazão e volume da alça de amostragem

Na Figura 40 é mostrado a influência do volume da alça de amostragem em A e a influência do fluxo em B sobre o sinal analítico. Foram estudadas alças com volume interno variando de 50 a 300 μL e pode-se observar que até o volume de 150 μL o sinal aumenta significativamente com o volume. Com isso o volume de 150 μL foi escolhido para estudos subseqüentes, levando em consideração também que com o aumento do volume, o tempo requerido para cada análise aumenta.

A vazão estudada variou de 1 a 4 mL min^{-1} . Fez-se o estudo para sistema sem reator e com reator, pois o método proposto utiliza os dois sistemas. Para taxa de vazões mais altas a enzima imobilizada no reator não foi capaz de oxidar todo ácido ascórbico em ácido de-hidroascórbico, por outro lado em uma vazão baixa ocorria uma maior dispersão para o sinal de corrente do ácido ascórbico. Por isso, uma taxa de vazão intermediária de 2,5 mL min^{-1} foi escolhida como a mais eficaz, devido ao fato de combinar boa reprodutibilidade, alta eficiência, menor consumo de solução carregadora (tampão fosfato) e completa oxidação do ácido ascórbico em ácido de-hidroascórbico.

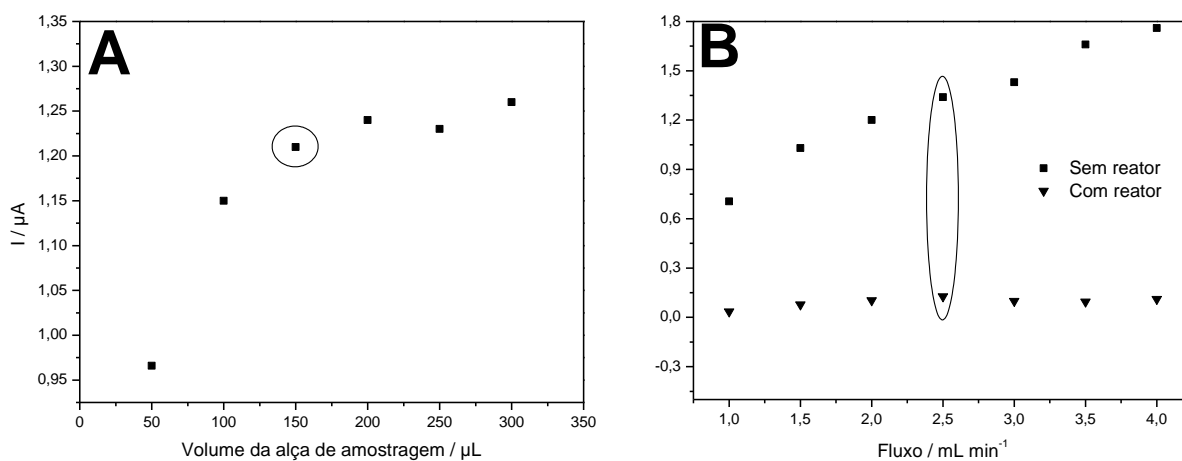


Figura 40: Injeções de ácido ascórbico 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$ para a escolha da melhor condição de trabalho. (A) Volume da alça de amostragem de 50 a 300 μL e (B) taxa de vazão de 1,0 a 4,0 mL min^{-1} . As medidas foram feitas com um eletrodo de ouro modificado por eletrodeposição de paládio. Potencial aplicado 0,6 V (vs. $\text{Ag/AgCl}_{(\text{sat})}$).

Na Tabela 14 estão resumidas as condições otimizadas na análise de ácido ascórbico em amostras de mel.

Tabela 14: Condições utilizadas na análise de ácido ascórbico em amostras de mel.

| Parâmetros | Condições Otimizadas |
|-----------------------------------|-----------------------------------|
| Eletrodo de trabalho | AuPd |
| Potencial de Oxidação | + 0,6 V vs Ag/AgCl |
| Vazão | 2,5 mL min ⁻¹ |
| Volume da alça de amostragem | 150 µL |
| Comprimento do percurso analítico | 20 cm |
| Quantidade de enzima | 1,5 mL (32,4 U mL ⁻¹) |

5.3.1.3) Curva analítica

A proporcionalidade direta entre as correntes e as concentrações de ácido ascórbico foram confirmadas através da curva analítica, mostrada na figura 41, da qual se obteve a seguinte equação da reta: $I(A) = -6,815 \times 10^{-8} + 0,027$ [ácido ascórbico] (mol L⁻¹); coeficiente de correlação, 0,99. O limite de detecção e quantificação obtido foram respectivamente $1,40 \times 10^{-8}$ mol L⁻¹ e $4,66 \times 10^{-8}$ mol L⁻¹, nas condições adotadas no presente estudo. A repetitividade da medição apresentou um R.S.D. menor que 5%.

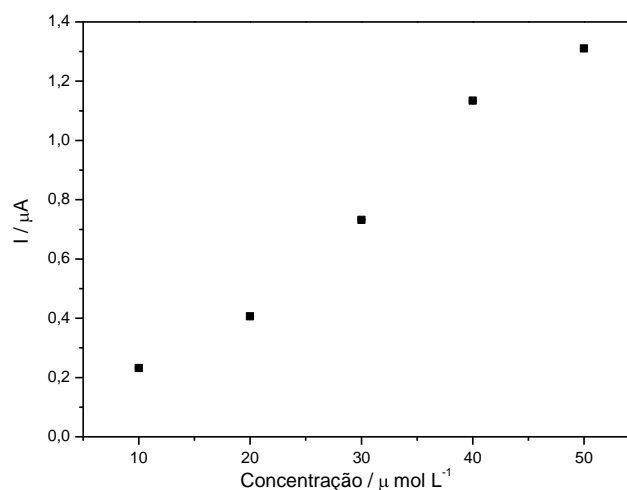


Figura 41: Curva analítica para a quantificação de ácido ascórbico nas amostras mel com concentrações variando de 10 a 50 µmol L⁻¹

5.3.1.4) Análise das amostras

Na Figura 42 são mostradas as respostas amperométricas no eletrodo de ouro modificado com paládio para sucessivas injeções de 150 μL de ácido ascórbico com concentração variando de (P1) 10 $\mu\text{mol L}^{-1}$ a (P5) 50 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e sete amostras de mel (A1-A7).

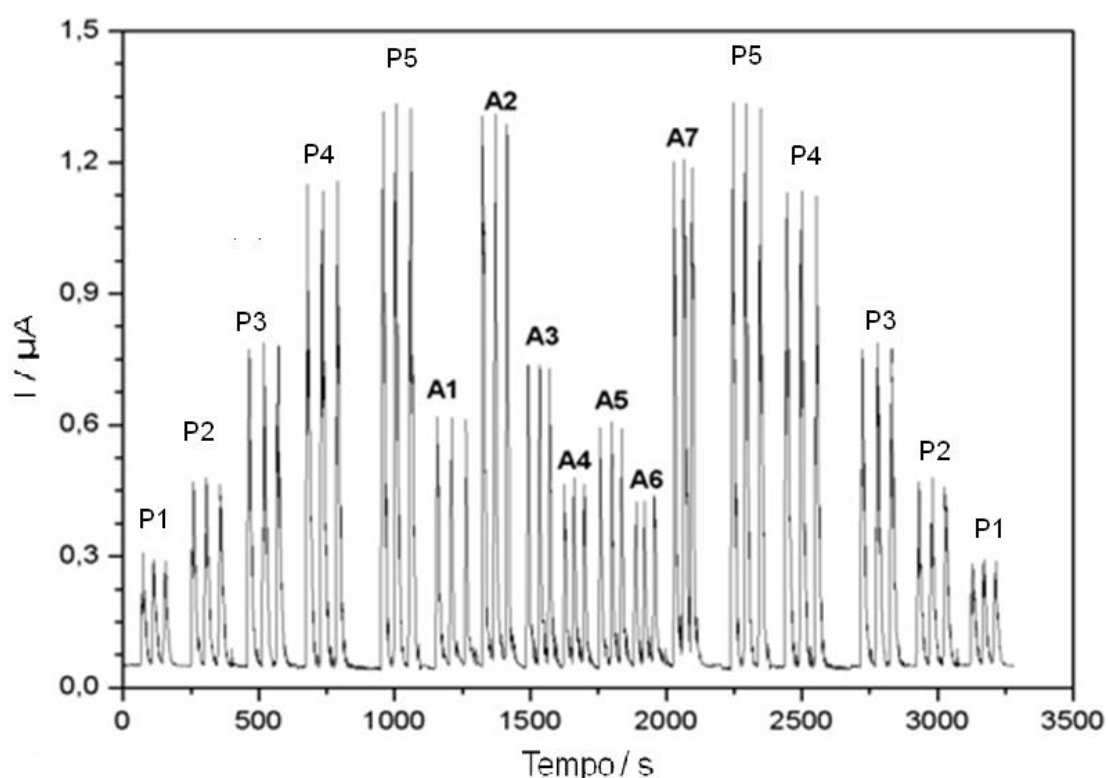


Figura 42: Diagrama da curva analítica (P1-P5) com concentrações variando de 1 a 5 $\times 10^{-5}$ mol L^{-1} e 7 amostras de mel (A1 a A7).

Na Tabela 15 e na Figura 43 mostram-se os resultados comparativos das análises por amperometria desenvolvida neste trabalho e usando a titulação iodométrica [147] para sete amostras diferentes de mel. O teste t de Student mostra que os valores ($t_{\text{experimental}} < t_{\text{teórico}}$; $0,65 < 2,45$, $n=6$, $P=0,05$) não apresentam diferenças significativas, o que é um indicativo forte da ausência de erros sistemáticos. Uma correlação positiva grau MUITO FORTE (com coeficiente de correlação de Pearson, $R= 0,99$) entre os métodos amperométricos e titulométricos foi encontrado, o intervalo de confiança para a inclinação e intercepto foram ($0,86 \pm 0,05$) e ($0,34 \pm 0,16$) $\text{mg}/100\text{g}$, respectivamente, para um nível de confiança de 95%.

Tabela 15: Concentrações de ácido ascórbico (mg/100g) nas amostras de mel. Os valores em parênteses representa o desvio padrão para as oito amostras (em triplicata), com intervalo de confiança de 95%.

| Amostras | Florada | Amperometria (mg / 100g) | Titulação Iodométrica (mg / 100g) |
|--------------|-------------------|-----------------------------|--------------------------------------|
| A1 | Laranjeiro | 3,10 (\pm 0,01) | 3,00 (\pm 0,45) |
| A2 | Eucalipto | 6,20 (\pm 0,06) | 5,50 (\pm 0,40) |
| A3 | Assa-peixe | 1,50 (\pm 0,02) | 1,90 (\pm 0,15) |
| A4 | Cipó-uva | 1,95 (\pm 0,00) | 2,00 (\pm 0,10) |
| A5 | Velame | 3,20 (\pm 0,00) | 3,40 (\pm 0,43) |
| A6 | Morrão de Candeia | 1,50 (\pm 0,01) | 1,70 (\pm 0,10) |
| A7 | Jataí | 5,00 (\pm 0,01) | 4,10 (\pm 0,11) |
| Média | - | 3,21 | 2,94 |
| Valor mínimo | - | 1,50 | 1,90 |
| Valor máximo | - | 6,20 | 5,50 |

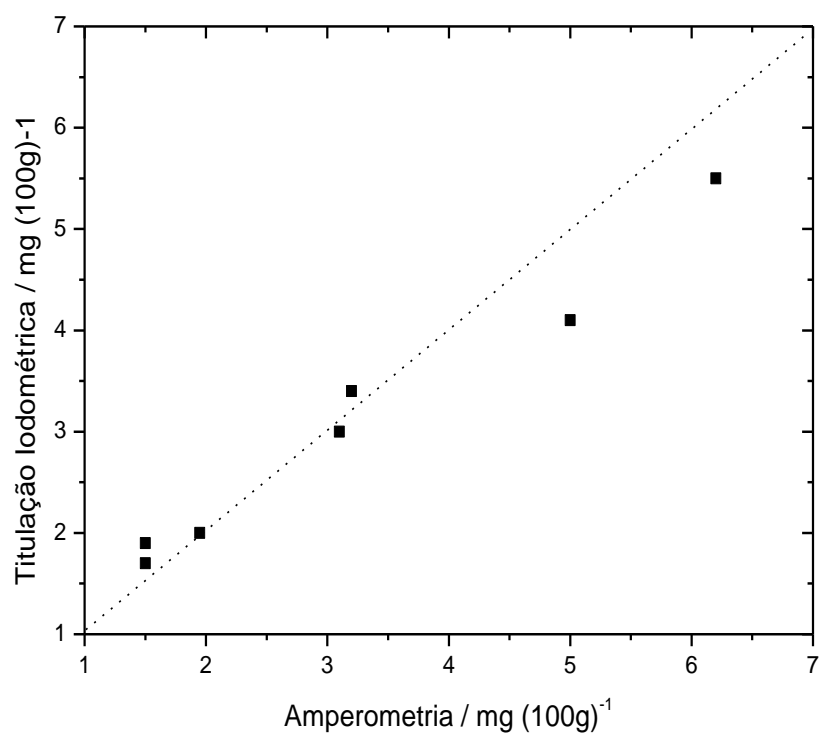


Figura 43: Comparação de resultados obtidos pela amperometria e pela iodometria para análise de ácido ascórbico em oito diferentes amostras de mel. Intercepto e inclinação, respectivamente (valor \pm desvio padrão): $0,34 \pm 0,16$ e $0,86 \pm 0,05$.

5.3.2) Extração da ascorbato oxidase, quantificação de proteínas no extrato e atividade enzimática.

A enzima *ascorbato oxidase* comercial é muito cara e difícil de ser adquirida, uma vez que a mesma é importada, por isso é viável estudos utilizando a enzima extraída de tecidos vegetais, como por exemplo, o pepino.

Para a extração da *ascorbato oxidase*, utilizou-se o pepino congelado para evitar a perda de líquido, descascado e ralado. Preparou-se soluções de tampão fosfato 100 mmol L^{-1} nos valores de pH 6,8; 7,0; 7,2; 7,4 e 7,6 homogeneizando 100g do pepino em 33 mL de cada uma dessas soluções. Deixou-se também 100 g de pepino em um béquer onde o mesmo foi macerado para a obtenção de um suco (extrato puro). O tempo de extração foi de 60 minutos e em seguida, filtrou-se em papel de filtro para a obtenção de um extrato que foi rotulado e armazenado em freezer, para posterior análise da atividade enzimática e quantificação de proteínas nos extratos.

O método do biureto tem sido aplicado para determinar a concentração de proteínas totais em diversos meios. É um método rápido, utiliza reagentes de baixo custo e não apresenta grande variação da absorvidade específica para diferentes proteínas [193]. Então, no presente estudo, para a quantificação de proteínas totais foi usado o método do biureto (Kit descrito no item 5.2.1) onde, o cobre, em meio alcalino, reage com proteínas formando um complexo quadrado planar com a ligação peptídica. O produto de reação apresenta uma coloração púrpura intensa e sua intensidade é proporcional à quantidade de tais ligações. Apresenta duas bandas de absorção, uma em 270 nm e outra em 540 nm, apesar da banda na região de 270 nm aumentar em seis vezes a sensibilidade do método, a banda na região de 540 nm é a mais utilizada para fins analíticos, porque diversas substâncias, normalmente presentes na maioria dos meios analisados, absorvem na região de 270 nm causando muita interferência no método [194]. A albumina é usada como padrão, pois apresenta uma estrutura protéica complexa, formada por aminoácidos essenciais e de cadeia ramificada.

A Tabela 16 mostra de forma simplificada o procedimento adotado para a preparação do material a ser utilizado na análise.

Tabela 16: Quantidades de soluções utilizadas nos tubos de ensaio.

| Quantidade de Tubos de Ensaio | 2 tubos para Branco | 3 tubos para Teste | 3 tubos para Padrão |
|-------------------------------|---------------------|--------------------|---------------------|
| Solução de Biureto | 2,5 mL | 2,5 mL | 2,5 mL |
| Extrato | - | 50 μ L | - |
| Solução Padrão de Albumina | - | - | 50 μ L |
| Hidróxido de Sódio | 2 gotas | 2 gotas | 2 gotas |

Após adição das soluções, homogeneizaram os tubos de ensaio deixando-se em repouso por 5 minutos em temperatura ambiente e em seguida foram feitas as medições no espectrofotômetro em comprimento de onda de 540 nm. Os resultados para a quantificação de proteínas nos extratos estão expressos na tabela 17.

Tabela 17: Relação entre o tipo de extrato e a concentração de proteínas totais.

| Tipo de Extrato | Concentração de Proteínas Totais (g L^{-1}) |
|------------------|--|
| Extrato pH 6,8 | 2,31 |
| Extrato pH 7,4,0 | 2,84 |
| Extrato pH 7,4,2 | 3,02 |
| Extrato pH 7,4,4 | 3,73 |
| Extrato pH 7,4,6 | 2,84 |
| Extrato Puro | 4,61 |

De posse destes resultados, fez-se então a determinação da atividade enzimática da ascorbato oxidase no extrato em pH 7,4 e no extrato puro, pois foram os que apresentaram as maiores concentrações de proteínas totais. Nesta determinação são adicionados 2,6 mL de tampão fosfato em pH 7,4 e 0,3 mL do extrato correspondente em um tubo de ensaio. A reação é iniciada com a adição de 100 μ L de ácido ascórbico $150 \mu\text{mol L}^{-1}$, desta mistura é retirada uma alíquota de 3,0 mL que é adicionada a uma cubeta de quartzo para fazer as leituras de absorvância. A oxidação da *ascorbato oxidase* foi monitorada pelo decréscimo de absorção no ultravioleta a 265 nm e temperatura ambiente no intervalo de tempo de 1 minuto [195]. A Tabela 18 mostra os resultados obtidos para esta determinação.

Tabela 18: Relação entre o tipo de extrato e atividade enzimática.

| Tipo de Extrato | Atividade Enzimática ($\mu\text{mol min.}^{-1} \text{mg}^{-1}$) |
|------------------|---|
| Extrato pH 7,4,4 | 17,16 |
| Extrato Puro | 28,85 |

Percebendo que a preparação do extrato puro é mais simples e que a concentração de proteínas totais e atividade enzimática são maiores se comparadas com extratos preparados a partir de uma solução tampão, optou-se em trabalhar com esse tipo de extrato, fazendo-se então o monitoramento da atividade enzimática por um período de trinta dias (durante este período os extratos foram armazenados sob uma temperatura de $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$) como apresentado na Figura 44, no qual se procedeu conforme descrito anteriormente para a determinação da atividade enzimática. A partir deste resultado, observou-se um comportamento importante do extrato, onde a atividade enzimática diminuiu de 50 a 60% do seu valor inicial em um período de sete dias, concluindo assim que o mesmo deve ser utilizado antes desse período para as determinações analíticas.

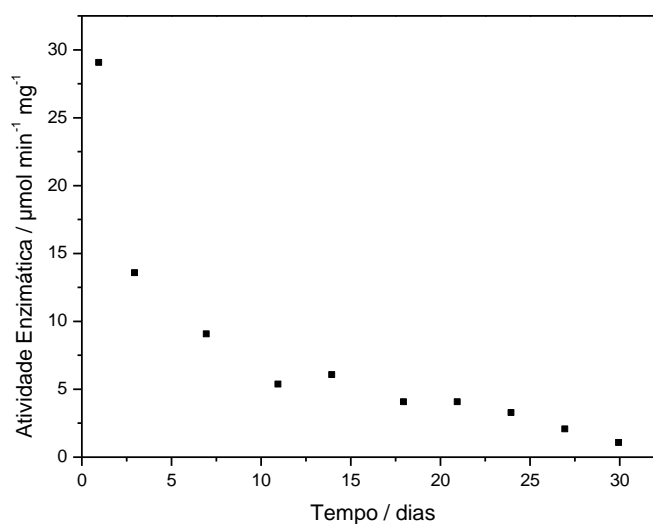


Figura 44: Relação entre Atividade Enzimática e tempo de armazenamento do extrato puro.

5.3.3) *Quantificação amperométrica de vitamina C em sucos, usando a ascorbato oxidase comercial e a enzima obtida a partir de extratos de pepino, ambas imobilizadas em reatores tubulares.*

5.3.3.1) *Condições de análise*

A Tabela 19 resume as condições usadas para a análise de ácido ascórbico em amostras de suco.

Tabela 19: Condições utilizadas na análise de ácido ascórbico em amostras de suco.

| Parâmetros | Condições Otimizadas |
|-----------------------------------|-----------------------------------|
| Eletrodo de trabalho | AuPd |
| Potencial de Oxidação | + 0,6 V |
| Vazão | 2,5 mL min ⁻¹ |
| Volume da alça de amostragem | 150 µL |
| Comprimento do percurso analítico | 20 cm |
| Quantidade de enzima comercial | 1,5 mL (32,4 U mL ⁻¹) |
| Volume de extrato de pepino | 5 mL |

5.3.3.2) *Curva analítica*

A proporcionalidade direta entre as correntes de oxidação e as concentrações de ácido ascórbico (P1) 20 µmol L⁻¹ a (P5) 100 µmol L⁻¹] foram confirmadas através da curva analítica, mostrada na Figura 45, da qual obteve a seguinte equação da reta: $I(A) = 5,36 \times 10^{-9} + 0,0220 [\text{ácido ascórbico}] (\text{mol L}^{-1})$; com coeficiente de correlação, 0,998. A repetibilidade do método apresentou um R.S.D. menor que 5%.

5.3.3.3) *Análise das amostras*

Na Figura 46 é mostrado a resposta amperométrica do eletrodo de ouro modificado com paládio para sucessivas injeções de 150 µL de ácido ascórbico com concentração variando de (P1) $2,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ a (P5) $10,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ e cinco

amostras de suco (A1-A5): sem tratamento enzimático, tratamento com enzima comercial e tratamento com enzima do extrato do pepino, respectivamente.

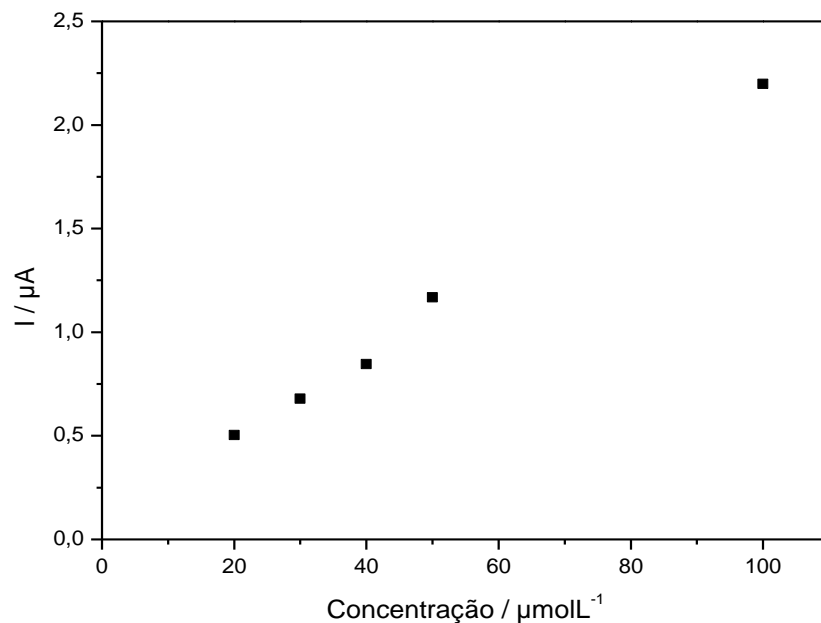


Figura 45: Curva analítica para a quantificação de ácido ascórbico nas amostras suco com concentrações variando de 20 a 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$.

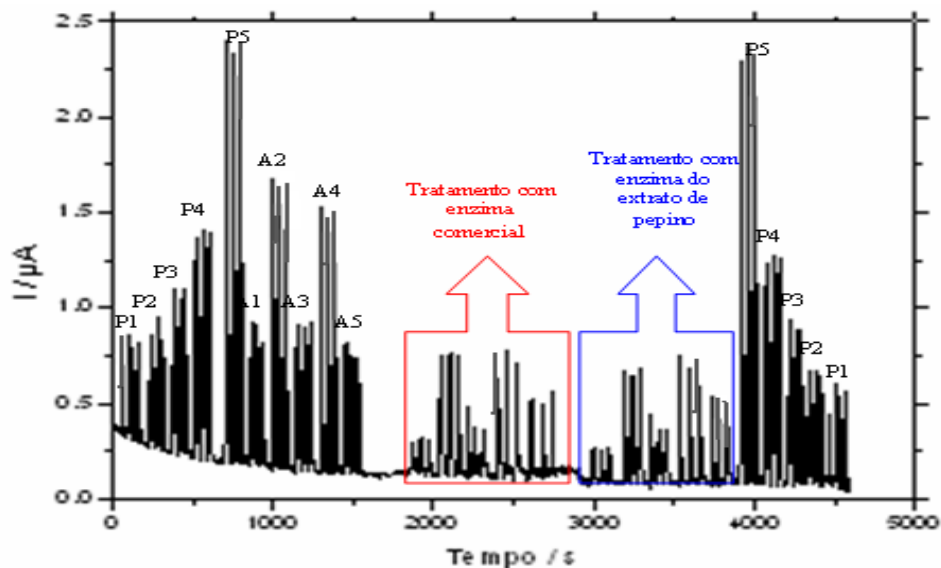


Figura 46: Diagrama da curva analítica (P1-P5) com concentrações variando de 20 a 100 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e 5 amostras de suco (A1 a A5): sem tratamento enzimático, tratamento com enzima comercial e com enzima do extrato do pepino, respectivamente.

Na Tabela 20 são mostrados os resultados comparativos das análises por amperometria, usando enzima comercial e extraída do pepino, desenvolvida neste trabalho e usando a titulação iodométrica [150] para cinco amostras diferentes de suco. A figura 47 compara os métodos: amperométrico usando a enzima comercial com o método usando enzima do extrato de pepino. Uma correlação positiva grau MUITO FORTE (com coeficiente de correlação de Pearson, $R= 0,99$) entre os métodos foi encontrado, o intervalo de confiança para a inclinação e intercepto foram $0,980 \pm 0,072$ e $0,004 \pm 0,007 \text{ g L}^{-1}$, respectivamente, para um nível de confiança de 95%.

Tabela 20: Concentrações de ácido ascórbico ($\text{g L}^{-1} \pm$ desvio padrão) nas amostras de suco.

| Amostras (sabor) | Amperometria (enzima comercial) g L^{-1} | Amperometria (enzima extraída do pepino) g L^{-1} | Titulação iodométrica g L^{-1} |
|------------------|---|--|---|
| 1 (goiaba) | $0,09 \pm 0,02$ | $0,10 \pm 0,02$ | $0,11 \pm 0,02$ |
| 2 (laranja) | $0,15 \pm 0,03$ | $0,15 \pm 0,03$ | $0,56 \pm 0,03$ |
| 3 (manga) | $0,08 \pm 0,01$ | $0,08 \pm 0,00$ | $0,10 \pm 0,09$ |
| 4 (pêssego) | $0,12 \pm 0,03$ | $0,12 \pm 0,03$ | $0,08 \pm 0,00$ |
| 5 (tomate) | $0,06 \pm 0,01$ | $0,06 \pm 0,01$ | $0,05 \pm 0,01$ |

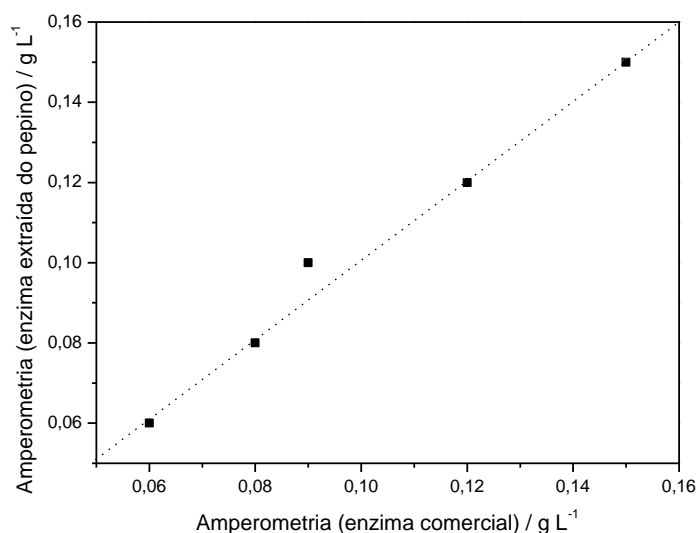


Figura 47: Comparação de resultados obtidos por amperometria: usando enzima comercial e enzima do extrato de pepino para análise de ácido ascórbico em cinco diferentes amostras de suco. Intercepto e inclinação, respectivamente (valor \pm desvio padrão): $0,004 \pm 0,007$ e $0,980 \pm 0,072$.

5.4 Considerações Finais

A metodologia amperométrica para quantificação de ácido ascórbico associada ao sistema por injeção em fluxo e ao uso de reatores tubulares enzimáticos imobilizados demonstrou ser uma técnica com alta sensibilidade, precisão, robustez e elevada frequência analítica (cerca de 70 determinações h^{-1}) na determinação dos teores de ácido ascórbico em amostras de mel e sucos.

Dentre os metais (paládio, irídio, platina e ródio) utilizados na modificação do eletrodo de ouro, foi demonstrado que o de ouro modificado com paládio foi o mais sensível à presença do analito. Na otimização dos parâmetros FIA o volume de injeção de 150 μL , a vazão de 2,5 mL min^{-1} e o percurso analítico de 20 cm foram às condições que originaram sinais transientes pouco dispersos, bem resolvidos, sem alterar a magnitude dos resultados, com menor consumo de reagentes, economia de material e de tempo. No estudo substituindo a enzima purificada (vendida comercialmente) pela enzima extraída do pepino obteve-se um resultado satisfatório indicando que o extrato do vegetal pode ser utilizado como fonte enzimática.

Com a otimização dos principais parâmetros da metodologia obteve-se curvas analíticas bastante precisas com elevado grau de concordância entre os resultados alcançados nas análises para as injeções das soluções padrão de ácido ascórbico. Valores baixos de limite de detecção ($1,4 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$) e quantificação ($4,66 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$) demonstraram a sensibilidade da metodologia amperométrica nesse tipo de determinação. Durante a quantificação de ácido ascórbico nas amostras de mel os resultados variaram entre 1,5 mg (100g)^{-1} (Morrão de Candeia) e 6,2 mg (100g)^{-1} (Eucalipto), com valores médios de ácido ascórbico para as 7 amostras analisadas de 3,2 mg (100g)^{-1} e para as amostra de suco estes resultados variaram entre 0,06 gL^{-1} (tomate) e 0,15 gL^{-1} (laranja), com valores médios de 10 gL^{-1} .

6. Uso da Enzima *Uricase* para a Determinação Amperométrica Diferencial de Ácido Úrico em Amostras de Urina.

6.1) Introdução

6.1.1) Ácido Úrico

O ácido úrico 7,9-dihidro-1H-purina-2,6,8(3H)-triona, é um composto orgânico formado por carbono, nitrogênio, oxigênio e hidrogênio. Sua fórmula química é $C_5H_4N_4O_3$ e sua estrutura esta representada na Figura 48. É um composto pouco solúvel em água (6mg/100mL) [196] e apresenta dois hidrogênios ionizáveis, com valores de $pK_{a1}=5,7$ e $pK_{a2}=10,3$ (Figura 48). De acordo com a literatura, os hidrogênios mais facilmente ionizáveis encontram-se nas posições 3 e 9, devido ao maior número de estruturas de ressonância que os ânions assumem com a perda destes hidrogênios para estabilizar a carga negativa. Não existem informações sobre as constantes de ionização dos outros dois hidrogênios, que necessitam de alta energia para serem ionizados, provavelmente porque as estruturas de ressonância envolvem estabilização da carga negativa nos átomos de carbono e nitrogênio, o que leva a molécula a um nível energético elevado e instável [197].

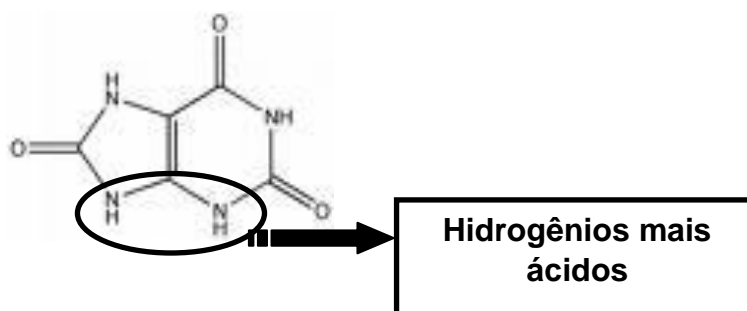


Figura 48: Estrutura do Ácido Úrico.

Fonte: www.portalsaofrancisco.com.br/alfa/acido-urico/acido-urico-5, consulta em 16/09/2010.

O ácido úrico é comumente encontrado em fluidos biológicos humanos, principalmente no soro, sangue e urina. É o principal produto final do metabolismo das purinas (proteínas) e sua determinação em urina é um poderoso indicador de

alteração metabólica, aparecimento de doenças ou como controle durante o uso de drogas quimioterapêuticas [198]. A faixa de concentração de ácido úrico em urina é de aproximadamente 0,25 a 0,75 g L⁻¹.

Como dito anteriormente, os níveis urinários de ácido úrico podem indicar o aparecimento de algumas doenças, por exemplo:

- a) Gota: doença que causa o desenvolvimento da artrite reumatóide devido à alta concentração sérica de ácido úrico e, conseqüentemente, deposição de cristais nas articulações (Figura 49). Esta doença pode apresentar diversas causas, desde alimentação inadequada até falhas genéticas. A profilaxia geralmente indicada para o tratamento da gota é a ingestão de alopurinol, que inibe a ação da enzima *xantina oxidase* e permite que a *xantina* seja reaproveitada na síntese das base nitrogenadas [199].



Figura 49: Fotografia da mão de uma pessoa com doença de Gota. **Fonte:** www.mdsaude.com/2009/04/gota-acido-urico, consulta em 16/09/2010.

- b) Síndrome de Lesch-Nyham: é uma doença metabólica hereditária que afeta principalmente os homens. Clinicamente ocorre retardamento mental, comportamento agressivo, automutilação e insuficiência renal. Bioquimicamente ocorre um excesso de produção de ácido úrico em decorrência da virtual ausência de uma enzima essencial para o metabolismo das purinas, a *hipoxantina guanina fosforibosiltransferase* (HPG) [200].
- c) Nefrolitíase: pode ser considerado um exemplo de alterações naturais de biomineralização não esperadas e certamente não desejadas, que acometem normalmente pessoas saudáveis, em qualquer idade. Pode ser definida como uma doença na qual os cristais de ácido úrico podem se formar nos rins e

reduzir o volume urinário. O tratamento da nefrolitíase se divide em medidas gerais e medidas específicas. Nas medidas gerais são recomendados grande ingestão de líquido com pelo menos 50% em água, exercícios físicos e orientação dietética. Nas medidas específicas será indicado o uso de certas drogas de acordo com o diagnóstico apresentado. Naqueles casos onde os cristais não são eliminados espontaneamente a sua retirada deve ser realizada através de cirurgia aberta ou percutânea e/ou litotripsia extracorpórea por ondas de choque. Esta doença também pode ser causada por intoxicação por chumbo que afeta o funcionamento do fígado e desequilibra a produção de ácido úrico no organismo, uma vez que o metabolismo das purinas ocorre em grande parte neste órgão, levando à geração e excreção de quantidades elevadas de ácido úrico [199].

A prática de exercícios físicos e a ingestão de bebidas alcoólicas diminuem a excreção de ácido úrico na urina, pois o ácido láctico produzido por esforço muscular intenso ou pelo metabolismo do etanol compete com o ácido úrico no processo de reabsorção no trato renal [201]. Sendo assim, é importante ressaltar que a quantificação de ácido úrico em urina não deve ser empregada para diagnósticos definitivos.

6.1.3) Quantificação de ácido úrico

Os procedimentos mais comumente empregados para a determinação de ácido úrico em amostras biológicas são enzimáticos, cromatográficos ou baseados nas propriedades redox do analito [202]. Na Tabela 21 são apresentados alguns métodos descritos na literatura para a determinação de ácido úrico em amostras biológicas.

Tabela 21: Alguns procedimentos para a determinação de ácido úrico em amostras biológicas [198].

| Procedimentos | Princípio | Amostra |
|---|---|----------------|
| Enzimático-espectrofotometria em batelada | Monitoramento de H ₂ O ₂ gerado na oxidação enzimática do ácido úrico. | Urina |
| Enzimático-potenciometria em batelada | Monitoramento do CO ₂ gerado na oxidação enzimática do ácido úrico | Sangue |
| Enzimático-potenciometria em fluxo | Monitoramento do consumo de O ₂ na reação de oxidação enzimática do ácido úrico | Sangue |
| Espectrofotometria em batelada | Descoloração do hidroxihidroquininaftaleína de Pd(II) devido à complexação do Pd(II) pelo ácido úrico | Urina |
| Espectrofotometria em batelada | Redução do íon fosfotungstato a azul de tungstênio | Urina e Sangue |
| Espectrofotometria em fluxo | Redução do Fe(III) a Fe(II) pelo ácido úrico para formar o complexo Fe(II)/tripiridiltriazina | Urina |
| Amperometria em fluxo | Detecção amperométrica de ácido úrico em um sistema em fluxo com linha única | Urina |
| Amperometria em fluxo | Detecção amperométrica de ácido úrico em um sistema em fluxo com multicomutação | Urina |
| Cromatografia líquida | Cromatografia de fase reversa | Urina |

Os métodos enzimáticos baseiam-se na oxidação do ácido úrico pelo O₂ na presença da *uricase*, gerando alantoína, CO₂ e H₂O₂. Detectores eletroquímicos foram empregados para medir o consumo de oxigênio [203] ou a geração de dióxido de carbono [204]. Etapas trabalhosas de preparo de amostras ou de condicionamento de eletrodos são geralmente necessárias, devido à presença de diversas espécies eletroativas em amostras biológicas. O consumo do analito pode ser monitorado diretamente por espectrofotometria no visível [205], porém este procedimento requer complexo preparo das amostras para eliminar outras espécies absorventes, como proteínas e íons sulfato. Por outro lado, como podemos ver na Figura 50, a concentração de ácido úrico (I) pode ser relacionada com a geração de H₂O₂. A enzima peroxidase catalisa a oxidação de compostos aromáticos em meio

aquoso na presença do H_2O_2 , em uma série de eventos seqüenciais que envolvem a formação de radicais livres até a reação final com um substrato cromógeno, gerando um composto cuja intensidade da cor é proporcional à atividade enzimática e a concentração de peróxido no meio.

A reação se inicia com a oxidação do fenol (PhOH) catalisada pela peroxidase (POD) e H_2O_2 com a produção do radical livre fenoxi (PhO^\bullet). A seqüência dos eventos envolvidos pode ser descrita pelo mecanismo de Chance-George [206] (Figura 51):

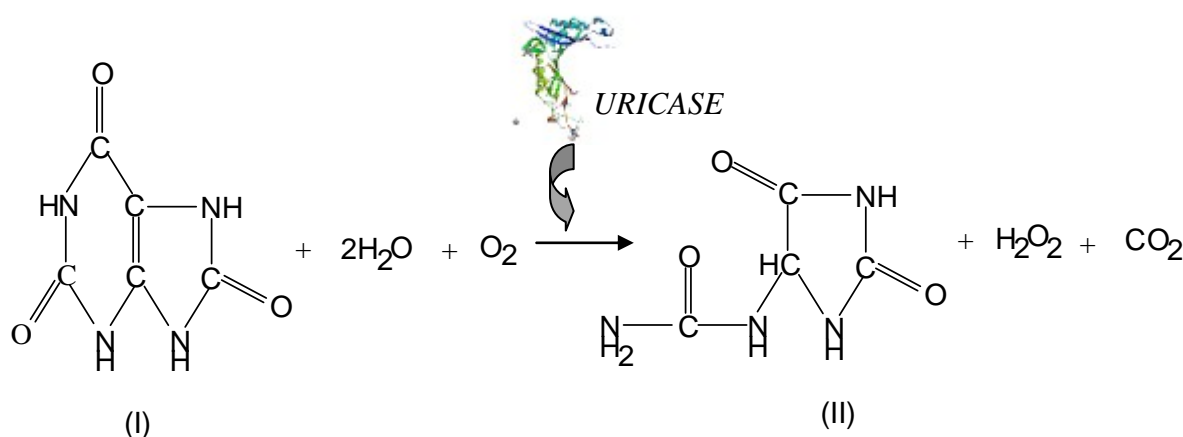


Figura 50: Reação catalítica da enzima uricase com oxidação do ácido úrico na presença de oxigênio produzindo alantoína e CO_2 como produtos de oxidação do ácido úrico e H_2O_2 como produto de redução do O_2 .

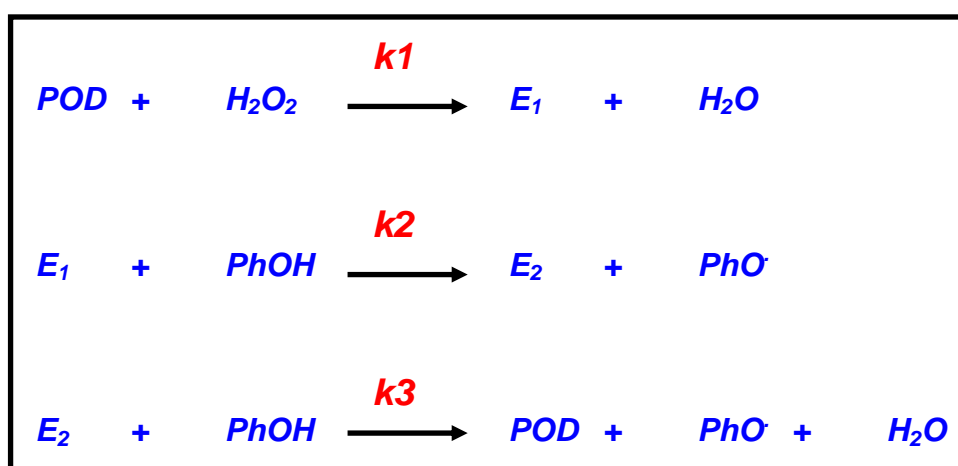


Figura 51: Mecanismo de Chance-George [202].

A enzima peroxidase (POD) é oxidada pelo H_2O_2 a um intermediário ativo enzimático chamado de E_1 . Este composto aceita o fenol (PhOH) em seu sítio ativo e conduz sua oxidação. O radical livre fenoxi (PhO^\bullet) é produzido e liberado na

solução junto com um composto E_2 que oxida uma segunda molécula de fenol, liberando outro radical livre e retornando a enzima no seu estado natural (POD), completando o ciclo. A geração da cor resulta da reação dos radicais fenoxi com a 4-aminoantipirina ($Am-NH_2$) e o H_2O_2 gerando a anti-pirilquinonimina (APQ), como está descrito na Figura 52. O composto de coloração vermelha e absorvidade molar (ϵ) $7210 \text{ mol L}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ tem pico máximo de absorção em 510 nm de comprimento de onda (λ_{Max}) - Figura 53 [206].

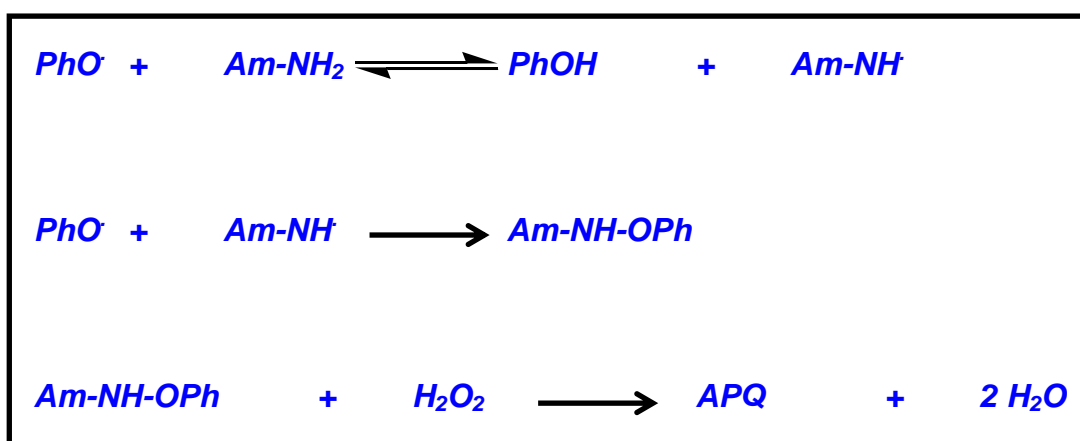


Figura 52: Mecanismo de formação da anti-pirilquinonimina.

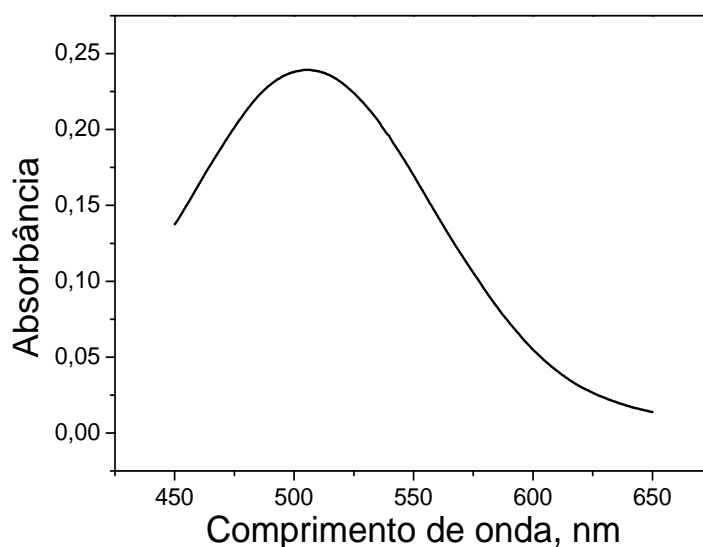


Figura 53: Exemplo de espectro de absorção do complexo anti-pirilquinonimina gerado na determinação de H_2O_2 .

A geração da cor pela reação do fenol, 4-aminoantipirina e peróxido de hidrogênio, catalisada pela enzima peroxidase pode ser representada pela seguinte reação global (Figura 54) [206].

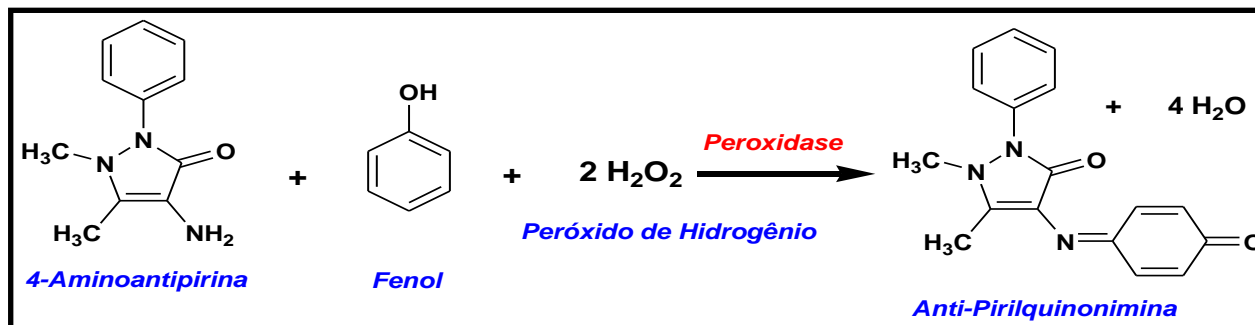


Figura 54: Reação global da formação da anti-pirilquinonimina

A determinação indireta de glicose e ácido úrico na urina foi descrita por Matos e colaboradores (2001) [90] com aplicação da metodologia em amostras de interesse biológico. A glicose é oxidada a ácido glucônico (ou gluconato) pela *glicose oxidase*, enquanto o ácido úrico em alantoína pela enzima *uricase*. Em ambos os casos, o H₂O₂ gerado no meio reacional é submetido à metodologia descrita anteriormente. O composto colorido anti-pirilquinonimina formado é proporcional ao teor de H₂O₂ e, conseqüentemente, aos analitos de interesse biológico [90]. O mesmo princípio foi utilizado na determinação de glicose por Oliveira (2005) [207], porém em amostras de sangue.

A cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa também foi utilizada para a determinação de ácido úrico em amostras de sangue e urina [208] com fase móvel H₂O:CH₃OH em tampão NH₄Ac (pH=7). A baixa frequência de amostragem (6 amostras h⁻¹) e o alto custo para aquisição e manutenção do equipamento, assim como a geração de resíduos tóxicos, dificultam o emprego desta técnica em análises de rotina em laboratórios clínicos.

Sistemas de análises em fluxo em linha única [209] e com multicomutação [210], ambos com detecção amperométrica, foram utilizados para a determinação de ácido úrico em amostras de urina. No primeiro procedimento [209], a amostra foi inserida em um fluxo de solução transportadora (H₂SO₄) e a zona de amostra foi conduzida diretamente para o detector amperométrico. No sistema com

multicomutação [210], válvulas selenóides foram responsáveis pela inserção da amostra em um fluxo da solução de H_2SO_4 para dispersão e outra válvula pela seleção de uma fração da zona de amostra dispersa para enviar ao detector amperométrico. Ambos os procedimentos apresentaram frequências de amostragem que permitem a aplicação dos sistemas em análises clínicas. Contudo, outros derivados de purina, como cafeína, tendem a ser adsorvidos na superfície do eletrodo de trabalho e isto exige a sua remoção periódica para substituição ou ativação.

O ácido úrico também pode ser quantificado por espectrofotometria. Pileggi e colaboradores (1972) [211] fizeram a quantificação através da redução do íon fosfotungstato na presença do analito com formação do complexo azul de tungstênio. Este procedimento apresentou baixa seletividade devido à precipitação de proteínas na presença de ácido fosfotungstínico, exigindo separação prévia. Araújo e colaboradores (2001) [212] propuseram um procedimento na presença de ácido ascórbico que leva em conta a diferença dos sinais obtidos em dois tempos de residência. A amostra foi misturada com uma solução contendo $Fe(III)$ e o íon metálico em sua forma reduzida gerou um complexo colorido com tripiridiltrizina. O primeiro sinal obtido foi correspondente à formação do complexo $Fe(III)$ -ácido ascórbico. Então, a zona de amostra atravessou um reator, sendo redirecionada para o detector para a obtenção do sinal correspondente à soma das concentrações de ácido ascórbico e ácido úrico. Devido à dispersão adicional da zona de amostra e às diferentes taxas de conversão dos analitos, a determinação de ácido úrico exigiu cálculos trabalhosos. Yamaguchi e colaboradores (2007) [213] quantificaram o ácido úrico na presença do complexo hidroxihidroquinonaftaleína de paládio (II), que apresenta máxima absorção em 635 nm. O complexo $Pd(II)$ -ácido úrico atenua o sinal analítico devido à decomposição do complexo colorido de $Pd(II)$. As principais desvantagens são alto custo dos sais de $Pd(II)$, etapas trabalhosas para o preparo da solução do reagente complexante e aquelas associadas aos procedimentos em batelada.

Outros métodos ainda foram propostos, por exemplo: Kuwabata e colaboradores (1998) [214] imobilizaram a uricase em monocamada automontada sobre um eletrodo de ouro modificado com 2-aminoetanotiolato. A *uricase* foi depositada em conjunto com glutaraldeído como agente reticulante. O eletrodo ouro/uricase apresentou resposta amperométrica ao ácido úrico com o uso de

$[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$, como mediador de H_2O_2 , dissolvido em solução, podendo assim ser detectado em baixos potenciais (0,1 V versus SCE). Miland e colaboradores (1996) [215] depositaram a *uricase* com *peroxidase* sobre eletrodo de pasta de carbono com poli(o-aminofenol), o H_2O_2 foi detectado a 0,05 V versus Ag/AgCl. Hoshi e colaboradores (2003) [216] prepararam sensores amperométricos usando uma membrana de polieletrólito e o método de multicamadas automontadas. Eles depositaram a *uricase* com a poli(alilamina) sobre eletrodos de platina previamente modificados com uma membrana de poli(vinil sulfônico), resultando em um filme automontado contendo as duas bicamadas. Moléculas de H_2O_2 poderiam passar livremente na membrana, que bloqueia moléculas maiores tais como o ácido úrico.

6.2) Parte experimental específica

6.2.1) Reagentes

O ácido úrico foi obtido da Merck (Darmstadt, Alemanha). A *Uricase* (EC 1.7.3.3 22 U mg^{-1}), foi obtida da Sigma (St.Louis, Missouri, USA). Solução da enzima *uricase* foi preparada em tampão 4,4 U mL^{-1} . Soluções diluídas de ácido úrico foram preparadas diariamente utilizando tampão fosfato (pH 7,4,4; 0,1 mol L^{-1}).

6.2.2) Amostras

Trabalhou-se com 5 amostras de urina, sendo estas coletadas em amostra única sem jejum, pois de acordo com Penido e colaboradores (2002) [217] a excreção de ácido úrico em urina coletada durante 24h (procedimento normalmente utilizado) se correlaciona com amostras urinárias simplificadas (amostra única, sem horário fixo e sem jejum), permitindo, portanto, o uso destas para diagnóstico metabólico. Para a determinação de ácido úrico, 100 μL de amostras foram diluídas em 25 mL de tampão fosfato 0,1 mol L^{-1} e injetadas diretamente no sistema em fluxo.

6.2.3) Procedimento

O método proposto para determinação de ácido úrico é baseado na detecção do peróxido de hidrogênio gerado na reação de oxidação do ácido úrico utilizando a *uricase* em solução. Para isso, utilizou-se um eletrodo de ouro (3,0 mm de diâmetro) modificado com paládio (K_2PdCl_6). Após a eletrodeposição de paládio, uma pequena camada de acetato de celulose (5% em acetona) foi adicionado. Esta camada foi colocada com o propósito de diminuir o efeito de interferentes, já que a amostra trata-se de uma matriz complexa.

Trabalhou-se também o método proposto por Matos e colaboradores (2000) [146] onde usou-se a adição de padrão e eletrodo modificado com paládio. A concentração de ácido úrico foi calculada por diferença, sendo necessário, portanto, três injeções: (1) 2 mL de solução da amostra (100 μ L de amostra em 25 mL de tampão) com 100 μ L de padrão de ácido úrico 1 mmol L⁻¹ (2) solução da amostra e (3) 4 mL de solução da amostra com 50 μ L de solução enzimática (4,4 U mL⁻¹).

6.3) Resultados e discussões

6.3.1) Eletrodos

O ácido úrico é oxidado pela enzima *uricase* em alantoína e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (Figura 50). A principal dificuldade em trabalhar com detecção amperométrica, neste caso, é que tanto o ácido úrico quanto o H_2O_2 são eletroativas em uma ampla faixa de potencial.

A solução foi estudar a possibilidade de aplicar um eletrodo que responda a apenas uma das duas espécies eletroativas. Para isso, utilizou-se um eletrodo de ouro modificado com paládio com uma fina camada de acetato de celulose (5% em acetona). Pela Figura 55 pode-se perceber que a concentração máxima de ácido úrico detectada é de 50 μ mol L⁻¹ e a de H_2O_2 é de 5 μ mol L⁻¹, isto indica que em baixas concentrações apenas o H_2O_2 é capaz de permear esta camada e atingir a superfície do eletrodo.

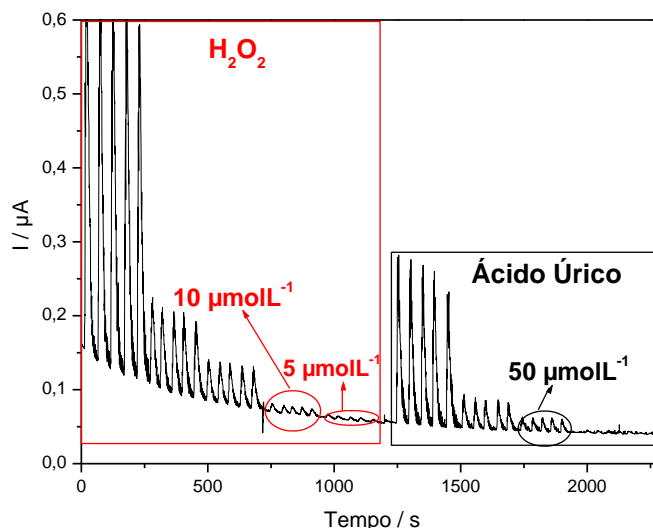


Figura 55: Eletrodo de ouro modificado com Pd e acetato de celulose para diferentes concentrações de H₂O₂ (5, 10, 50, 100 e 500 μmol L⁻¹) e ácido úrico (5, 10, 50, 100 e 500 μmol L⁻¹). Potencial aplicado 0,6 V (vs. Ag/AgCl_(sat)).

6.3.2) Tempo de reação enzima / substrato e volume de solução enzimática

A Figura 56A mostra que o tempo de reação entre a enzima (*uricase*) e o substrato (ácido úrico) não interfere de forma significativa na intensidade da corrente, por isso trabalhou-se com um tempo aproximado de 5 minutos.

Como dispomos de pequena quantidade de enzima trabalhou-se com uma solução enzimática (2,9 U mL⁻¹) e foi preciso verificar qual o menor volume desta solução era capaz de oxidar todo o ácido úrico em H₂O₂. De acordo com a Figura 56B, 50 μL desta solução foi o suficiente para obtermos um sinal de corrente máximo para H₂O₂.

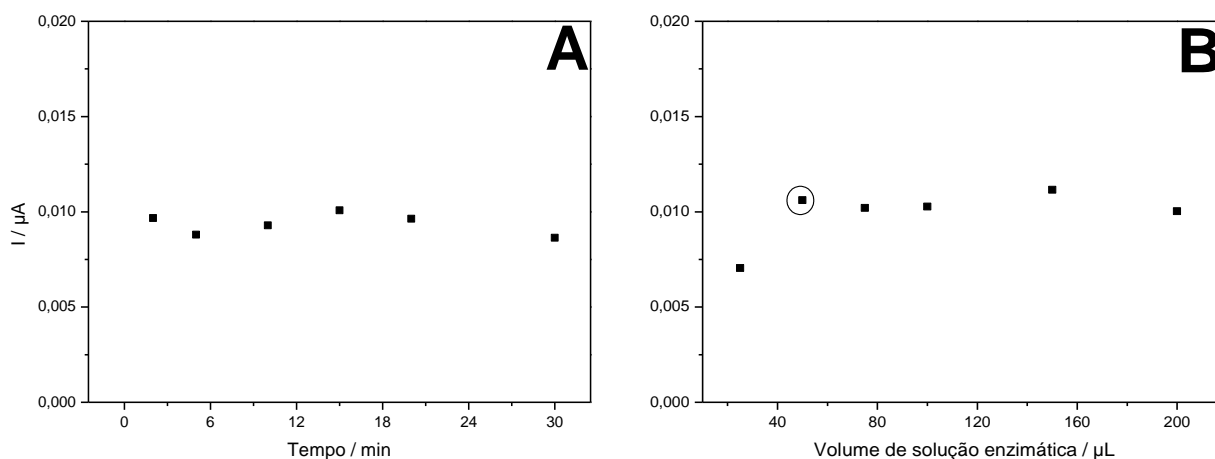


Figura 56: Injeções de ácido úrico $10 \mu\text{mol L}^{-1}$ para a escolha da melhor condição de trabalho. (A) Tempo de reação da enzima com o substrato (0-30 min.) e (B) Volume da solução enzimática (25-200 μL). As medidas foram feitas com um eletrodo de ouro modificado por eletrodeposição de Pd e acetato de celulose. Potencial aplicado 0,6 V (vs. $\text{Ag}/\text{AgCl}_{(\text{sat})}$).

6.3.3) Vazão e volume da alça de amostragem

Na figura 57 são mostrados a influência do volume de amostra injetada em A, e a influência do fluxo em B, sobre o sinal analítico. Foram estudadas alças com volume variando de 50 a 300 μL , pode-se observar que até o volume de 150 μL o sinal aumenta significativamente com o volume. Com isso o volume de 150 μL foi escolhido para estudos subseqüentes, levando em consideração também que com o aumento do volume o tempo requerido para cada análise aumenta.

A vazão estudada variou de 1,4 a 4,4 mL min^{-1} , e pôde-se observar que este parâmetro pouco influenciou na intensidade da corrente de oxidação, isto provavelmente, porque o tratamento enzimático foi feito em separado do sistema em fluxo e, portanto, decidiu-se trabalhar com uma vazão de 2,0 mL min^{-1} .

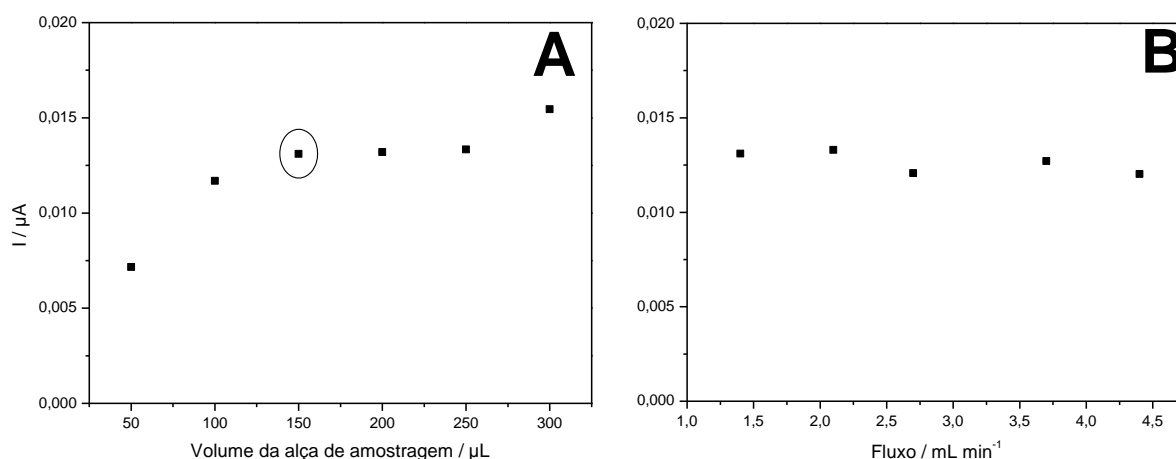


Figura 57: Injeções de ácido úrico $10 \mu\text{mol L}^{-1}$ para a escolha da melhor condição de trabalho. (A) Volume da alça de amostragem de 50 a 300 μL e (B) taxa de vazão de 1,4 a 4,4 mL min^{-1} . As medidas foram feitas com um eletrodo de ouro modificado por eletrodeposição de Pd e acetato de celulose. Potencial aplicado 0,6 V (vs. $\text{Ag/AgCl}_{(\text{sa})}$)

6.3.4) Curva analítica

Na Figura 58A é mostrado a resposta amperométrica do eletrodo de ouro modificado com paládio e acetato de celulose para sucessivas injeções de 150 μL de ácido úrico, tratados enzimaticamente, de (P1) $5,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ a (P10) $5,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ e cinco amostras de urina (A1-A5). A curva analítica está representada no insert 1A, na Figura 58, e mostra que houve uma proporcionalidade entre as correntes amperométricas e as concentrações de ácido úrico, da qual obteve a seguinte equação da reta: $I(\text{A}) = 2,73 \times 10^{-10} + 3,95 \times 10^{-4} [\text{ácido úrico}] (\text{mol L}^{-1})$ e coeficiente de correlação de 0,99. Os limites de detecção e de quantificação obtidos foram respectivamente $1,05 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ e $3,32 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$, nas condições adotadas no presente estudo. A repetitividade das medidas apresentou um R.S.D. menor que 5%. A Figura 58B mostra a análise da adição de padrão onde foram injetadas: amostra + padrão (1 mmol L^{-1}), amostra e amostra tratada enzimaticamente. Por diferença calculou-se a concentração de ácido úrico na amostra.

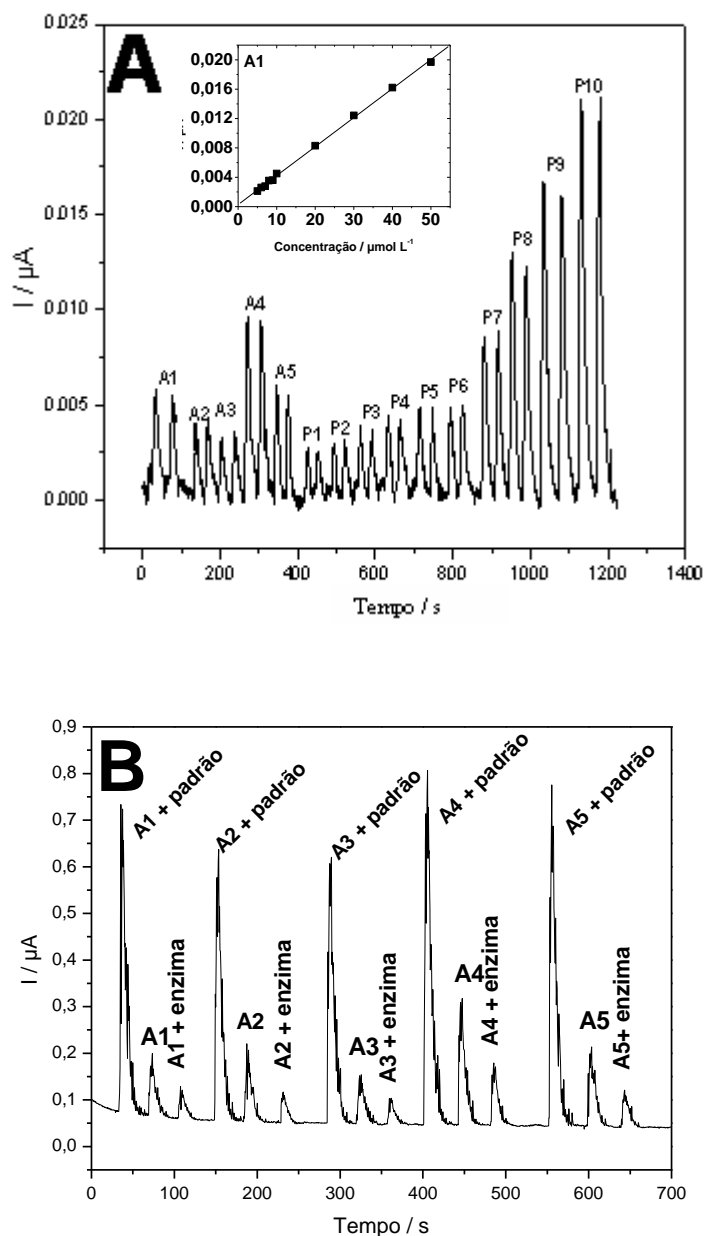


Figura 58: Diagrama de 5 amostras de urina (A1 a A5) e curva analítica (P1-P10) com concentrações variando de 5 a 50 $\mu mol L^{-1}$ (em A); curva analítica (em insert A1) e curva de adição de padrão (em B).

6.3.5) Análise das amostras

Na Tabela 22 e na Figura 59 comparam os resultados das análises por amperometria desenvolvida neste trabalho com uma análise também por amperometria porém utilizando adição de padrão (Matos e colaboradores, 2000 [146]) para cinco amostras diferentes de urina (em duplicata). O teste t de Student mostra que os valores ($t_{\text{experimental}} < t_{\text{teórico}}$; $0,25 < 2,77$, $n=4$, $P=0,05$) não tem

diferença significativa, o que é um indicativo forte da ausência de erros sistemáticos. Uma correlação positiva grau MUITO FORTE (com coeficiente de correlação de Pearson, $R= 0,92$) entre os métodos amperométricos (curva analítica x adição de padrão) foi encontrada, o intervalo de confiança para a inclinação e intercepto foram $1,53 \pm 0,37$ e $0,20 \pm 0,14 \text{ g L}^{-1}$, respectivamente, para um nível de confiança de 95%. Todas as amostras analisadas apresentaram um nível de ácido úrico dentro dos limites considerados como normais ($0,25$ a $0,75 \text{ g L}^{-1}$).

Tabela 22: Os resultados dos experimentos de determinação de ácido úrico (g L^{-1}) em amostras de urina.

| Amostras | Amperometria (curva analítica) (g L^{-1}) | Amperometria (adição de padrão) (g L^{-1}) |
|----------|---|--|
| A1 | 0,320 | 0,272 |
| A2 | 0,372 | 0,442 |
| A3 | 0,287 | 0,235 |
| A4 | 0,477 | 0,523 |
| A5 | 0,388 | 0,337 |
| Média | 0,369 | 0,362 |
| Vmin | 0,287 | 0,235 |
| Vmáx | 0,477 | 0,523 |

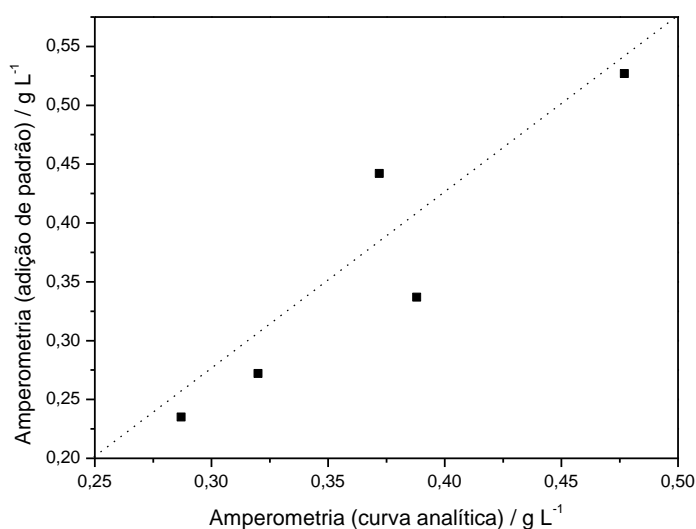


Figura 59: Comparação de resultados obtidos pelos métodos de amperometria (curva de calibração e adição de padrão) para análise de ácido úrico em cinco diferentes amostras de urina. Intercepto e inclinação, respectivamente (valor \pm desvio padrão): ($1,53 \pm 0,37$) g L^{-1} e ($0,20 \pm 0,14$).

6.4 Considerações Finais

O eletrodo de ouro modificado com paládio foi escolhido como eletrodo de trabalho, pois ele apresentou um sinal de corrente máxima para H_2O_2 e mínima para ácido úrico, sendo assim mesmo que algumas moléculas de ácido úrico conseguissem permear pela camada de acetato de celulose este analito não seria detectado. De acordo com os resultados obtidos este eletrodo respondeu a esta propriedade imposta sobre ele.

Na otimização dos parâmetros FIA o volume de injeção de 150 μL e o percurso analítico de 20 cm foram às condições que originaram sinais transientes pouco dispersos, bem resolvidos, sem alterar a magnitude dos resultados, com menor consumo de reagentes, economia de material e de tempo. Neste estudo o parâmetro de vazão não exerceu influencia sobre o sinal analítico, isto porque o tratamento enzimático foi feito em separado do sistema em fluxo.

Com a otimização dos principais parâmetros da metodologia obteve-se curvas analíticas bastante precisas com elevado grau de concordância entre os resultados alcançados nas análises para as injeções das soluções padrão de ácido úrico. Valores baixos de limite de detecção ($1,05 \mu\text{mol L}^{-1}$) e quantificação ($3,32 \mu\text{mol L}^{-1}$) demonstraram a sensibilidade da metodologia amperométrica nesse tipo de determinação. Durante a quantificação de ácido úrico nas amostras de urina os resultados variaram entre $0,287 \text{ gL}^{-1}$ e $0,477 \text{ gL}^{-1}$, com valores médios de ácido úrico para as 5 amostras analisadas de $0,367 \text{ gL}^{-1}$, todos os valores dentro dos limites considerados como normais ($0,25$ a $0,75 \text{ gL}^{-1}$). Neste estudo a amperometria diferencial provou ser uma técnica com alta sensibilidade, precisão, robustez e elevada frequência analítica (cerca de 80 determinações h^{-1}) na determinação dos teores de ácido úrico em amostras de urina.

7. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS

Conclusões finais

A utilização do eletrodo de Au modificado por eletrodeposição, com diferentes metais, entre eles: Pt, Pd, Ir, Rh e associação PdPt atribuiu a este eletrodo novas propriedades físico-químicas, originando sinais de correntes mais elevados do que na ausência destes metais modificadores, provocando assim uma melhor sensibilidade do método analítico, o que pode estar relacionado a dois principais fatores, o primeiro ao aumento de área dos eletrodos e o segundo a um possível efeito catalítico destes metais nas respectivas reações de oxidação estudadas. Para os analitos estudados: glicose, ácido ascórbico e ácido úrico, independente da amostra analisada: mel, água de coco, forrageira, suco ou urina, o eletrodo de Au modificado com os metais Pd, Pt ou sua associação sempre apresentaram as maiores correntes de oxidação, sendo, portanto mais sensíveis.

As enzimas *peroxidase*, *glicose oxidase*, e *ascorbato oxidase* foram imobilizadas utilizando a resina Amberlite IRA 743 como suporte e o glutaraldeído como reagente multifuncional, alcançando assim uma imobilização através da formação de ligações covalentes cruzadas intermoleculares entre o glutaraldeído e a resina. Estas enzimas quando imobilizadas permaneceram estáveis, ou seja, não perderam a atividade catalítica, por aproximadamente quatro semanas, quando mantidas sob refrigeração em temperatura de - 4°C.

O método proposto para a quantificação de glicose foi simples e rápido podendo ser aplicado em diferentes matrizes. A técnica combinada com a alta eficiência da enzima imobilizada no reator proporcionou uma alta seletividade e permitiu trabalhar com pequenos volumes de amostras à baixas concentrações.

A determinação amperométrica diferencial de ácido ascórbico mostrou-se um método eficaz, principalmente, quando se trabalha com amostras coloridas ou com níveis de concentração baixos. O método proposto para a extração da enzima ascorbato oxidase a partir do pepino provou ser eficiente. É um método simples e economicamente viável, pois pode substituir a enzima comercial (enzima com custo elevado). Mesmo sem a enzima extraída do pepino ter passado por nenhum processo de purificação, os resultados encontrados apresentam uma boa correlação quando comparados ao uso da enzima comercial.

A análise de ácido úrico em urina usando o método proposto apresentou como vantagem em relação ao método usado para efeito comparativo (adição de padrão) uma análise mais rápida, pois com apenas uma curva analítica foi possível analisar várias amostras.

Perspectivas Futuras

As determinações analíticas, juntamente com a química enzimática são campos promissores da ciência em constante crescimento e investimentos durante essas últimas décadas. A seletividade das enzimas e a sua capacidade em catalisar reações com substratos de baixas concentrações são extensivamente aplicadas na análise química, ambiental, médica e biotecnológica. O aumento da demanda das pesquisas e a necessidade de aprimorar novas técnicas fazem com que este segmento da ciência desenvolva-se cada vez mais a fim de suprir as necessidades das pesquisas futuras.

Com a crescente aclamação da comunidade científica em identificar e quantificar diferentes analitos, presentes em concentrações variadas, nas mais diversas matrizes, fica evidente a importância futura das pesquisas no desenvolvimento de metodologias rápidas, confiáveis e de baixo custo. A complexidade de uma matriz é um desafio para os pesquisadores e a determinação de composições químicas tem vários propósitos analíticos além da simples verificação da adulteração ou controle de qualidade de produto.

Usando a metodologia proposta para a determinação de glicose, outros açúcares, como a sacarose, lactose e maltose também poderiam ser quantificadas, visto que um dos produtos de oxidação enzimática destes compostos é a glicose, e para aplicar esta metodologia será necessário otimizar parâmetros (pH, temperatura, concentração, suporte, tipo de imobilização etc.). A quantificação de ácido ascórbico poderá ser aplicada em outras amostras, principalmente aquelas cujos níveis desta vitamina são baixos, como exemplo, pode-se citar amostras de carne como o fígado ou músculo. Vale salientar ainda o emprego de enzimas extraídas de tecidos vegetais, assim como a *ascorbato oxidase*, que pode ser obtida de pepino, abóbora, repolho, alface, uva ou melão, outras enzimas também podem ser empregadas desta mesma maneira e uma delas é a *peroxidase* que pode ser obtida da abobrinha (*Cucurbita pepo*).

Dentro deste contexto algumas lacunas se abrem: usando associação de metais, para modificar um eletrodo, a sensibilidade do método pode ser melhorada? A inserção de alguma substância ou a alteração de alguma condição poderia melhorar a heterogeneidade da superfície do eletrodo modificado? Como a diluição e a armazenamento de amostras podem influenciar nos teores dos analitos ou como preservar a matriz de uma amostra? Como o teor de enzima específica em uma amostra pode interferir na quantificação do substrato?

Enfim, é neste contexto de questionamentos que os pesquisadores devem aproximar cada vez mais segmentos da ciência como a química analítica, microbiologia, botânica, terapêutica, farmácia e medicina nos estudos futuros.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Adhikari, B.; Majumdar, S.; *Prog. Polym. Sci.* **2004**, 29, 699.
2. Seiyama, T. *Chemical Sensor Technoogy*. Kodansha LTD: Tokyo, **1988**.
3. Fraden, J. *Handbook of Modern Sensors: physics, designs and applications*. 3th ed.; Spinger – Verlog: New York, **2003**.
4. Cattrall, R. W. *Chemical Sensors*, Oxford Science Publications: New York, **1997**.
5. Alfaya, A. A. S.; Kubota, L. T.; *Quím. Nova.* **2002**, 25, 835.
6. Janata, J.; Bezegh, A.; *Anal. Chem.* **1988**, 60, 62.
7. Strike, D. J.; Meijerink, M. G. H.; Houdelka-Help, M.; *Fresenius J. Anal. Chem.* **1999**, 6, 499.
8. Richter, E. M.; *Tese de Doutorado*; USP; São Paulo, **2004**.
9. Kozan, J. V. B.; *Tese de Doutorado*; USP; São Paulo, **2007**.
9. Brett, O. M.; *Eletroquímica: Princípios, Métodos e Aplicações*. Almeida: Coimbra, **1996**.
10. Mabott, G. A. *J. Chem. Educ.* **1983**, 62, 697.
11. Van Benschoten, J. J.; Lewis, J. Y.; Heineman, W. R.; Roston, D. A.; Kissinger, P. T.; *J. Chem. Educ.* **1983**, 62, 772.
12. Grosser, K. D.; *Cyclic Voltammetry: Simulation and analysis of Reaction Mechanisms*. New York: VHC Publishers, **1993**.
13. Kosan, J. V. B.; *Dissertação de Mestrado*; USP; São Paulo, **2007**.
14. Anson, F. C.; *Acc. Chem. Res.* **1975**, 8, 400.
15. Lane, R.F.; Hubbard, A. T.; *J. Phys. Chem.* **1973**, 77, 1411.
16. Lane, R. F.; Hubbard, A. T.; *J. Phys. Chem.* **1973**, 77, 1411.
17. Moses, P. R.; Wler, L.; Murray, R. W.; *Anal. Chem.* **1975**, 47, 1882.
18. Rocha, J. R. C., *Tese de Doutorado*; USP; São Paulo, **2006**.
19. Florou, A. B.; Prodromidis, M. I.; Karayannis, M. I.; Tzouwara-Karayannis, S. M.; *Talanta* **2000**, 52, 465.
20. Shankaran, D. R.; Narayanan, S. S.; *Sens. Actuators, B* **1999**, 55, 191.

21. Szymanska, I.; Radecka, H.; Radecka, J.; *Sens. Actuators, B* **2001**, 75, 95.
22. Casella, I. G.; Guascito, M. R.; Desimoni, E.; *Anal. Chim. Acta* **2000**, 409, 27.
23. Casella, I. G.; Contursi, M.; Desimoni, E.; *Analyst* **2002**, 27, 647.
24. Casero, E.; Pariente, F.; Lorenzo, E.; *Anal. Bioanal. Chem.* **2003**, 375, 294.
25. De Mattos, I. L.; Gorton, L.; Ruzgas, T.; *Biosens. Bioelectron* **2003**, 18, 193.
26. Hart, J. P.; Abass, A. K.; *Anal. Chim. Acta* **1997**, 342, 199.
27. Napier, A.; Hart, J. P.; *Electroanalysis* **1996**, 8, 1006.
28. Huang, X.; Kak, W. T.; *Anal. Chim. Acta* **1997**, 342, 199.
22. Derwinska, K.; Miecznikowski, K.; Koncki, R.; Kulesza, P. J.; Glab, S.; Malik, M. A.; *Eletroanalysis* **2003**, 15, 1843.
23. Ricci, F.; Amine, A.; Tuta, C. S.; Ciucu, A. A.; Lucaretti, F.; Palleschi, G.; Moscone, D.; *Anal. Chim. Acta* **2003**, 485, 111.
24. Kosmisky, L.; Bertotti, M.; *Eletroanalysis* **1999**, 11, 623.
31. Delbem, M. F.; Baader, W. J.; Serrano, S. H. P.; *Quím. Nova* **2002**, 25, 741.
25. Sotomayor, M. D.; Tanaka, A. A.; Kubota, L.T.; *Eletrochim. Acta* **2003**, 48, 249.
26. Mattos, I. L.; Gorton, L.; *Quím. Nova* **2001**, 24, 200.
27. Lehninger, A. L.; *Bioquímica*, Edgard Blucher: São Paulo; **1993**.
28. Marzzoco, A.; Torres, B. B. *Bioquímica Básica*, Guanabara Koogan: Rio de Janeiro , **2007**.
29. Voet, D.; Voet, J.G.; *In Biochemistry*; John Wiley & Sons: New York; **1995**.
30. Altun, G. D.; Cetinus, S. A.; *Food Chem.* **2007**, 100, 964.
32. Soares, C. M.; Castro, H. F.; Moraes, F. F.; Zanin, G. M.; *Appl. Biochem. Biotechnol.* **1999**, 77, 745.
33. Villeneuve, P.; Muderhwa, J. M.; Graille, J.; HOSS, M. J.; *J. Mol. Catal. B:Enzym.* **2000**, 9, 113.
34. Prashanth, K. V.; Kittur, R. N.; Tharanathan, R. N.; *Trends Food Sci. Technol.* **2007**, 18, 117.
35. Gandhi, N. N.; *J. Am. Oil Chem. Soc.* **1997**, 74, 621.

36. Cao, L.; Langen, L.; Sheldon, R.; *Curr. Opin. Biotechnol.* **2003**, *14*, 387.
37. Dalla-Vecchia, R.; Nascimento, M. G.; Soldi, V.; *Quím. Nova* **2004**, *4*, 27, 623.
38. Carta, G.; Gainer, J.L.; Benton, A. H.; *Biotechnol. Bioeng.* **1991**, *34*, 1004.
39. Basri, M.; Yunus, W. Md. Z. W.; Yoong, W. S.; Ampon, K.; Rasak, C. N.; Salleh, A. B.; *J. Chem. Biotechnol.* **1996**, *66*, 169.
40. Chibata, I. *Immobilized Enzymes*, Kodansha LTD: Tóquio, **1978**.
41. Bickerstaff, G. F. *Immobilization of Enzymes and Cells*, Humana Press: New Jersey, **1997**.
42. Tan, T.; Wang, F.; Zhang, H.; *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **2002**, *18*, 325.
43. Amorim, R. V. S.; Melo, E. S.; Carneiro-da-Cunha, M. G.; Ledingham, W. M.; Campos-Takaki, G. M.; *Bioresour. Technol.* **2003**, *89*, 35.
44. Stamatis, H.; Xenakis, A.; *J. Mol. Catal. B: Enzym.* **1999**, *6*, 399.
45. Cardoso, C. L.; Moraes, M. C.; Cass, Q. B.; *Quím. Nova* **2009**, *32*, 1, 175.
46. Mateo, C.; *Enzyme Microb. Technol.* **2007**, *40*, 1451.
47. Reis, B. F.; Giné, M. F.; Kronka, A. M.; *Quím. Nova* **1989**, *12*, 82.
48. Ruzicka, J.; Hansen, E. H.; Mosboæk, H.; *Anal. Chim. Acta*, **1977**, *92*, 135.
49. Miranda, C. E. S.; Carrilho, E.; Gervasio, A. P.; Giné, M. F.; *Quím. Nova* **2002**, *25*, 412.
50. Ruzicka, J.; Hansen, E. H.; *Flow Injection Analysis*, Wiley: Nova York, **1988**.
51. Pasquini, C.; de Faria, L. C.; *J. Autom. Chem.* **1991**, *13*, 143.
52. Ruzicka, J.; Hansen, E. H.; *Anal. Chim. Acta* **1978**, *99*, 37.
53. Den Boef, G.; *Anal. Chim. Acta* **1986**, *216*, 289.
54. Ruzicka, J.; *Anal. Chim. Acta* **1992**, *261*, 3.
55. Ruzicka, J.; *Analyst* **1994**, *119*, 1925.
56. Crane, E.; *O livro do mel*, Livraria Nobel: São Paulo, **1987**.
57. Aidar, D. S.; *Informativo Ambiental* **1997**, *6*, 1.
58. Rossi, N. F.; Martinelli, L. A.; Lacerda, T. H. M.; Camargo, P. B.; Victória, R. L.; *Cienc. Tecnol. Aliment.* **1999**, *19*, 1.

59. Cui, Z. W.; Sun, L. J.; Chen, W.; Sun, D. W.; *J. Food Eng.* **2008**, *84*, 1.
60. Jati, S. R.; *Ambiente, Gestão e Desenvolvimento* **2007**, *2*, 5.
61. Verissimo, M.T.L.; *Apicultura no Brasil* **1987**, *18*, 14.
62. Bognadov, S.; Martin, P.; Lullmann, C.; *Apidologie*, **1997**, *59*, 1.
63. <http://extranet.agricultura.gov.br/sislegisconsulta>, acesso em Set. 2009.
64. Pataca, L. C. M. Tese de doutorado, UNICAMP; Campinas; SP, **2006**.
65. Cruz, G. D.; *Ecologia e desenvolvimento* **2001**, *89*, 5.
66. Ferreira Neto, M.; Gheyi, H. R.; Holanda, J. S.; Medeiros, J. F.; Fernandes, P. D.; *Rev. Bras. Eng. Agric. Amb.* **2002**, *6*, 69.
67. www.agrocasa.com.br, acesso em Ago. 2010.
68. www.cpatca.embrapa.br, acesso em Ago. 2010.
69. Aragão, W. M.; Isberner, I. V.; Cruz, E. M. O; *Água-de-coco*, Embrapa CPATC/ Tabuleiros Costeiros: Aracaju, **2001**.
70. www.embrapa.br, acesso em Ago. 2010.
71. Ctenas, M. L. B.; Ctenas, A. C.; Quast; D. *Frutas das terras brasileiras*, C2: São Paulo, **2000**.
72. Pehowich, D. J.; Gomes, A. V.; Barnes, J. A; *West Indian Medical Journal* **2000**, *49*, 128.
73. Srebernick, S. M. Tese de Doutorado, UNICAMP; Campinas; SP, **1998**.
74. Carrijo, O. A.; Liz, R. S.; Makishima, N.; *Horticultura Brasileira* **2002**, *20*, 533.
75. Buller, R.E.; Steenmeijer, H.P.; Quinn, L.R. & Aronovich, S.; *Pesq. Agropec. Bras.* **1972**, *7*, 17.
76. Soest, V. P. J. *Nutritional ecology of the ruminant*, Cornell University Press Ithaca: New York, **1994**.
77. Norton, B. W. *Nutritional Limits to animal production from pastures*. Farham Royal: Commonwealth, **1982**.
78. Teixeira, J. C.; Andrade, G. U. *Carboidratos na alimentação de ruminantes*. In: II Simpósio de Forragicultura e Pastagens – NEFOR – UFLA. Lavras, **2001**, 89.
79. www.embrapa.br, acesso em Ago. **2010**.

80. Matsuura, F. C. A. U.; Rolim, R. B.; *Revista Brasileira de Friticultura* **2002**, *24*, 138.
81. Whitaker, J. R.; *Principles of Enzymology for the Food Science*, Marcel Dekker: New York, **1972**.
82. Cruz Filho, N. O. *Dissertação de Mestrado*; UFRJ: Rio de Janeiro, **2008**.
83. <http://www2.furg.br/projeto/portaldeembalagens/quatro/sucos>. Acesso em Set. 2010.
84. Pinheiro, A. M.; Fernandes, A. G.; Fai, A. E. C.; Prado, G. M.; Sousa, P. H. M.; Maia, G. A.; *Ciênc. Tecnol. Aliment.* **2006**, *26*, 98.
85. Soares, L. M. V.; Shishido, K.; Moraes, M.; Moreira, V. A.; *Ciênc. Tecnol. Aliment.* **2004**, *24*, 202.
86. Shils, M. E.; Olson, J. A.; Shike, M.; *Modern nutrition in health and disease*, Lea & Febiger; Philadelphia, **1994**.
87. Blenford, D. E.; *International Food Ingredients* **1996**, *3*, 20.
88. Miller, O.; Gonçalves, R. R., *Laboratório para o Clínico*; Atheneu; São Paulo: **1999**.
89. Henry, J. B. *Diagnósticos Clínicos e Tratamentos por métodos laboratoriais*. Manole: São Paulo: **1999**.
90. Matos, R.C.; Pedrotti, J.J.; Angnes, L.; *Anal. Chim. Acta* **2001**, *441*, 73.
91. Pedrotti, J. J.; Gutz, I. G. R.; Angnes, L.; *Electroanalysis* **1996**, *8*, 673.
92. Budavari, S.; O'Neil, M. J.; Smith, A., Heckelman, P. E, *The Merck Index*, Merck & CO: New York, **1989**.
93. Church, D. C.; *A Reston Book*: New York, **1988**.
94. Junior Francisco, W. E.; *Quím. Nova* **2008**, *29*, 1.
95. Gross, J. L.; Silveiro, S. P.; Camargo, L. J.; Reichelt, A. J.; Azevedo, M. J.; *Arq. Bras. Endocrinol. Metab.* **2002**, *46*, 1.
96. Silva, A. R. *Dissertação de Mestrado*. São Paulo, USP, **2010**.
97. Whitaker, J. R.; Voragen, A. G. J.; Wong, D. W. S.; *Handbook of food enzymology*. Marcel Dekker: New York, **2002**.
98. Tomotani, E. J.; Neves, L. C. M.; Vitolo, M.; *Appl. Biochem. Biotechnol.* **2005**, *121*, 149.

99. Peralta, M. R.; Marques, S. F.; Bôer, C. G. *Enzimas como agentes tecnológicos*. Legis Summa: São Paulo, **2004**.
100. Vasileva, N. Godjevargova, T.; *J. Membr. Sci.* **2004**, 239,157.
101. Raba, J.; Mottola, H. A.; *Crit. Rev. Anal. Chem.* **1995**, 25,1.
102. Crueger, A.; Crueger, W.; *Microbial enzymes and biotechnology*. Elsevier Applied Science: London, **1990**.
103. Fang, M.; Grant, P. S.; McShane, M. J.; Lvov, Y. M.; *Langmuir* **2002**, 18, 6338.
104. Isik, S.; Alkan, S.; Toppare, L.; Cianga, I.; *Eur. Polym. J.* **2003**, 39, 2375.
105. Zhao, H.; Zhang, X.; Zhou, X.; Li, Z.; *Enzyme Microb. Technol.* **2002**, 30, 843.
106. Giorno, L.; Drioli, E.; *Trends Biotechnol.* **2000**, 18, 339.
107. Nakao, K.; Kiefner, A.; Furumoto, K.; Harada, T.; *Chem. Eng. Sci.* **1997**, 52, 4127.
108. Yoshimoto, M.; Wang, S.; Furkunaga, K.; Walde, P.; Nakao, K.; *Biotechnol. Bioeng.* **2003**, 81, 695.
109. Neves, L. C. M.; Vitolo, M.; *Appl. Biochem. Biotechnol.* **2007**, 136, 16.
110. Tomotani, E. J.; Vitolo, M.; *Enzyme Microb. Technol.* **2007**, 40, 1020.
111. Orsonneau, J.L.; Meflah, K.; Lustenberger P.; Cornu,G.; Bernard, S.; *Clin. Chim. Acta* **1982**, 125, 185.
112. Fujita, Y.; Mori, I.; Toyoda, M.; Matsuo, T.; *Anal. Sci.* **1994**, 10, 827.
113. Wilson, R.; *Anal. Lett.* **1991**, 24, 1983.
114. Barrado, E.; Vela, M.H.; Lapa, R.A.S.; Lima, J.L.F.C.; *Analysis* **1999**, 27, 170.
115. Somasundrun, M.; Kirtikara, K.; Tanticharoom, M.; *Anal. Chim. Acta* **1996**, 319, 59.
116. Gutz, I.G.R.; Klockow, D.; *Fresenius Z. Anal. Chem.* **1989**, 335, 919.
117. Guibault, G.G.; Lubrano, G.L.; *Anal. Chim. Acta* **1973**, 64, 439.
118. Franchini, R.A.A.; de Souza, C.F.; Colombara, R.; Matos, M.A.C.; Matos, R.C.; *J. Agric. Food Chem.* **2007**, 55, 6885.
119. Matos, R.C.; Coelho, E. O.; De Souza, C.F.; Guedes, F.A.; Matos, M.A.C.; *Talanta* **2006**, 69, 1208.

120. Manzoori, J.L.; Amjadi, M.; Orooji, M.; *Anal. Sci.* **2006**, *22*, 1201.
121. Schubert, F.; Wang, F.; Rinnerberg, H.; *Anal. Chim. Acta* **1995**, *1*, 41.
122. Marshall, R.W.; Gibson, T.D.; *Anal. Chim. Acta* **1992**, *266*, 309.
123. Spohn, U.; Preuschoff, F.; Blankenstein, G.; Janasek, D.; Kula, M.R.; Hacker, A.; *Anal. Chim. Acta* **1995**, *303*, 109.
124. Jager, A. V.; Tonin, F. G.; Tavares, M. F. M.; *Journal of Separation Science*, **2007**, *30*, 586.
125. Gomez, B. J. A.; Garcia, V. R. J.; Elvira G. S.; González, P. A. M.; *Chromatogr.* **1999**, *50*, 461.
126. Chitindingu, K.; Ndhlala, A. R.; Chapano, C.; Benhura, M.A.; Muchuweti, M.; *J. Food Biochem.* **2006**, *31*, 206.
127. Tuberoso, C. I. G.; Kowalczyk, A.; Sarritzu, E.; Cabras, P.; *Food Chem.* **2007**, *103*, 1494.
128. Deba, F.; Xuan, T. D.; Yasuda, M.; Tawata, S.; *Weed Biology and Management* **2007**, *7*, 77.
129. Dornelas, R. Dissertação de mestrado, UFJF, Juiz de Fora, **2009**.
130. CALLEGARI-JACQUES, Sídia M.; *Bioestatística: princípios e aplicações*, Artmed: Porto Alegre, 2003.
131. Butler, A. R.; Gash, R.; *Education in chemistry* **1993**, *9*, 122.
132. Fiorucci, A. R.; Soares, M. H. F. B.; Cavalheiro, E. T. G.; *Quím. Nova na Escola* **2003**, *17*, 1.
133. Davies, M.B.; Austin, J. e Partridge, D.A. *Vitamin C: in chemistry and biochemistry*. Royal Society of Chemistry: Cambridge, **1991**.
134. Schanderl, S.H. Vitamin assay. In: *Methods in food analysis: physical, chemical and instrumental methods of analysis*, Nova Iorque: Academic Press, **1970**.
135. Frias, J. M.; Oliveira, J. C.; Cunha, L. M.; Oliveira, F. A., *J. Food Eng.* **1998**, *38*, 69.
136. Sedas, V. T. P.; Kubiak, K. N. W.; Alvarado, M. A. G.; *Int. J. Food Sci. Technol* **1994**, *28*, 551.
137. Yamashita, F.; Benassi, M. T.; Kieckbush, T. G.; *Braz. J. Food Technol.* **1999**, *2*, 127.

138. Zanoni, B.; Peri, C.; Nani, R.; Lavelli, V.; *Food Research International* **1999**, *31*, 395.
139. Andrade, R.S.G.; Diniz, M.C.T.; Neves, E.A.; Nóbrega, J.A.; *Eclet. Quím.* **2002**, *27*, 1.
140. Fraga, C. G.; Motchnik, P. A.; Shigenaga, M. K.; Helbock, H. J.; Jacon, R. A.; Ames, B. N; *Proceeding of the National Academy of Science of the United States of America* **1991**, *88*, 11003.
141. Rosa, J.S.; Godoy, R. L. O.; Oiano Neto, J. e Campos, R. S.; *Ciênc. Tecnol. Aliment.* **2007**, *27*, 4, 837.
142. Whitaker, J. R.; *Principles of Enzymology for the Food Sciences*; Marcel Dekker; New York, **1972**
143. Diniz, M. C. T.; *Dissertação de Mestrado*; UFSCar; São Carlos; SP, **1998**.
144. Broek, A. V. D.; *International Food Ingredients* **1993**, *1/2*, 4.
145. Nóbrega, J. A.; Lopes, G. S.; *Talanta* **1996**, *43*, 971.
146. Alexander, P. W.; Marpaung, H.; *Talanta* **1982**, *29*, 213.
147. Cai, X.; Kalcher, K.; Neuhold, C.; Ogorevc, B.; *Fresenius Journal of Analytical Chemistry* **1994**, *348*, 660.
148. Chung, H. K.; Ingler JR.; J. D.; *Anal. Chim. Acta* **1991**, *243*, 89.
149. Matos, R. C.; Augelli, M. A.; Pedrotti, J. J.; Lago, C. L.; Angnes, L. *Electroanalysis* **1998**, *10*, 887.
150. Leubolt, R.; Klein, H.; *J. Chromatogr.*, **1993**, *640*, 271.
151. Sultan, S. M.; *Talanta* **1993**, *40*, 593.
152. Ferreira, S. L. C.; Bandeira, M. L. S. F.; Lemos, V. A.; Santos, H. C., Costa, A. C. S.; Jesus, D. S.; *Fresenius J. Anal. Chem.* **1997**, *357*, 1174.
153. Matos, R. C.; Augelli, M. A.; Lago, C. L.; Angnes, L.; *Anal. Chim. Acta* **2000**, *404*, 151.
154. Kulys, J.; Dcosta, E. J.; *Anal. Chim. Acta* **1991**, *243*, 173.
155. Doherty, A. P.; Stanley, M. A.; Vos, J. G.; *Analyst* **1995**, *120*, 2371.
156. Li, J. Z.; Hu, M.; Yu, R. Q.; *Sens. Actuators, B* **1996**, *30*, 65.
157. Pournaghi-Azar, M. H.; Razmi-Nerbin, H.; *J. Eletroanal. Chem.* **1998**, *456*, 83.

158. Shankaran, D. R.; Narayanan, S. S.; *Fresenius Journal of Analytical Chemistry*, **1999**, 364, 686.
159. Cai, C. X.; Xue, K. H.; Xu, S. M.; *J. Eletroanal. Chem.* **2000**, 486, 111.
160. Turkusic, E.; Milicevic, V.; Tahmiscija, H.; Vehabovic, M.; Basic, S.; Amidzic, V. *Fresenius Journal of Analytical Chemistry* **2000**, 368, 466.
161. Bradshaw, M. P.; Prenzler, P. D.; Scollary, G. R.; *Electroanalysis* **2002**, 14, 546.
162. Roy, P. R.; Saha, M. S.; Okajima, T.; Ohsaka, T.; *Electroanalysis* **2004**, 16, 289.
163. Pauliukaite, R.; Ghica, M. E.; Brett, C. M. A.; *Anal. Bioanal. Chem.* **2005**, 381, 972.
164. Fang, B.; Jiao, S. F.; Li, M. G.; Tao, H. S.; *Anal. Bioanal. Chem.* **2006**, 386, 2117.
165. Lin, X. Q.; Li, Y. X.; *Electrochim. Acta* **2006**, 51, 26, 5794.
166. Brett, C. M. A.; Brett, A. M. O.; Serrano, S. H. P.; *J. Eletroanal. Chem.* **1994**, 366, 1, 225.
167. Paixão, T. R. L. C. *Tese de Doutorado*, USP; São Paulo; SP, **2007**.
168. Strochkova, E. M.; Turyan, Y. I.; Kuselman, I., Shenhar, A.; *Talanta* **1997**, 44, 1923.
169. Chen, Z. F.; Zu, Y. B.; *J. Eletroanal. Chem.* **2007**, 603, 281.
170. Zare, H. R.; Nasirizadeh, N.; Ardakani, M. M.; *J. Eletroanal. Chem.* **2005**, 577, 25.
171. Salimi, A.; Mamkhezri, H.; Hallaj, R.; *Talanta* **2006**, 70, 823.
172. Khoo, S. B.; Chen, F.; *Anal. Chem.* **2002**, 74, 5734.
173. Lin, X. Q.; Jin, G. P.; *Electrochim. Acta* **2005**, 50, 16, 3210.
174. Turner, A. P. F.; Karube, I.; Wilson, G. S.; *Biosensors: Fundamentals and Applications*, Oxford University Press; New York, **1987**.
175. Signori, C. A.; Fatibello-Filho, O.; *Quim. Nova* **1994**, 17, 38.
176. Carvalho, J.; Lima, L. B.; Medeiros, C. J.; *Phytochemistry* **1981**, 20, 2423.
177. García-Pineda, E.; Castro-Mercado, E.; Lozoya-Gloria, E.; *Plant Sci.* **2004**, 166, 237.

178. Kato, N.; Esaka, M.; *Planta* **2000**, *210*, 1018.
179. Sabtagostini, L.; Gullotti, M.; Gioia, L.; Fantucci, P.; Franzini, E.; Marchesini, E.; Caselha, L.; *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **2004**, *36*, 881.
180. Said, S.; Pietro, R. C. L. R. *Enzimas como agentes biotecnológicos*. Ligis Summa: Ribeirão Preto, **2004**.
181. Gupta, S.; Mutherjee, A.; Nethaji, M.; Chakravarty, A. R.; *Polyhedron* **2004**, *23*, 643.
182. Messerschmidt, A.; Ladenstein, R.; Huber, R.; Bolognesi, M.; Avigliano, L.; Petruzzelli, R.; Rossi, A.; Finazzi-Agró, A.; *J. Mol. Biol.* **1992**, *224*, 179.
183. Sugino, M.; Kajita, S.; Banno, K.; Shirai, T.; Yamane, T.; Kato, M.; Kobayashi, T.; Tsukagoshi, N.; *Biochim. Biophys. Acta* **2002**, *1536*, 36.
184. Di Venere, A.; Mei, G.; Gilardi, G.; Rosato, N.; De Matteis, F.; McKay, R.; Gratton, E.; *A. Eur. J. B.* **1998**, *257*, 337.
185. www.rcsb.org/pdb. Acessado em 09/09/2010.
186. Maritano, S.; Kohzuma, T.; Suzuki, S.; Maechesini, A.; *Phytochem.* **1996**, *41*, 349.
187. Casella, L.; Monzani, E.; Santagosstini, L.; Gioia, L.; Gullotti, M.; Fantucci, P.; Beringhelli, T.; Marchesini, A.; *Coord. Chem. Rev.* **1999**, *185*, 619.
188. Matsumoto, K.; Yamada, K.; Osajima, Y.; *Anal. Chem.* **1981**, *53*, 1974.
189. Marques, E. T. A.; Lima, J. L.; *Appl. Biochem. Biotechnol.* **1992**, *32*, 73.
190. Marques, I. D. H. C.; Marques, E. T. A.; Silva, A. C.; Ledinghan, W. M., Melo; E. H. M. Silva; V. L.; Lima, J. L.; *Appl. Biochem. Biotechnol.* **1994**, *44*, 81.
191. Uchiyama, S.; Tofuku, Y.; Suzuki, S.; *Anal. Chim. Acta* **1988**, *208*, 291.
192. Uchiyama, S.; Umetsu, Y.; *Anal. Chim. Acta* **1991**, *225*, 53.
193. Jenzano, J. W.; Hogan, S. L.; Noyes, C. M.; Featherstone, G. L.; Lundblad, R. L.; *Anal. Biochem.* **1986**, *159*, 370.
194. Zaia, D. A. M.; Zaia, C. T. B. V.; Lichtig, J.; *Quim. Nova* **1998**, *21*, 6.
195. Tomita, N.; Manzoli, A.; Fertoni, F. L.; Yamanak, H.; *Eclética Química* **2005**, *30*, 2.
196. Berg, J. M.; Tymoczko, J. L.; Stryer, L. *Biochemistry*, W. H. Freeman: New York, **2002**.

197. Smith, R. C.; Gore, J. Z.; Mckee, M.; Hargis, H.; *Microchem. J.* **38**, 118, 1988.
198. Cai, X.; Kalcher, K.; Neuhold, C.; Ogorevc, B.; *Talanta* **1994**, *44*, 407.
199. Kim, K. Y.; Schumacher, H. R.; Hunsche, E.; Wetheimer, A. I.; Kong, S. X.; *Clinical Therapeutics* **2003**, *25*, 1593.
200. Shout, J. T.; Caskey, C.; *Trends Genet.* **1998**, *4*, 175.
201. Yamamoto, T.; Moriwaki, Y.; Takahashi, S.; *Clin. Chim. Acta* **2005**, *356*, 35.
202. Iob, A.; Mottola, H. A.; *Anal. Chem.* **1980**, *52*, 2332.
203. Kawashima, T.; Rechnitz, G. A.; *Anal. Chim. Acta* **1976**, *83*, 9.
204. Feichtmeier, T. V.; Wrenn, H. T.; *American Journal of Clinical Pathology* **1955**, *25*, 833.
205. Hausen, A.; Fuchs, D.; Koing, K.; Wacther, H.; *Clin. Chem.* **1981**, *27*, 1455.
206. Nicell, J. A.; Wright, H.; *Enzyme Microb. Technol.* **1997**, *21*, 302.
207. Oliveira, A. C.; *Anal. Chim. Acta* **2005**, *535*, 213.
208. Rocha, D. L. *Dissertação de Mestrado*, USP; São Paulo; SP, **2009**.
209. Garcia, M. B. Q.; Lima, J. L. F. C.; Silva, M. L.; Sousa, J. P.; *Portugaliae ELetrochimica Acta* **2004**, *22*, 249.
210. Silva, M. L. S.; Garcia, M. B. Q.; Lima, J. L. F. C.; Santos, J. L. M.; Barrado, E. ; *Eletroanalysis* **2005**, *23*, 2156.
211. Pileggi, V. J.; Giorgio, J. D.; Wybenga, D. R. *Clin. Chim. Acta*, **1972**, *37*, 141.
212. Araújo, A. N.; Catita, J. A. M.; Lima, J. L. F. C.; *Anal. Sci.* **1972**, *14*, 809.
213. Yamaguchi, T. Hasegawa, K. Kamino, S.; Miyachi, K.; Tominaga, H.; Fujita, Y. *Anal. Sci.* **2007**, *23*, 223.
214. Kuwabata, S.; Nakaminami, T.; Ito, S. I.; Yoneyama, H.; *Sens. Actuatores, B.* **1998**, *52*, 72.
215. Miland, E.; Oridiers, A. J. M.; Blanco, P. T.; Smith, M. R.; Fagain, C. O.; *Talanta* **1996**, *43*, 785.
216. Hoshi, T.; Saiki, H.; Anzai, J. I.; *Talanta* **2003**, *61*, 363.
217. Penido, M. G. M. G.; Diniz, J. S. S.; Guimarães, M. M. M.; Cardoso, R. B.; Souto, M. F. O.; Penido, M. G.; *Jornal de Pediatria* **2002**, *72*, 2.