

"Este exemplar corresponde a redação final da Tese de Mestrado Defendida por Roberto Matsukura e Aprovada pela Comissão Julgadora".

Campinas, 22/06/92

Gliséria Neto
Graciliano de Oliveira Neto

ESTUDOS SOBRE A IMOBILIZAÇÃO QUÍMICA
E ELETROQUÍMICA DA
GLICOSE OXIDASE

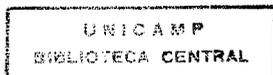
ROBERTO MATSUKURA ^{n 429}

TESE DE MESTRADO

ORIENTADOR : PROF. DR. GRACILIANO DE OLIVEIRA NETO ^t

CAMPINAS - 1992

i



Aos meus pais.

*Ao Prof. Dr. Graciliano de Oliveira Neto, pela
amizade, compreensão e orientação segura
ao longo da realização deste
trabalho.*

AGRADECIMENTOS

Aos Professores Drs. Luiz Manoel Aleixo e Oswaldo E. S. Godinho, pelas valiosas discussões.

Ao Sr. Kenji Hata pela doação das membranas de colágeno.

Ao Professor João O. Tognolli, pelo incentivo.

Ao Professor João R. Fernandes, por valiosas sugestões na redação desta tese.

Aos amigos do laboratório, pela alegria e amizade.

Ao Laurindo pela presteza na reprodução e encadernação da tese.

Ao Instituto de Química da Unicamp, pela oportunidade de realização deste trabalho.

A CNPQ pelo apoio financeiro.

RESUMO

No presente trabalho estudou-se a imobilização eletroquímica da enzima glicose oxidase, E.C. 1.1.3.4. (GOD), em filme de polipirrol (polímero condutor) no eletrodo de platina. O filme de polipirrol (PPI) foi obtido eletroquimicamente em solução aquosa de pirrol 0,1 M e KCl 1,0 M, aplicando-se potencial constante de 990 mV durante uma hora. Em seguida, imobilizou-se a GOD 46 U/ml, à potencial constante de 640 mV durante uma hora, em solução de tampão fosfato 0,1 M, pH 6,88. Verificou-se aumento da corrente, com potencial de pico em 350 mV, após adição de 50 mM de glicose, evidenciando a transferência de elétrons do grupo prostético flavina adenina dinucleotídeo (FAD) da enzima para o eletrodo modificado.

Empregou-se outro método de imobilização da GOD, através da reação química com glutaraldeído em membrana de colágeno. Esta foi acoplada no eletrodo de oxigênio de duas maneiras : membrana na superfície do sensor e lateralmente ao sensor. As melhores condições encontradas para utilização deste eletrodo foram : Temperatura $28,0 \pm 0,1$ °C; pH de 6,84 a 7,14; faixa linear de concentração de glicose $8,0 \times 10^{-5}$ a $1,0 \times 10^{-3}$ M. A estabilidade é comparável à dos eletrodos comerciais, possibilitando 320 análises. Dos principais açúcares associados apenas manose interfere a partir de quantidade 2,5 vezes à da glicose.

Análises de amostras de café solúvel com o eletrodo contendo a enzima imobilizada lateralmente, apresentaram resultados comparáveis aos obtidos pelo método da AOAC; coeficiente de correlação 0,9940 e a equação $Y = 0,3674 + 0,9461 X$.

ABSTRACT

In this work the electrochemical immobilisation of β -D-glucose oxidoreductase enzyme on a polypyrrole film platinum electrode was studied. The polypyrrole film was prepared by electrochemical polymerisation of 0,1 M pyrrole in an aqueous solution containing 0,1 M KCl, applying a constant potential of 990 mV, during one hour. Next the enzyme film was potentiostatically immobilized at 640 mV, from the solution of glucose oxidase 46 U/ml buffered at pH 6,88 with 0,1 M phosphate. After 50 mM glucose addition there is an increase in the current with peak potential at 350 mV, evidencing electron transfer from the enzyme prosthetic flavin adenine dinucleotide group to the modified electrode.

Another immobilisation method was used through a glutaraldehyde chemical reaction on collagen membrane. It was coupled on the oxygen electrode in two different ways : with the membrane on the surface of the sensor or by its side. The best conditions for utilisation of this electrode were found to be : $28,0 \pm 0,1^{\circ}\text{C}$; pH 6,84 - 7,14; the linear response in the glucose concentration range of $8,0 \times 10^{-5}$ - $1,0 \times 10^{-3}$ M. The electrode stability is comparable to the commercial available one, allowing 320 analysis. From among the possible interferences, only mannose is important when present in concentration 2,5 plus the glucose.

Samples of instant coffee were analysed and the results obtained by the proposed method and by the established AOAC method correlated well ($r = 0,9940$)

INDICE

	Página
<u>INTRODUÇÃO</u>	1

<u>CONSIDERACOES TEORICAS</u>	4
-------------------------------------	---

Capítulo I

Propriedades da Catálise Enzimática

<u>I.A. Introdução</u>	4
<u>I.B. Unidade de Atividade Enzimática</u>	5
<u>I.C. Princípios da Cinética Enzimática</u>	5
<u>I.D. Fatores que Afetam a Reação Enzimática</u>	10
<u>I.D.1. Efeito da Concentração do substrato</u>	10
<u>I.D.2. Efeito da Concentração de Enzima</u>	12

<u>I. D. 3. Efeito de Ativadores</u>	12
<u>I. D. 4. Efeito de Inibidores</u>	13
<u>I. D. 5. Efeito da Temperatura</u>	14
<u>I. D. 6. Efeito do pH</u>	14
<u>I. D. 7. Cofatores Enzimáticos</u>	15

Capítulo II

Imobilização de Enzimas

<u>II. A. Introdução</u>	16
<u>II. B. Ligação Covalente Cruzada : Reagentes Bifuncionais</u>	17
<u>II. C. Ligação Covalente em Matrizes Insolúveis</u>	18
<u>II. D. Imobilização Eletroquímica</u>	20

<u>II.D.1. Técnicas Eletroquímicas nos Estudos de</u> <u>Enzimas Imobilizadas.....</u>	21
<u>II.D.1.A. Introdução</u>	21
<u>II.D.1.B. Voltametria Cíclica</u>	23

Capítulo III

Eletrodo Enzimático para Glicose

<u>III.A. Introdução</u>	26
<u>III.B. Eletrodo Amperométrico para Oxigênio</u>	28

RESULTADOS EXPERIMENTAIS 30

Capítulo IV

Imobilização Eletroquímica da glicose oxidase
em Eletrodo Modificado com Polipirrol

IV. A. Introdução 30

IV. B. Modificação do Eletrodo de Platina com
Polipirrol (PPI) 31

IV. C. Voltametria Cíclica com Eletrodo Modificado PPI
e a glicose oxidase 31

IV. D. Imobilização Eletroquímica da glicose oxidase 36

IV. E. Voltametria Cíclica da glicose oxidase
com a β -D Glicose 36

<u>VI. E.1. Voltametria Cíclica com Eletrodo Modificado PPI</u>	
<u>Sistema Glicose oxidase Solúvel e β-D Glicose</u>	37
<u>IV. E.2. Voltametria Cíclica com Eletrodo Modificado PPI</u>	
<u>Sistema glicose oxidase Eletroimobilizada e</u>	
<u>β-D Glicose</u>	37
<u>IV.F. Conclusões</u>	40

Capítulo V

Imobilização Química da glicose oxidase
em Membrana de Colágeno

<u>V.A. Introdução</u>	42
<u>V.B. Imobilização da glicose oxidase em</u>	
<u>Membrana de Colágeno</u>	42
<u>V.C. Montagem do Eletrodo Enzimático</u>	43

V.D. Conclusões 48

Capítulo VI

Avaliação do Eletrodo com a glicose oxidase

Imobilizada Quimicamente

VI.A. Introdução 51

VI.B. Efeito da Temperatura 51

VI.C. Efeito do pH 52

VI.D. Efeito da Concentração de Glicose 55

VI.D.1. Determinação da Constante de Michaelis-Menten 55

VI.D.2. Curva de Calibração 56

VI.E. Estabilidade 59

VI.F. Estudo de Interferentes 61

VI.G. Conclusões 63

Capítulo VII

Aplicação do Eletrodo Enzimático

Determinação de Glicose em Café Solúvel

VII.A. Introdução..... 68

VII.A.1. Importância da Análise 68

VII.A.2. Procedimento Analítico

-Resultados e Discussões 70

DETALHES EXPERIMENTAIS E MATERIAIS.....	79
A. <u>Equipamentos</u>	79
B. <u>Eletrodos</u>	79
C. <u>Reagentes</u>	79
D. <u>Materiais</u>	80
<u>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</u>	81

INTRODUÇÃO

Nas últimas duas décadas o desenvolvimento e aplicação de biossensores em análises, tornou-se uma das áreas mais excitantes na pesquisa em química analítica [1, 2]. Eles são sensores que associam um componente biológico ativo a um transdutor.

Geralmente, escolhem-se dispositivos eletroquímicos para desenvolvimento daqueles sensores, devido à simplicidade de obtenção de leitura elétrica direta e aos grandes avanços na tecnologia de circuitos integrados. Embora inicialmente tenham sido usados apenas enzimas, atualmente, novos conceitos utilizam microrganismos, tecidos vegetais e animais, antígeno e anticorpos [3, 4, 50].

Em todos os casos, o objetivo é sempre monitorar um sinal de diferença de potencial ou intensidade de corrente, diretamente ou indiretamente proporcional à concentração de um analito, medindo o consumo de um dos reagentes ou a formação de um produto.

Clark e Lyons [5] foram os primeiros a introduzirem o conceito de eletrodo enzimático, mas o primeiro trabalho com este tipo de eletrodo foi descrito por Updike e Hicks [6] na década de 70 quando usaram a glicose oxidase imobilizada em gel no eletrodo polarográfico para oxigênio, na análise de glicose em amostras biológicas.

É importante se conhecer as características da enzima e da

reação que cataliza, para a escolha do tipo de imobilização e do eletrodo base.

Existem comercialmente vários tipos de eletrodos ion seletivos e de oxido-redução, que podem ser usados na construção dos eletrodos enzimáticos. Como: 1- eletrodo de vidro, para H^+ e de cátions monovalentes; 2- eletrodos de gás como NH_3 , CO_2 e O_2 ; 3- eletrodos sólidos e membrana líquida como os de NH_4^+ , S^{2-} , CN^- e I^- ; e 4- eletrodo de platina, e recentemente a utilização de eletrodos metálicos, eletrodos de pasta de carbono e eletrodos modificados com polímero condutor.

A variedade de eletrodos aliada à disponibilidade de obtenção de enzimas com alto grau de pureza, permitem hoje a determinação de inúmeras substâncias orgânicas de modo simples, rápido e preciso (tabela 1).

Um dos eletrodos enzimáticos mais utilizados atualmente nos Estados Unidos e Europa é o de glicose, não só pela importância dessa determinação em análises clínicas, bromatológicas, como também, em processos industriais de fermentação alcóolica. Foi com esses fatos em mente que se decidiu estudar o desenvolvimento e construção de um eletrodo de glicose.

Para facilitar o entendimento deste trabalho aos não familiarizados com o assunto, resolveu-se detalhar os parâmetros fundamentais relativos à uma reação e imobilização enzimática, para emprego analítico.

Tabela 1- Principais eletrodos enzimáticos disponíveis comercialmente [7].

Tipo	Enzima	Sensor
Glicose	Glicose oxidase E. C. 1.1.3.4.	$PL(H_2O_2)$ I, O_2
Uréia	Urease E. C. 3.5.1.5	NH_3 , NH_4
Acido Úrico	Uricase E. C. 1.7.3.3	O_2
Alcool	Alcool oxidase E. C. 1.1.3.13	O_2
L Tirosina	Tirosina descarboxilase E. C. 4.1.1.25.	CO_2
Oxalato	Oxalato oxidase E. C. 1.2.3.4	O_2
Salicilato	Salicilato hidroxilase E. C. 1.14.13.1	O_2
Creatina	Creatinase E. C. 3.5.4.21	NH_3
Ascorbato	Ascorbato oxidase E. C. 1.10.3.3	O_2
L Lisina	Lisina descarboxilase E. C. 4.1.1.18	CO_2
Sacarose	Invertase/Mutarotase/ Glicose oxidase E. C. 3.2.1.26/5.1.3.3/1.1.3.4	$PL(H_2O_2)$
Lactato	Lactato desidrogenase E. C. 1.1.2.3	O_2
Penicilina	Penicilinase E. C. 3.5.3.6	$C(NADH)$

CONSIDERAÇÕES TEÓRICAS

CAPÍTULO I

Propriedades da Catálise Enzimática

I.A. Introdução

As enzimas são catalisadores químicos de origem biológica, sintetizadas pelos organismos vivos que, aceleram uma multiplicidade de reações envolvidas nas atividades metabólicas fundamentais das células [8].

Todas as enzimas são proteínas, não havendo exceção. Estas são macromoléculas de alta massa molecular, que têm pelo menos uma conformação tridimensional em que são estáveis em condições biológicas de temperatura e pH, pois uma pequena modificação nas estruturas conformacionais (por fatores físicos ou químicos) pode provocar diminuição e até uma perda da atividade; fenômeno denominado de desnaturação da enzima.

Entre os conceitos básicos da cinética enzimática encontram-se: atividade enzimática, K_m (constante de

Michaelis-Menten), cofatores enzimáticos e os fatores que influenciam a atividade enzimática.

I.B. Unidade de Atividade Enzimática

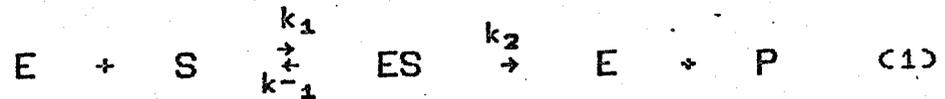
Adotada pela IUPAC e International Union of Biochemistry Commissions on Enzymes, "a unidade de atividade enzimática (U) é definida como a quantidade que catalisa a transformação de 1μ mol de substrato por minuto, em condições definidas de temperatura, pH e concentração [9]."

I.C. Princípios da Cinética Enzimática

A atividade catalítica da enzima é uma função da concentração do substrato (S), mantendo-se constantes: pH, temperatura, concentração de enzima e de cofator. Aumentando-se a concentração do substrato, a velocidade aumenta, a partir de uma determinada concentração alcança-se um máximo de velocidade (V_{max}), além da qual não se obtém variação, mesmo que se aumente a concentração do substrato.

A teoria de Michaelis-Menten [8, 9], é fundamental para a análise quantitativa em todos os aspectos da cinética enzimática e também de inibição, sendo melhor desenvolvida para o caso simples de reação envolvendo apenas um substrato.

Considerando-se que a enzima E se combina primeiramente com o substrato S para formar o complexo enzima-substrato ES; este rompe, liberando o produto P e a enzima livre E :



Fazendo-se considerações cinéticas adequadas, a constante de Michaelis-Menten (K_m) é definida pela expressão:

$$K_m = \frac{k_2 + k_{-1}}{k_1} \quad (2)$$

Assumindo-se que V_{max} seja a velocidade máxima quando os sítios ativos da enzima estão saturados, tem-se $V_{max} = k_2 [E]$ (figura 1); quando $[E] = [ES]$ resulta na equação de velocidade para a reação enzimática com um substrato :

$$V_o = \frac{V_{max} [S]}{[S] + K_m} \quad (3)$$

V_o = Velocidade inicial.

Quando $V_o = 1/2 V_{max}$ (figura 1) então $K_m = [S]$

O K_m é uma característica da enzima para o substrato, sua grandeza indica o grau de afinidade da enzima para o substrato. Pode-se determinar o K_m experimentalmente pela construção de um gráfico V vs $[S]$ (figura 1), porém um pequeno erro na concentração do substrato acarreta um erro grande no valor da constante. Existe ainda a dúvida se a V_{max} foi atingida, por que há casos em que poderá ocorrer inibição, até que a V_{max} seja atingida.

Para determinações experimentais de K_m com maior precisão, usa-se a equação de Michaelis-Menten transformada, que lineariza a curva de velocidade. Como a equação de Lineweaver-Burk [8 - 10] (figura 2) :

$$\frac{1}{V_o} = \frac{K_m}{V_{max}} \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{max}} \quad (4)$$

Também com a mesma finalidade são as de Eadie-Hofstee e Hanes.

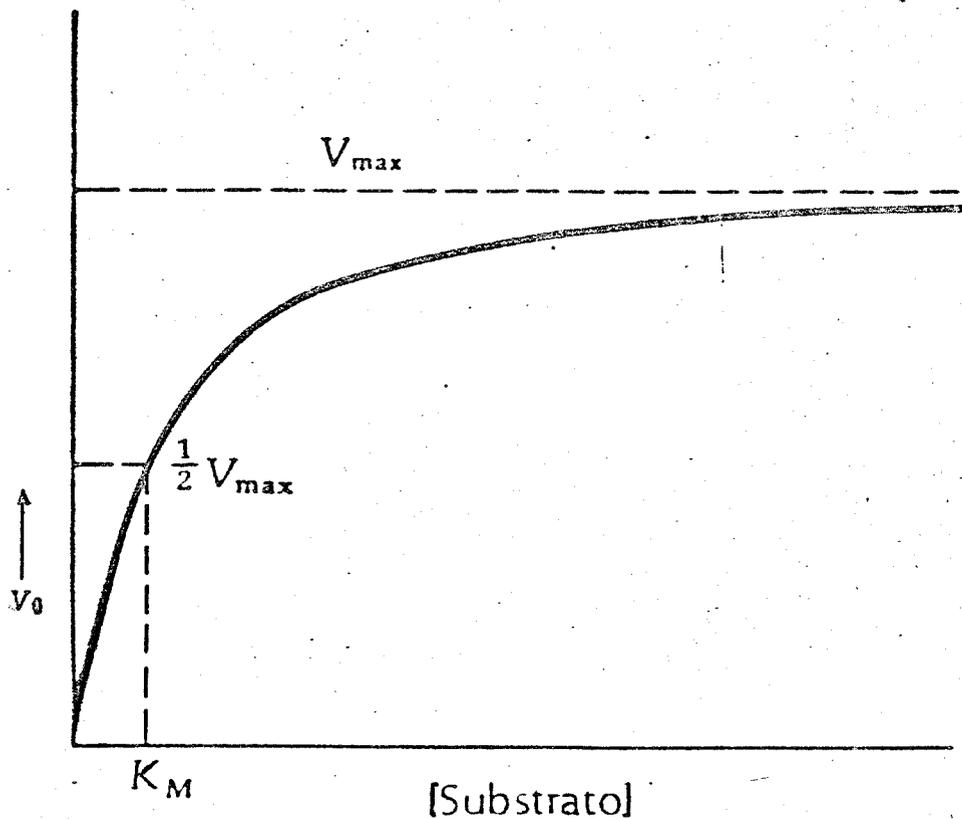


Figura 1- Cinética enzimática. Velocidade de reação em função da concentração de substrato S, até atingir V_{max} [9].

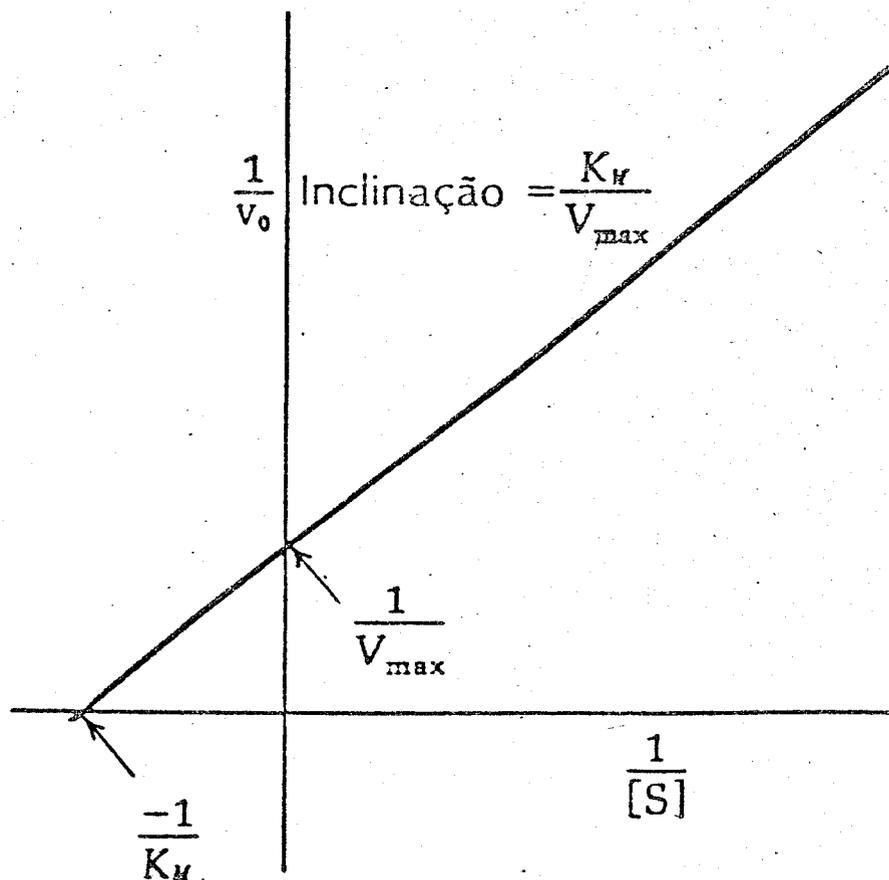


Figura 2- Gráfico característico da equação de Lineweaver-Burk, para obtenção de K_m e V_{\max} [9].

I.D. Fatores que Afetam a Reação Enzimática

I.D. 1. Efeito da Concentração do substrato

No gráfico concentração de substrato versus velocidade inicial a curva apresentada é uma hipérbole retangular (figura 1). Em uma baixa concentração de substrato na qual $S \leq 0,1 K_m$, a equação de Michaelis-Menten se reduz para:

$$V_o = \left[\frac{V_{max}}{K_m} \right] S \quad (5)$$

A velocidade inicial é diretamente proporcional à concentração do substrato, e aplica-se a cinética de primeira ordem. Quando $S \geq 10 K_m$ a equação de velocidade se reduz á:

$$V_o = V_{max} \quad (6)$$

A velocidade inicial, não depende da concentração do substrato, e tem-se cinética de ordem zero, para concentração constante de enzima. Na faixa de concentração $0,1 K_m \leq S \leq 10 K_m$; a cinética é de ordem mista, para reação envolvendo somente um substrato [10].

Geralmente as reações enzimáticas envolvem mais de um substrato. Neste caso um dos substratos pode ser determinado, mantendo a concentração do outro em excesso, deste modo a cinética comporta-se como de pseudo primeira ordem. Frequentemente há um decréscimo na velocidade da reação enzimática, em consequência da alta concentração de substrato. Esta inibição causada pelo substrato não obedece a equação de Michaelis, pois pode ser devida á diferentes causas.

Há casos em que a inibição é devida a formação de complexos "ineficientes" com dois ou mais substratos moleculares combinando com o sítio ativo da enzima. Isto é observado em muitas enzimas, em que há dois ou mais grupos, cada um combinando com uma parte definida da molécula do substrato. No complexo "efetivo" uma molécula do substrato combina-se com todos esses grupos [8 - 10].

I.D.2. Efeito da concentração de enzima

Teóricamente, observa-se um aumento na velocidade com o aumento na concentração de enzima, para em seguida, ocorrer uma diminuição na velocidade para concentrações muito altas. Isto na verdade não indica perda na atividade enzimática, mas pode representar uma limitação na técnica de medida. Quando se utiliza um extrato enzimático é importante conhecer a quantidade de enzima que catalisa a reação principal, compatível com a sensibilidade da técnica de medida utilizada [10].

I.D.3. Efeito de Ativadores

O ativador é uma outra substância, que requerida pela enzima, torna-a mais ativa. Um exemplo é a ativação da enzima Isocítrico Desidrogenase (E.C.1.1.1.42.) por ions Mg^{2+} [10].

O efeito da concentração do ativador na velocidade inicial é similar ao da concentração de substrato. Em uma baixa concentração de ativador a reação se comporta como de primeira ordem dependente da sua concentração. Já em altas concentrações a enzima está ativada ao máximo e a velocidade independe da concentração do ativador. Geralmente o ativador não é específico, e várias substâncias diferentes podem ativar uma enzima [8, 9].

Para análises de substrato em sistema enzima-ativador, utiliza-se um excesso na concentração de ativador. Nestas condições a reação é de pseudo primeira ordem, dependendo apenas da concentração do substrato [10].

I.D.4. Efeito de inibidores

O inibidor é uma substância que causa a diminuição na atividade enzimática, reagindo com a enzima formando o complexo enzima-inibidor ou reagindo com o substrato. A inibição pode ser reversível ou irreversível. Na inibição reversível, a enzima recupera a atividade quando se remove o inibidor, na inibição irreversível o mesmo não acontece.

Com o inibidor irreversível, a diminuição da atividade enzimática é progressiva com o aumento da sua concentração, até que todo o mesmo se combine com a enzima irreversivelmente. Já com o inibidor reversível, a inibição atinge rapidamente um valor de equilíbrio, dependendo da concentração, no qual há uma competição com o substrato pelo sítio ativo da enzima [8 - 10].

Geralmente, os métodos cinéticos são extremamente sensíveis para determinar substâncias que inibam a cinética enzimática. As enzimas com alta especificidade para um determinado inibidor, permitem o seu emprego como método analítico daquele inibidor, de modo rápido e

sensível. Assim uma pequena concentração (10^{-10} g/ml) de compostos organofosforados pode ser determinada pela inibição da enzima colinesterase [10].

I.D.5. Efeito da Temperatura

Um acréscimo na temperatura provoca um aumento na velocidade de reação. Em muitos casos com um aumento de 10°C na temperatura a velocidade é aproximadamente duplicada, e um controle de $\pm 0,1^{\circ}\text{C}$ é suficiente para uma boa reprodutibilidade dos resultados [10].

O conhecimento da temperatura de máxima atividade enzimática é essencial, pois abaixo desta a velocidade de reação é lenta, e acima há a perda gradativa da atividade enzimática, acelerando o processo de desnaturação da enzima [8 - 10].

I.D.6. Efeito do pH

O pH no qual a enzima está com atividade máxima é definido como pH ótimo. Há enzimas que apresentam uma faixa restrita de pH ótimo e uma pequena variação provoca a diminuição da atividade; há também enzimas que são mais estáveis á variação de pH.

Variações de pH provocam a modificação na conformação

tridimensional da enzima a perda da sua atividade bem como diminuição da afinidade pelo substrato [8 - 10].

Para aplicações analíticas para obter-se boa reprodutibilidade é importante se trabalhar com o meio de reação tamponado no pH ótimo [10].

I.D.7. Cofatores Enzimáticos

Muitas enzimas requerem a presença de compostos adicionais, chamados cofatores, antes de se tornarem catalizadores ativos. Atuam como transportadores intermediários de grupos funcionais, de átomos específicos, ou de elétrons que são transferidos na reação enzimática. O cofator pode ser uma molécula orgânica chamada coenzima (como a Flavina Adenina Dinucleotídeo (FAD), onde o componente transferido é o átomo de hidrogênio), ou um íon metálico (como o Zn^{+2} requerido pela Álcool Desidrogenase) [10]. Quando a coenzima está firmemente ligada à molécula enzimática, denomina-se grupo prostético [8-10].

CAPÍTULO II

Imobilização de Enzimas

II. A. Introdução

A imobilização ou insolubilização de enzima pelas inúmeras vantagens que apresenta, permitiu popularizar os métodos enzimáticos em química analítica.

A possibilidade de reutilização em muitas análises, baixando o custo das mesmas, é uma das mais importante vantagens.

As enzimas quando imobilizadas são colocadas em um meio semelhante ao da natureza de origem, resultando numa maior estabilidade e permitindo a utilização em variações maiores de pH e de temperatura, apresentando pouca susceptibilidade para ativadores e inibidores, ao contrário da enzima solúvel [10, 11].

As principais técnicas de imobilização são : adsorção, microencapsulação, oclusão em gel, ligação covalente com reagente bifuncional, ligações covalentes em matrizes insolúveis e eletroquímica. Na construção de eletrodos enzimáticos atualmente os métodos mais usados são os três últimos, os quais serão detalhados a seguir.

II.B. Ligação Covalente Cruzada : Reagentes Bifuncionais

Os reagentes bifuncionais são usados para insolubilizar enzimas e outras proteínas, por ligação cruzada intermolecular, formando partículas macroscópicas [7, 10, 11]. Os reagentes bifuncionais são divididos em duas classes, "homo" bifuncionais e "hetero" bifuncionais, dependendo se o reagente possui dois grupos funcionais indenticos ou diferentes.

Dentre os homo bifuncionais destacam-se: o glutaraldeido; ácido bis diazo benzidino-2-2' dissulfônico; 4,4'-difluor-3-3'-dinitrodifenil sulfônico; ácido difenil-4,4' -ditiocianato-2,2'-dissulfônico; 1,5-difluor-2,4 dinitrobenzeno e o cloreto de fenol-2,4- dissulfonil [10, 11].

Como reagentes "hetero" bifuncionais citam-se: o tolueno -2-isocianato -4-isotiocianato; tricloro -o-triazina e 3-metoxidifenilmetano -4,4'-diisocianato [10, 11].

É um método simples, ligando quimicamente a enzima, permitindo o controle das propriedades químicas e o tamanho da partícula do produto final. Porém muitas enzimas são sensíveis ao reagente ligante podendo perder a atividade durante a imobilização.

II.C. Ligação Covalente em Matrizes Insolúveis

Houve um grande avanço na tecnologia de imobilização de enzimas por ligação covalente com a uso de suportes insolúveis [7, 10, 11]. Os suportes são escolhidos pelas propriedades de solubilidade, grupos funcionais, estabilidade mecânica, área superficial, dilatação (aumento de tamanho) e natureza hidrofóbica ou hidrofílica. São empregados essencialmente três tipos de suportes: inorgânicos, polímeros naturais e polímeros sintéticos. Os suportes mais usados são [10, 11]: o vidro poroso, poliacrilamidas, derivados do ácido poliglutâmico, poliestireno, nylon, celulose, sephadex, copolímero anidrido etileno maleico, agarose, sepharose, carboximetilcelulose acetato de celulose e colágeno.

Esses suportes são geralmente ativados por transformação em vários derivados, e ligados por meio de grupos funcionais da enzima que não são essenciais para a atividade catalítica (figura 3). Como a reação química se dá ao acaso, são desnaturados algumas moléculas, deste modo a reação é feita em condições suaves.

Os resíduos de amino ácidos da enzima apropriados para a ligação covalente são: (a) α e ϵ amino grupos; (b) anel fenólico da tirosina; (c) grupos β e γ carboxila; (d) o grupo sulfidril da cisteína; (e) o grupo hidroxila da serina; e (f) o grupo imidazol da histidina. Os mais amplamente utilizados são os três primeiros, e havendo um grande número de métodos de ligação covalente de enzimas para suportes insolúveis [10, 11].

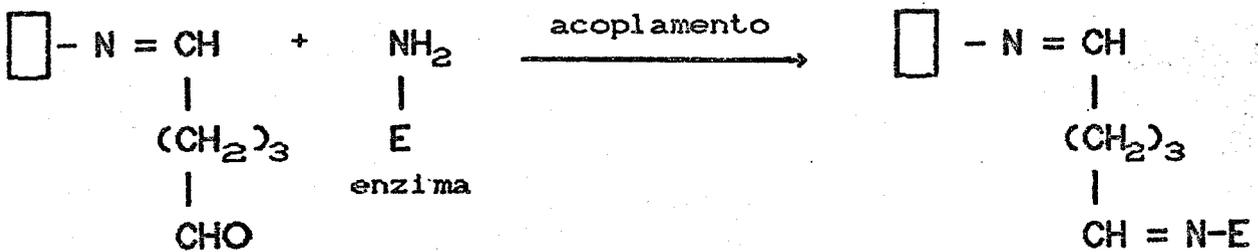
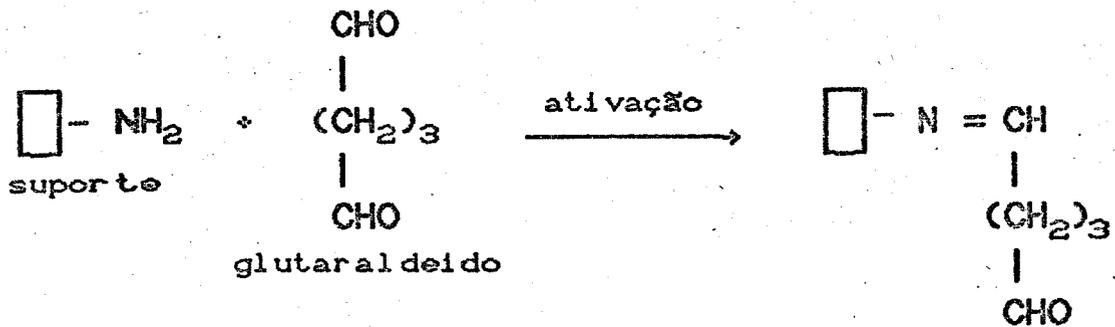


Figura 3- Reação de formação da ligação cruzada entre suporte inerte, ligante bifuncional (glutaraldeído) e enzima [7, 10, 11].

II. D. Imobilização Eletroquímica

A polimerização eletroquímica em superfície de eletrodos de platina ou de carbono vítreo [12] é um método atraente de imobilizar enzimas do grupo das oxidoredutases. Apresenta vantagens, pois permite o controle preciso da quantidade e da distribuição espacial da enzima imobilizada [13 - 16], possibilitando a construção de micro eletrodos enzimáticos.

Este método baseia-se no conhecido princípio da eletroforese, que consiste no fenômeno da migração do polieletrólito anfótero (proteínas), sob um gradiente de campo elétrico externo, sendo o pH do meio diferente do pH isoelétrico da proteína [13]. A enzima quando está num pH acima do ponto isoelétrico, apresenta carga negativa [8, 9], possibilitando sua migração para o eletrodo polarizado onde ocorre a sua eletropolimerização, na superfície do eletrodo modificado.

Suzuki e colaboradores descreveram o processo eletrolítico de preparação de filmes de colágeno com enzimas [54], Lowe e Foulds [16] imobilizaram a glicose oxidase polimerizando eletroquimicamente o pirrol em eletrodo de platina.

Recentemente Zambonin e colaboradores [51] imobilizaram a mesma enzima em filme de poli (o-fenilenodiamina) eletropolimerizado.

II.D.1. Técnicas Eletroquímicas nos Estudos de Enzimas Imobilizadas

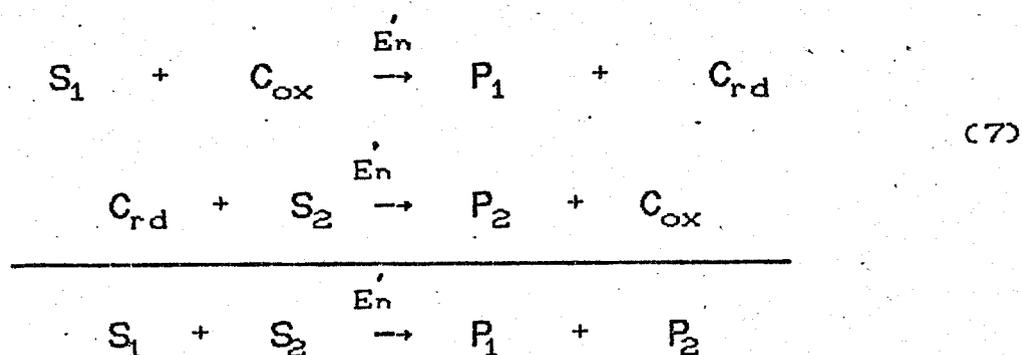
II.D.1. A. Introdução

As reações biológicas de oxido-redução são catalisadas pelas enzimas do grupo das oxido-redutases, de estruturas mais complexas e de mecanismos bem menos compreendidos do que os dos outros grupos enzimáticos [17].

Pelas dificuldades que envolvem as oxido-reduções na indústria química e no desenvolvimento de métodos químicos em análises clínicas, são de grande interesse a utilização das enzimas oxido-redutase nestas duas áreas de aplicação, além do interesse acadêmico na investigação dos mecanismos de ação [12].

Desde que elétrons são transferidos durante as reações de oxido-redução, as técnicas eletroquímicas de análise são adequadas para caracterizar o tipo e a extensão da reação, e contribuir na identificação dos produtos e propor o provável mecanismo de reação.

Na equação (7) é apresentado um esquema simples da reação de uma enzima oxido-redutase com o cofator nas formas Cox e Crd, representando respectivamente as formas oxidadas e reduzidas, mais os substratos S₁ e S₂, e E_n são os estados da apoenzima (enzima E_n menos o cofator).



As reações que formam P_1 e P_2 são catalizadas por E_n , porém, somente a reação inicial forma P_1 . Na prática a reação para formação de P_2 é para regenerar o C_{ox} e ao mesmo tempo catalisar outro substrato S_2 . A regeneração de C_{ox} pode ser feita por outra enzima, e por materiais não enzimáticos, como intermediários químicos.

Monitora-se eletroquimicamente a reação enzimática, através da transferência eletrônica do cofator enzima ou do desaparecimento do substrato, ou do aumento do produto formado. Em uma solução homogênea, todas as espécies presentes tem condições iguais de acesso à superfície do eletrodo [3, 12].

Com a enzima imobilizada no eletrodo, as características são alteradas, surgindo novos resultados, pois o tipo de imobilização é um dos fatores que influencia na resistência difusional para o transporte de substratos ou produtos para o eletrodo [12].

As técnicas eletroquímicas possíveis para esses estudos, são: 1- Cronopotenciometria (potencial em função do tempo); 2- Cronocoulometria (quantidade de carga em função do tempo); 3- Cronoamperometria (corrente em função do tempo); 4- Voltametria (medida da corrente em função do potencial aplicado por tempo) podendo ser do tipo pulso diferencial ou cíclica.

Dentre essas técnicas destaca-se a voltametria cíclica, por ser amplamente empregada para estudos de caracterização dos aspectos mecanísticos e para ajudar na identificação dos produtos do sistema imobilizado enzima-cofator.

II.D.1.B. Voltametria Cíclica

Na voltametria cíclica aplica-se um potencial no eletrodo, e mede-se a corrente. O potencial é aplicado linearmente com o tempo, numa direção (oxidação ou redução) até um determinado valor a partir do qual inverte-se o sentido. Os resultados obtidos com correntes de picos (i_p) e potenciais de picos (E_p), possibilitam verificar a reversibilidade da reação eletroquímica, e propor o mecanismo mais provável da reação [12, 18].

O potencial aplicado é variado a uma velocidade fixa (mV/s) em uma direção catódica e depois anódica ou vice-versa, originando uma onda triangular isósceles.

Uma variação de temperatura durante a medida, afeta a corrente de pico, alterando conseqüentemente os resultados, por isso as medidas são feitas em células termostatzadas e em ambiente de temperatura controlada.

A célula é do tipo de três eletrodos; o de referência, que pode ser calomelano saturado (E.C.S.), ou prata-cloreto de prata (Ag/AgCl), contendo KCl como eletrólito, o de trabalho, platina ou carbono vítreo com enzima imobilizada, e o auxiliar (contra eletrodo), constituído por um fio de platina (figura 4).

Com a célula montada adiciona-se a solução tampão e o substrato, eliminando-se o oxigênio dissolvido com a passagem de um gás inerte, nitrogênio ou argônio, mantendo uma corrente acima da solução durante a medida.

A varredura de potencial é iniciada em um valor no qual o material em estudo não seja eletroativo. A direção inicial do potencial de varredura depende do estado de oxidação das espécies presentes. Se o material estiver na forma oxidada a primeira varredura é no sentido negativo, obtendo uma redução ou corrente catódica. No outro sentido, inicia-se a oxidação da espécie reduzida, aparecendo uma corrente anódica [12, 18].

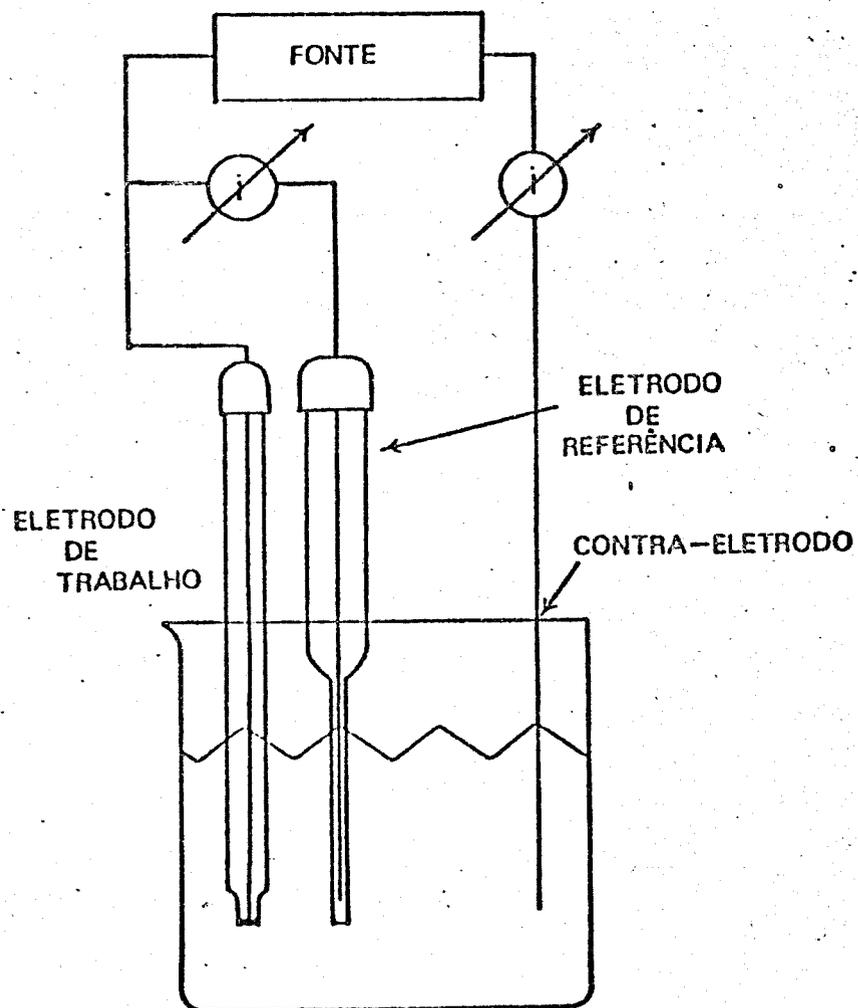


Figura 4 - Esquema da célula eletroquímica com os respectivos eletrodos.

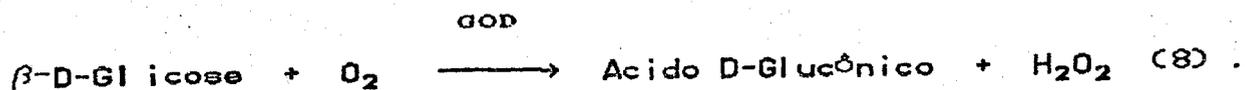
CAPÍTULO III

Eletrodo Enzimático para Glicose

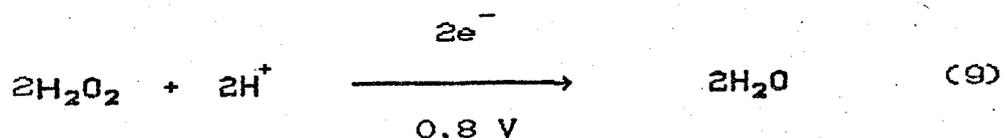
III. A. Introdução

O primeiro eletrodo enzimático para glicose foi construído por Updike e Hicks em 1971 [6], a partir de então o interesse nos estudos de construção e aperfeiçoamento foi cada vez maior, resultando numa vasta literatura de trabalhos publicados, patentes e surgimento de empresas que comercializam este eletrodo; como a Owens-Illinois (Kimble), Technicon (Europa), Yellow Springs Instrument Co. (Ohio), Fuli Electric (Tokyo), Tacussel (Lyon França) e Universal Sensors (New Orleans E. U. A.) [7, 10 11]. Somente em 1989 o Chemical Abstracts listou em torno de 120 títulos entre publicações e patentes, demonstrando que o eletrodo enzimático para glicose continua a ser um atraente objeto de pesquisa.

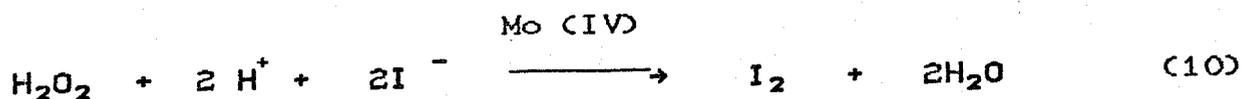
O eletrodo enzimático para glicose é constituído por um sensor base de detecção, com a enzima glicose oxidase (β -D- glicose oxigênio oxidoreductase E.C. 1.1.3.4.) (GOD) imobilizada. A glicose oxidase catalisa a oxidação da β -D Glicose consumindo proporcionalmente o oxigênio dissolvido em solução, produzindo Ácido D-Glicônico e H_2O_2 conforme equação (8).



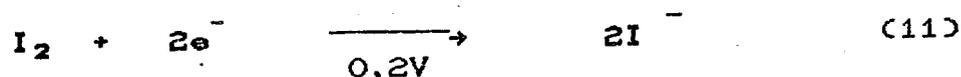
Através da reação catalisada pela GOD, são empregados eletrodos amperométricos que determinam a formação da H_2O_2 através da eletro oxidação à 0,8 V Vs ECS com eletrodo de platina [3, 10, 11, 19, 20] :



ou alternativamente de determinação da H_2O_2 é feita indiretamente pela reação com iodeto catalisada com, ou sem, Mo (IV) [21 - 22] :



seguida pela redução amperométrica do iodo à 200 mV Vs ECS:



Outro eletrodo amperométrico amplamente empregado é o de oxigênio tipo Clark, que monitora a diminuição da pressão parcial de oxigênio dissolvido na solução [3, 7, 10, 11, 23, 24].

III.B. Eletrodo Amperométrico para Oxigênio

O primeiro sensor molecular seletivo, foi o sensor amperométrico de oxigênio, descrito por Clark e colaboradores em 1953, e sua primeira aplicação aconteceu em 1956 em medidas contínuas de pressão parcial de oxigênio no sangue e tecidos [24, 25].

O sensor é constituído de um eletrodo de trabalho de platina ou de ouro num corpo de vidro ou de plástico, e um de referência Ag/AgCl, uma solução eletrolítica de tampão contendo ions cloreto e uma membrana de polipropileno.

As moléculas de oxigênio da amostra se difundem pela membrana e são reduzidas no eletrodo de platina, catodicamente polarizado aplicando-se potencial entre -600 à -800 mV [24, 25] :



De acordo com a reação do eletrodo, cada molécula de oxigênio reduzida envolve a transferência de quatro elétrons, e a corrente gerada, medida na célula, é diretamente proporcional a concentração de oxigênio, ou de acordo com a lei de Henry-Dalton, à pressão parcial de oxigênio (P_{O_2}) [24].

O eletrodo de oxigênio tipo Clark não sofre interferência de materiais endógenos eletroativos não voláteis (1).

RESULTADOS EXPERIMENTAIS

CAPÍTULO IV

Imobilização Eletroquímica da glicose oxidase em Eletrodo Modificado com Polipirrol

IV. A. Introdução

Iniciou-se o estudo desta dissertação com a imobilização eletroquímica da glicose oxidase. É de grande interesse a aplicação de filmes poliméricos condutores, como modificadores de eletrodo, devido às suas propriedades eletroquímicas, mecânicas (boa resitência) e elétricas (alta condutividade) [14 - 16, 26, 27]. Dentre aqueles polímeros, destaca-se o polipirrol (PPI) como um material de eletrodo adequado para estudos de enzimas do grupo das oxido-redutases.

IV.B. Modificação do Eletrodo de Platina com Polipirrol

A superfície do eletrodo de trabalho de platina (Pt) é facilmente modificada através da eletropolimerização do pirrol (PI) em meio aquoso contendo um eletrólito adequado, desaerado e sem agitação.

No voltamograma do sistema pirrol (0,1M) e KCl (1,0M) (figura 5) observa-se potencial de pico (E_p) de oxidação do pirrol em 990 mV formando o filme polimérico PPI, que incorpora o ânion do sal usado como eletrólito agindo como ânion dopante [27 - 28].

Com o objetivo de se obter um filme polimérico mais espesso, aplicou-se o potencial constante de 990 mV durante uma hora nas mesmas condições anteriores. Em todas as experiências a temperatura foi mantida em $25 \pm 0,1$ °C.

IV.C. Voltametria Cíclica com o Eletrodo Modificado PPI com a glicose oxidase

O ânion dopante (Cl^-) do PPI é responsável pela característica de óxido-redução do polímero. Segundo Shimidzu e colaboradores [29], o tamanho do ânion exerce grande influência no processo de oxidação e redução (dopagem e desdopagem) no PPI. Especialmente o ânion de um polieletrólito (PE, dopante imobilizado no polímero) uma vez incorporado no PPI não é desprendido da matriz, quando o PPI é reduzido eletroquimicamente; a eletroneutralidade do PPI/PE é conservada pela penetração do cátion (proveniente do

eletrólito) na matriz polimérica (dopagem pseudo catiónica).

Fixando a polaridade da carga no PPI/PE pode-se inverter reversivelmente o sinal positivo e negativo conduzindo a oxidação e a redução do PPI; e o composito PPI/PE atua como uma membrana de carga controlada.

Através de estudos voltamétricos com o eletrodo modificado PPI usando vários tipos de ânions em solução, Shimidzu [29] propõe o modelo para a óxido-redução da matriz polimérica e do ânion em solução conforme ilustra a figura 6.

Voltamogramas comparativos obtidos com o eletrodo modificado com PPI em solução tampão fosfato (0,1M; pH 6,88) (figura 7A), e com 46,0 U/ml de glicose oxidase em tampão fosfato (0,1M; pH 6,88) (figura 7B), sugere uma diferença em relação à solução contendo a enzima com um E_p de oxidação em 640 mV. Este resultado está de acordo com o modelo proposto para o PPI/PE (figura 6).

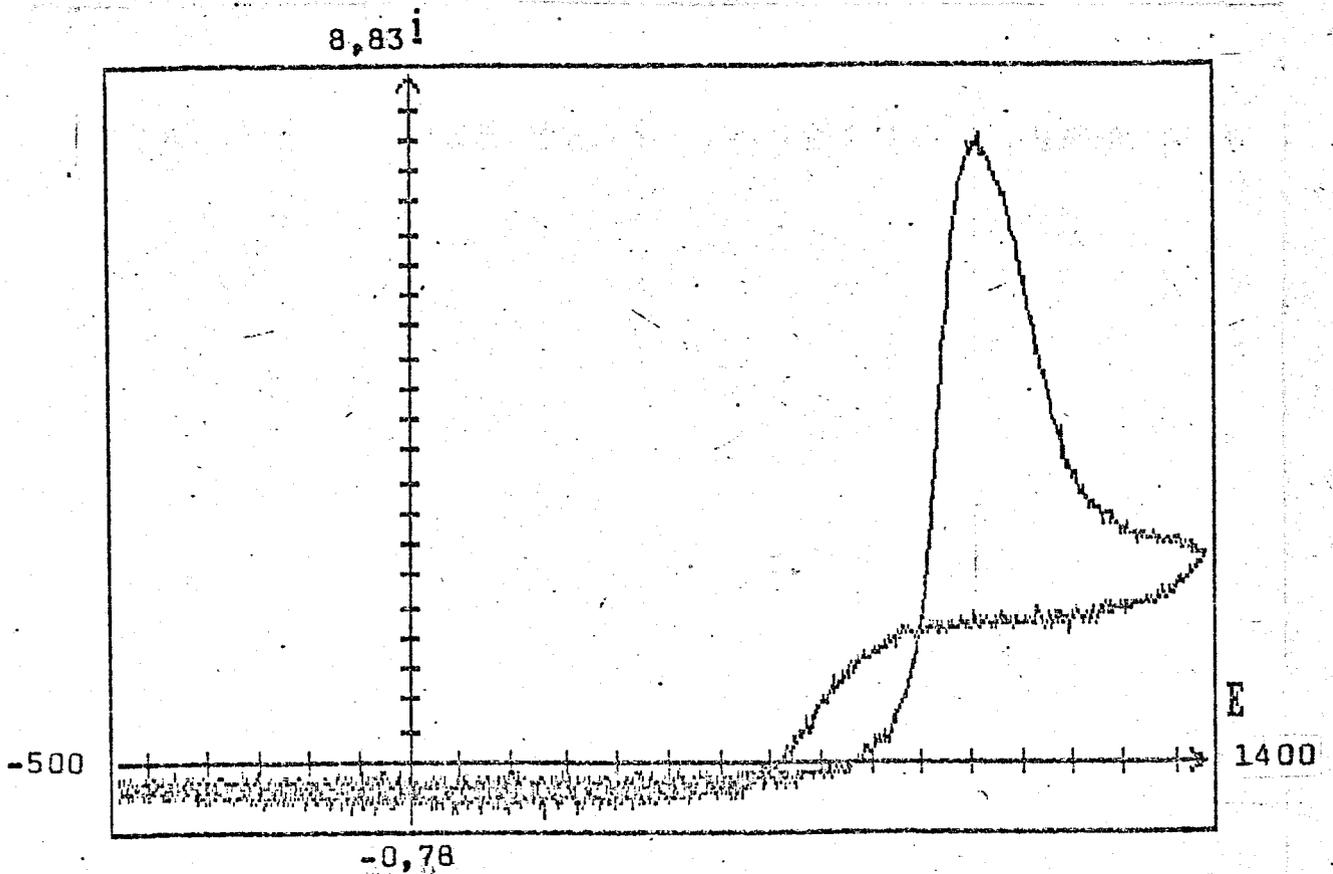


Figura 5- Voltamograma com solução de pirrol 0,1M e KCl 1,0 M. Velocidade de varredura 50mV/s. Varredura de Potencial de -500 à 1400 mV com divisões de 90 mV. Intensidade de corrente (i) de -0,78 à 8,83 mA com divisões de 0,40 mA

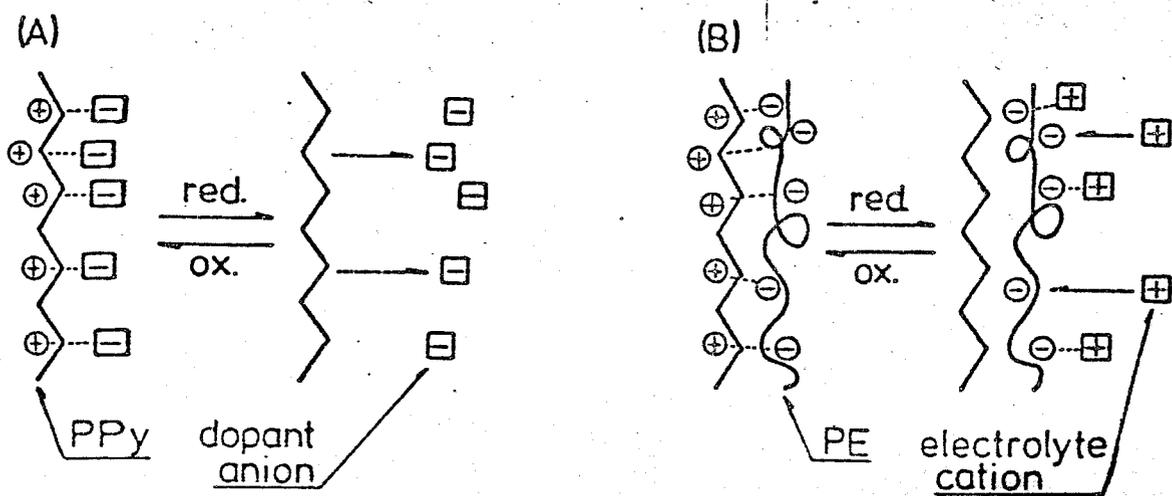


Figura 6- Modelo proposto por Shimidzu [29] para a oxido redução do PPI com o ânion em solução. (A) PPI/Eletrólito e (B) PPI/Polieletrólito.

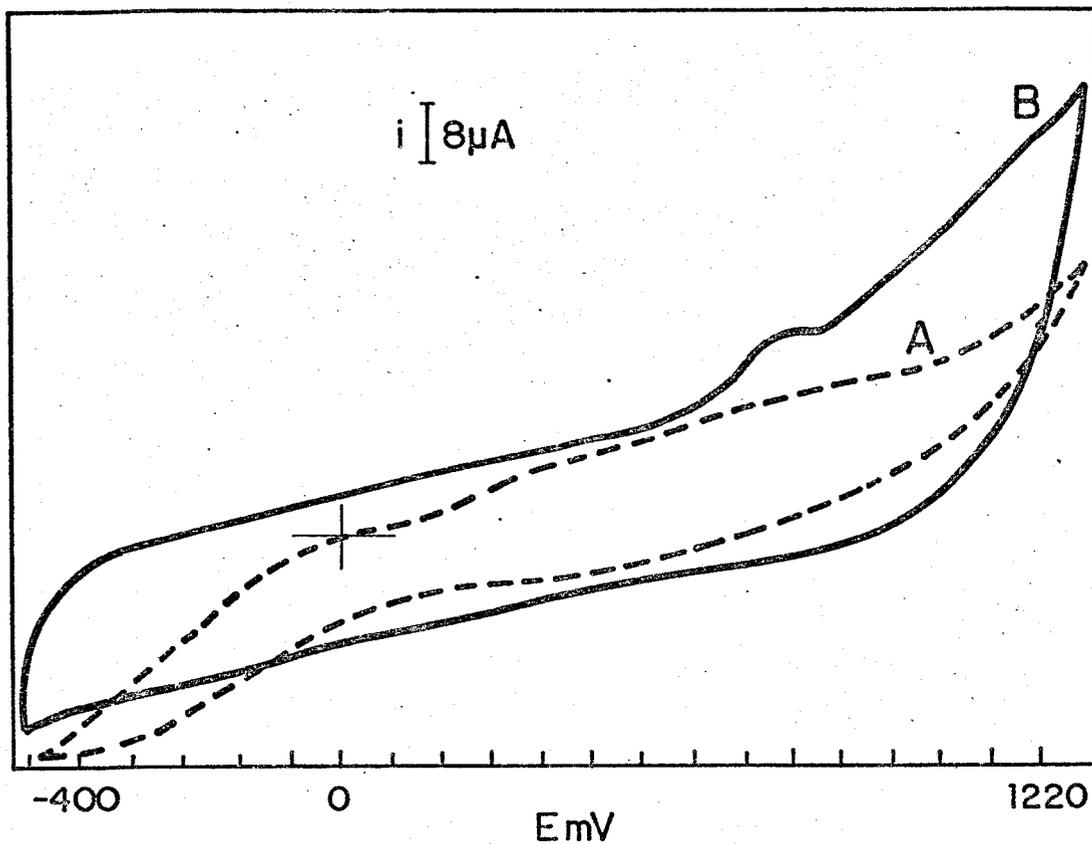


Figura 7- Voltamograma do eletrodo PPI com (A) tampão fosfato (0,1 M; pH 6,88) e (B) solução tampão fosfato (0,1 M; pH 6,88) com 46 U/ml de glicose oxidase. Velocidade de varredura 50 mV/s. Varredura de Potencial de -500 à 1400 mV com divisões de 90 mV.

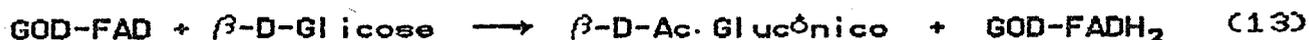
IV.D. Imobilização Eletroquímica da glicose oxidase

Para a imobilização eletroquímica da glicose oxidase no eletrodo modificado com PPI aplicou-se um potencial constante de 640 mV durante uma hora, com 46 U/ml de GOD em solução tampão fosfato 0,1M pH 6,88.

Durante a eletroimobilização da glicose oxidase no PPI a corrente observada é pequena (5 μ A), indicando a pouca eletroatividade da enzima, mesmo que o pH 6,88 do meio esteja acima do ponto isoelétrico da mesma, que é 4,6 [16].

IV.E. Voltametria Cíclica da glicose oxidase com a β -D Glicose

A glicose oxidase faz parte do grupo das enzimas óxido-redutases, sendo ativa na sua forma oxidada (GOD-FAD), com o grupo protéstico FAD (Flavina Adenina Dinucleotídeo) [15, 16, 25, 26]. O mecanismo de reação da GOD com β -D-Glicose, envolve a redução da β -D-Glicose (equação 13). A GOD-FADH₂ (forma reduzida da enzima) é novamente oxidada no eletrodo (equação 14).



IV.E.1. Voltametria Cíclica com Eletrodo Modificado PPI

Sistema glicose oxidase solúvel e β -D Glicose

A figura 8 mostra voltamograma da solução com a glicose oxidase solúvel e 50 mM de β -D Glicose em tampão fosfato 0,1M; pH 6,88 com o eletrodo modificado PPI. Pode-se observar que não houve nenhuma alteração, evidenciando que a transferência de elétrons não ocorreu numa extensão mensurável entre a enzima reduzida (GOD-FAD) e a superfície do eletrodo.

IV.E.2. Voltametria Cíclica com Eletrodo Modificado PPI

Sistema Glicose oxidase Eletro imobilizada e β -D Glicose

Com a glicose oxidase eletro imobilizado no eletrodo modificado com PPI, realizou-se voltamogramas comparativos numa solução tampão fosfato (0,1M; pH 6,88) (figura 9B) e outra adicionando-se 50mM de β -D Glicose em (figura 9B). Observa-se na figura 9B um E_p de oxidação aproximadamente em 350mV (vs $Ag/AgCl$). Neste caso a FAD da enzima é primeiro reduzida pela adição da β -D Glicose conforme equação 13, em seguida ocorre a oxidação da $FADH_2$ (equação 14) com a transferência de elétrons da mesma para o acceptor de elétrons em contato com o eletrodo de PI, resultando no E_p de oxidação do voltamograma.

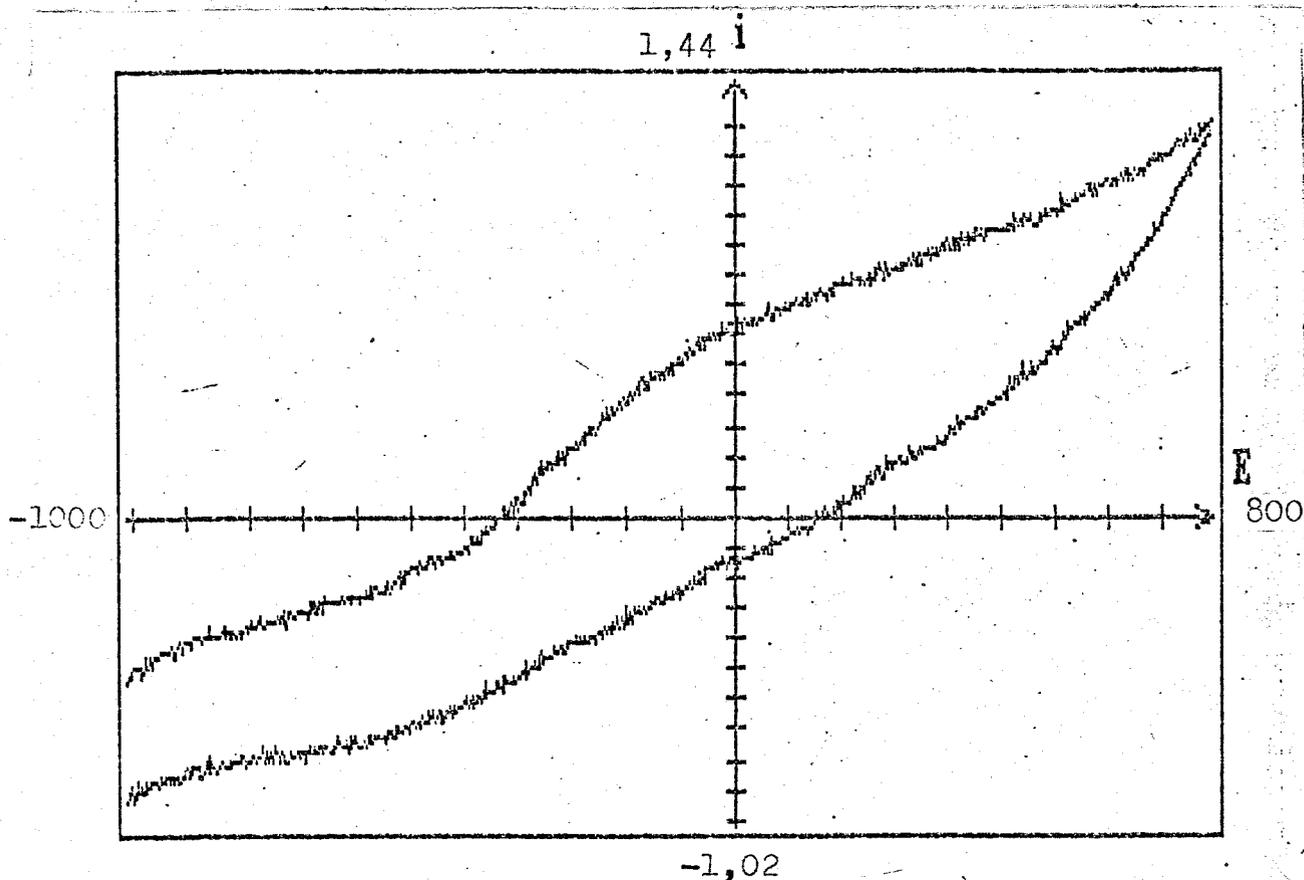


Figura 8 Voltamograma obtido com eletrodo modificado de PPI, em tampão fosfato 0,1M pH 6,88 com 46 U/ml de glicose oxidase solúvel e 50 mM de β -D Glicose. Velocidade de varredura 50 mV/s. Varredura de Potencial -1000 à 800 mV com divisões de 90 mV. Intensidade de corrente (i) -1,02 à 1,44 mA com divisões de 0,10 mA.

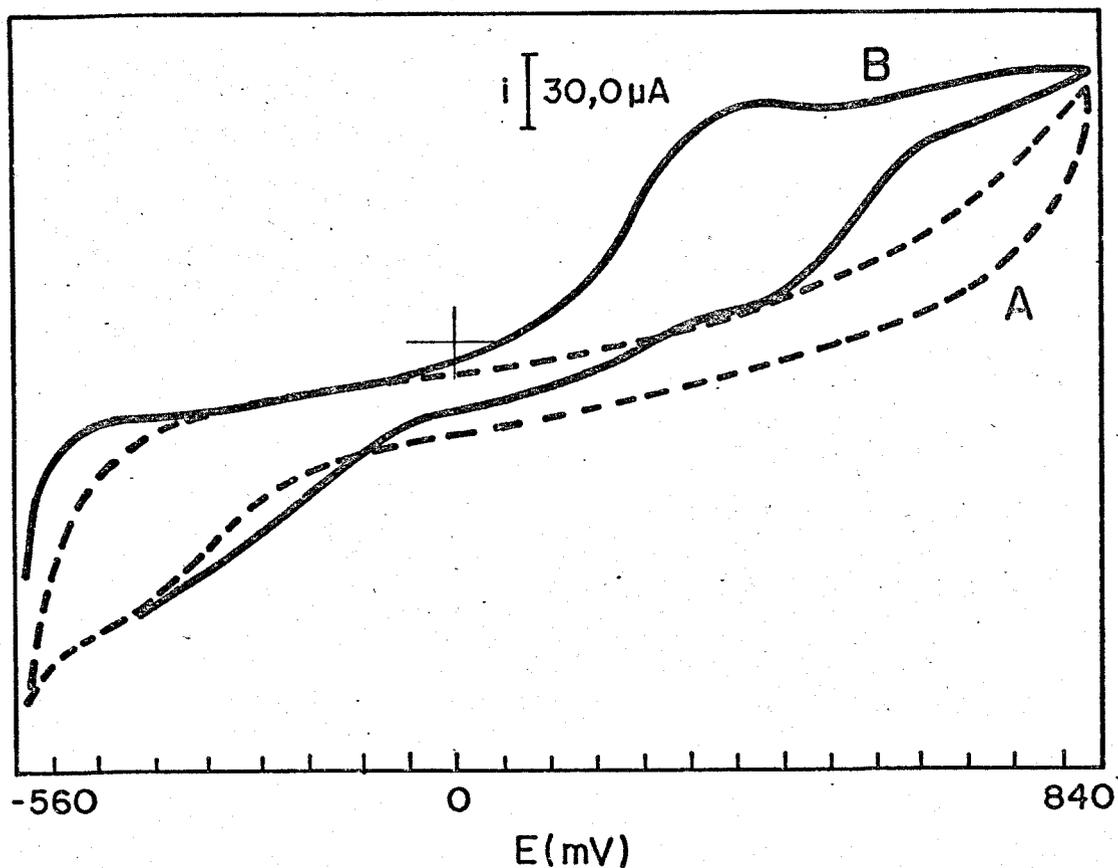


Figura 9- Voltamogramas obtidos com eletrodo modificado de PPI contendo glicose oxidase eletroimobilizada, (A) tampão fosfato 0,1 M; pH 6,88 e com (B) adição de 50 mM de β -D Glicose. Velocidade 50 mV/s. Varredura de Potencial -600 à 900 mV com divisões de 70 mV.

IV.F. Conclusões

Na voltametria cíclica com o eletrodo modificado com PPI, solução contendo 46 U/ml de glicose oxidase solúvel e 50 mM de β -D Glicose não ocorreu modificação significativa (figura 9), provavelmente pelo fato do sítio redox da FAD estar localizado no interior de uma camada de proteína [30], não permitindo a aproximação suficiente da superfície do eletrodo, para uma eficiente transferência de elétrons. Uma vez reduzido a FAD, a sua reoxidação é realizada somente por um mediador químico, que nas condições naturais de atividade é o oxigênio molecular.

Swoboda e Massey [31] determinaram experimentalmente que a glicose oxidase contém duas moléculas de FAD ligadas à molécula de proteína, e as condições de extração do FAD para a análise são drásticas com aquecimento à 100 °C por 15 minutos conseqüentemente desnaturando a enzima, mas sem a destruição da molécula da FAD, isto confirma que o grupo prostético FAD da enzima está firmemente ligado e protegido por uma camada de proteína.

Durante a eletroimobilização da glicose oxidase no eletrodo modificado com PPI, a baixa corrente observada no processo (5 μ A), mostra que a enzima tem pouca mobilidade na solução, por causa do alto peso molecular (em torno de 186.000 [31]), mesmo num pH acima do ponto isoelétrico.

Os resultados até então obtidos mostram a viabilidade da

construção de um sensor amperométrico para glicose, e as características condutoras do PPI permitem que o potencial aplicado para medidas amperométricas seja de 350 mV na oxidação do $FADH_2$ (figura 9). Porém a corrente de pico é pequena para uma adição de 50 mM de glicose, indicando que provavelmente não houve uma oxidação efetiva do $FADH_2$ no eletrodo. Este fato sugere a necessidade da utilização de intermediários químicos (solúveis ou incorporados ao PPI) como o ferroceno e seus derivados, que tem a função de oxidar o $FADH_2$ substituindo o oxigênio molecular usado pela enzima em condições normais de atividade [32, 33, 34].

Embora estes resultados com eletrodo modificado com PPI não sejam conclusivos, abrem perspectivas futuras para a construção de eletrodos enzimáticos cuja única forma de medida é através da reação de oxido redução do cofator; mas como o potencial aplicado para essa reação geralmente é elevado, surgem sérias interferências de substâncias eletroativas [35].

O polímero condutor PPI aliado a um intermediário químico possibilitará a construção de eletrodos enzimáticos de grande aplicação, pois essas enzimas que requerem cofatores são amplamente utilizados em análises clínicas, principalmente as NAD dependentes, como por exemplo a malato desidrogenase [36], salicilato desidrogenase [37], a glicerol desidrogenase [38], álcool desidrogenase [52], entre outras.

CAPITULO V

Imobilização Química da glicose oxidase em Membrana de Colágeno

V.A. Introdução

Na imobilização química da glicose oxidase sobre uma membrana de colágeno, utilizou-se o ligante bifuncional glutaraldeído formando ligação covalente cruzada.

Efetuada a etapa de imobilização a membrana foi acoplada ao eletrodo amperométrico de oxigênio de duas maneiras diferentes.

V.B. Imobilização da glicose oxidase em Membrana de Colágeno

A membrana de colágeno foi escolhida por ser um polímero natural constituído de proteína, contendo um grande número de grupos de amino ácidos livres [13] que reagem facilmente com o glutaraldeído, e a ligação da enzima à membrana ocorre em condições brandas não havendo a desnaturação.

A imobilização química da glicose oxidase (Tipo VII, 134 unidades/mg de sólido) é feita na superfície de um novo tipo de

membrana de colágeno, espessura 0,02 mm. Dissolveram-se 600 U de glicose oxidase em 20 μ l de tampão fosfato (pH: 6,9; 0,1 M) com 10 % de soroalbumina, na superfície da membrana, e em seguida adicionaram-se 20 μ l de glutaraldeído 10 %. Efetuado todo o processo a membrana foi colocada sob luz "photo flood" durante 10 minutos e a seguir armazenada a 4 °C por 24 horas, antes de ser usada.

V.C. Montagem do Eletrodo Enzimático

O acoplamento da membrana, com a enzima imobilizada, ao eletrodo de oxigênio foi realizado de duas maneiras diferentes, conforme ilustra a figura 10; a seguir o eletrodo é colocado na microcélula (figura 11), com capacidade máxima de 1,0 ml e mínima de 0,5ml de solução.

As medidas foram realizadas pelo método cinético, que consiste em medidas instantâneas a medida que a reação enzimática se processa. Acoplou-se um registrador X-t ao oxímetro, permitindo acompanhar a cinética enzimática, aumentando-se a precisão e a rapidez das medidas [10, 11].

Inicialmente adicionou-se à célula 0,5 ml de tampão fosfato (0,1 M; pH 6,88) previamente saturada com oxigênio sob agitação constante, através de agitador magnético não elétrico, e à temperatura de $28,0 \pm 0,1$ °C. Após 2 minutos (tempo para estabilização do

eletrodo) fez-se a adição β -D-Glicose 30,0 mM, através de uma pipeta automática de 20 μ l, e as respostas obtidas pelos dois métodos de montagem estão ilustradas na figura 12.

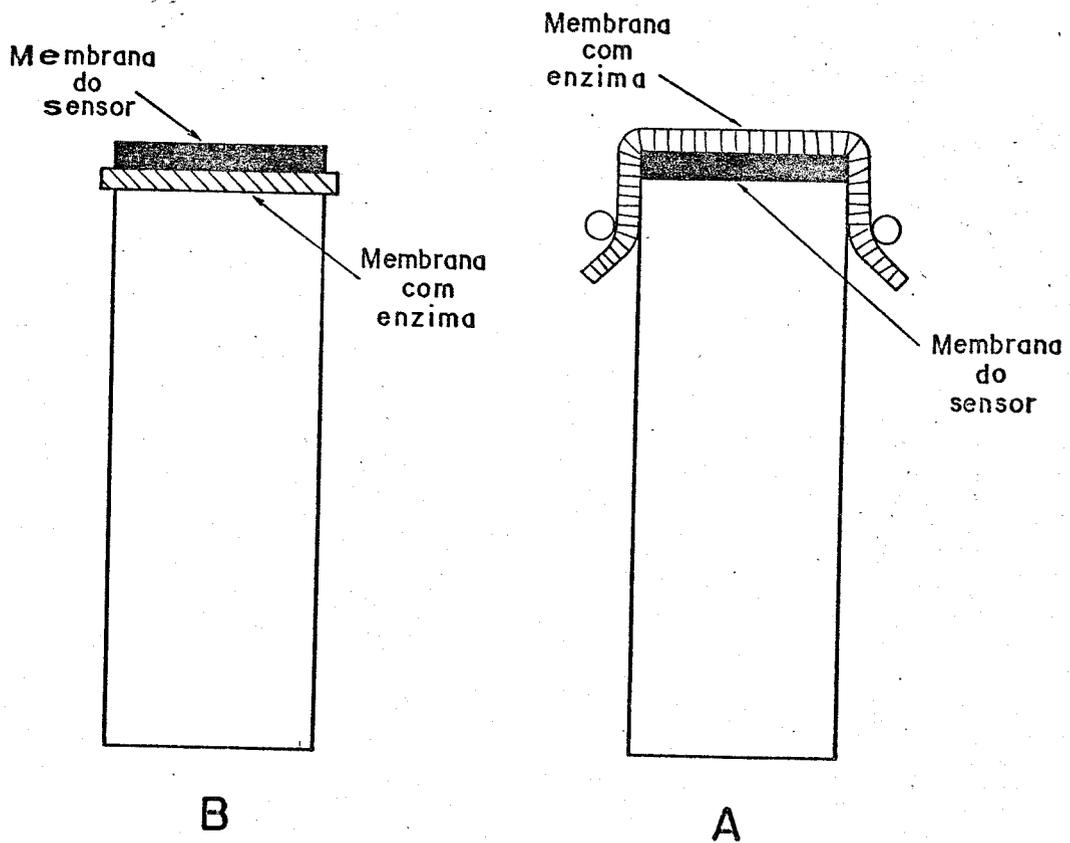


Figura 10 - Construção do eletrodo enzimático. Membrana de colágeno com a GOD imobilizada acoplada lateralmente método proposto (B), membrana acoplada pelo método convencional (A).

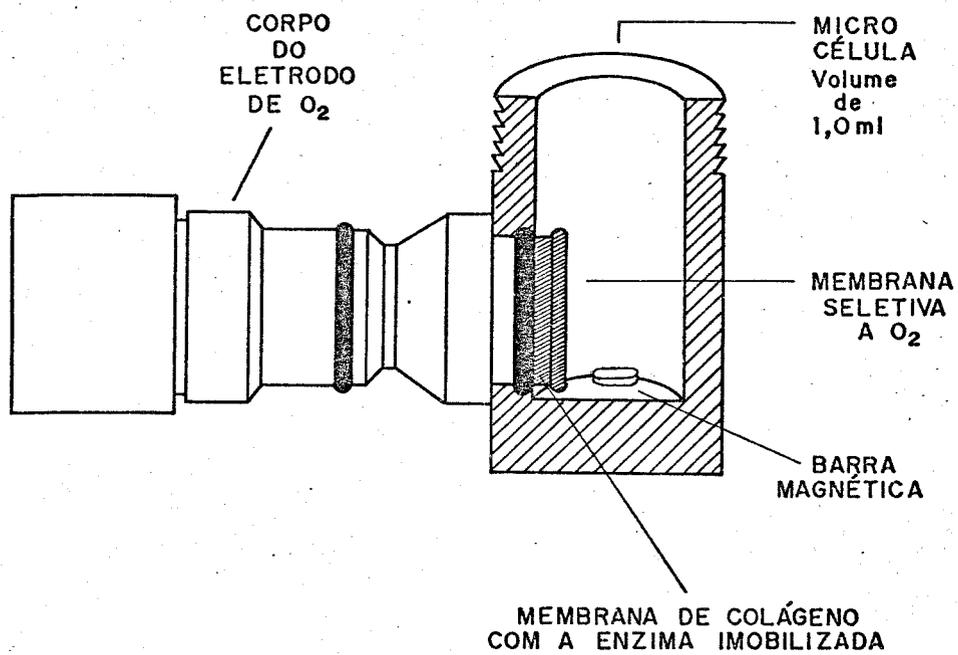


Figura 11 - Esquema do eletrodo enzimático acoplado com a micro célula em corte transversal.

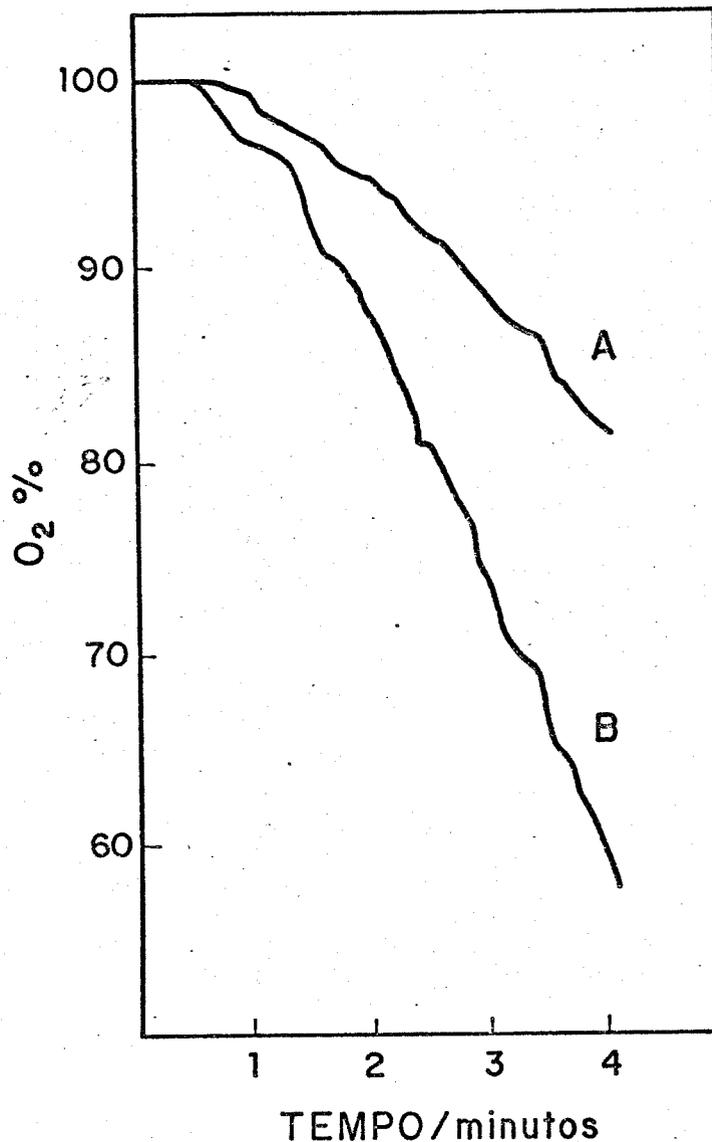


Figura 12 - Resposta do eletrodo enzimático. Membrana de colágeno com a GOD imobilizada acoplada lateralmente método proposto (B), membrana acoplada pelo método convencional (A). Curva O₂ % Vs. tempo em minutos. Condições tampão fosfato 0,1 M, pH 6,99; saturadas de oxigênio (ar), temperatura 28 C°, com adições de 20µl de β-D-Glicose 30,0 mM. Volume final 0,5 ml. Concentração final 1,2 mM.

V. D. Conclusão

A imobilização da glicose oxidase sobre a membrana de colágeno envolve um procedimento simples, principalmente pelas características proteicas da membrana, que facilitam a reação do glutaraldeído com a enzima. Um efeito importante é o da luz que propicia possíveis reações de radicais livres [11], contribuindo para uma melhor imobilização da enzima, e conseqüentemente numa maior estabilidade demonstrada através dos resultados obtidos, que serão apresentados no capítulo seguinte. Assim tornou-se desnecessário a formação de derivados químicos sobre a membrana [13] para posterior imobilização da enzima.

A célula de medida foi projetada visando a termostatização da solução de medida e do eletrodo amperométrico de oxigênio (figura 12), isto reflete numa melhor estabilização da linha base (100% de saturação de O_2) e reprodutibilidade dos resultados, pois uma pequena variação na temperatura fornece resultados não reprodutíveis no eletrodo.

A acoplamento da membrana com glicose oxidase imobilizada no eletrodo de oxigênio afeta a resposta (figura 12), e experimentalmente constatou-se que a colocação lateral da segunda membrana resulta numa resposta maior em relação ao outro modo.

Estes fatos podem ser explicados pelo transporte de oxigênio

da amostra para o eletrodo de trabalho, considerando-se três camadas distintas: a camada de solução eletrolítica interna entre o eletrodo de trabalho e a membrana, a própria camada da membrana (espessura da membrana) e a camada de solução aderida na membrana (camada hidrodinâmica). As espessuras das duas primeiras camadas são constantes, mas a espessura da camada hidrodinâmica é função da velocidade de agitação [24].

Ross e colaboradores [53], propuseram um modelo estado estacionário, o qual é útil na descrição das características do tempo de resposta da membrana sensível a gás, em termos de parâmetros da membrana, composição do eletrólito interno, espessura da película do filme e condições experimentais. A partir deste modelo, eles derivaram uma equação expressando o tempo de resposta nestes termos, e fazendo certas considerações, a equação foi resolvida resultando numa mais simples:

$$t = \frac{dm}{Dk} \left(1 + \frac{dC_B}{dC} \right) \ln \frac{(C_1 - C_2)}{EC_2} \quad (15)$$

onde:

t: tempo necessário para encontrar uma dada fração $(1 - E)$ da alteração total do sinal devida à alteração na concentração do determinante de C_1 para C_2 .

d: espessura da película do filme.

m: espessura da membrana.

D: coeficiente de difusão do determinante na membrana.

k: coeficiente de partição do determinante entre amostra ou a película do filme e fases da membrana.

C_B : concentração total de todas as formas, outras que as gasosa, do determinante no eletrólito interno.

C: concentração do determinante na forma gasosa no eletrólito interno.

E: aproximação fracional para o equilíbrio = $(C_2 - C)/C_2$.

Mantidas constantes as condições de temperatura, agitação, saturação de oxigênio e a adição de glicose; a única diferença de um método para outro está na espessura da membrana (m), que determina a velocidade de resposta. No método convencional são somados os efeitos das duas membranas pelos quais o oxigênio terá que se difundir com maior dificuldade que no método proposto. Baseando-se nos resultados experimentais e na equação anterior (15), conclui-se que uma espessura menor na membrana do eletrodo resultará num tempo de resposta menor; no caso, o método proposto com colocação lateral da membrana de colágeno.

Escolheu-se o eletrodo assim construído para avaliação analítica, visando sua posterior utilização em amostras reais.

CAPÍTULO VI

Avaliação do Eletrodo com a glicose oxidase

Imobilizada Quimicamente

VI.A. Introdução

Para a avaliação do eletrodo enzimático construído, numa primeira etapa foram estudados os principais parâmetros que afetam a atividade enzimática da glicose oxidase, como: temperatura, pH, concentração de substrato e a determinação da constante de Michaelis-Menten. Efetuados estes estudos, os parâmetros obtidos foram mantidos constantes em condições de atividade máxima para os estudos seguintes e nas aplicações analíticas do eletrodo.

Na segunda etapa estudou-se a estabilidade do eletrodo verificando-se o número máximo de análises possíveis, e os principais interferentes que se relacionam com a especificidade enzimática.

VI.B. Efeito da Temperatura

Variou-se a temperatura da célula contendo 0,5 ml de solução tampão fosfato (0,1 M; pH: 6,89 saturada com oxigênio) desde 20,0 à 34,0 °C através de um banho termostático. Em seguida adicionaram-se 20 µl de solução aquosa de glicose 4,0 mM. A temperatura de 28,0 ± 0,1°C foi ideal, conforme mostra a figura 13, e mantida portanto em todos os experimentos.

VI.C. Efeito do pH

Para este estudo variou-se o pH de 6,25 à 7,68 com tampão 0,1 M de K_2HPO_4 / NaH_2PO_4 . Aliquotas de 0,5 ml das soluções tampões, à 28,0 °C, saturadas com oxigênio foram colocada na célula, em seguida adicionou-se 20 µl de β-D-Glicose 50 mM. Como mostra a figura 14 a faixa de pH ótima para a glicose oxidase imobilizada é de 6,84 à 7,14.

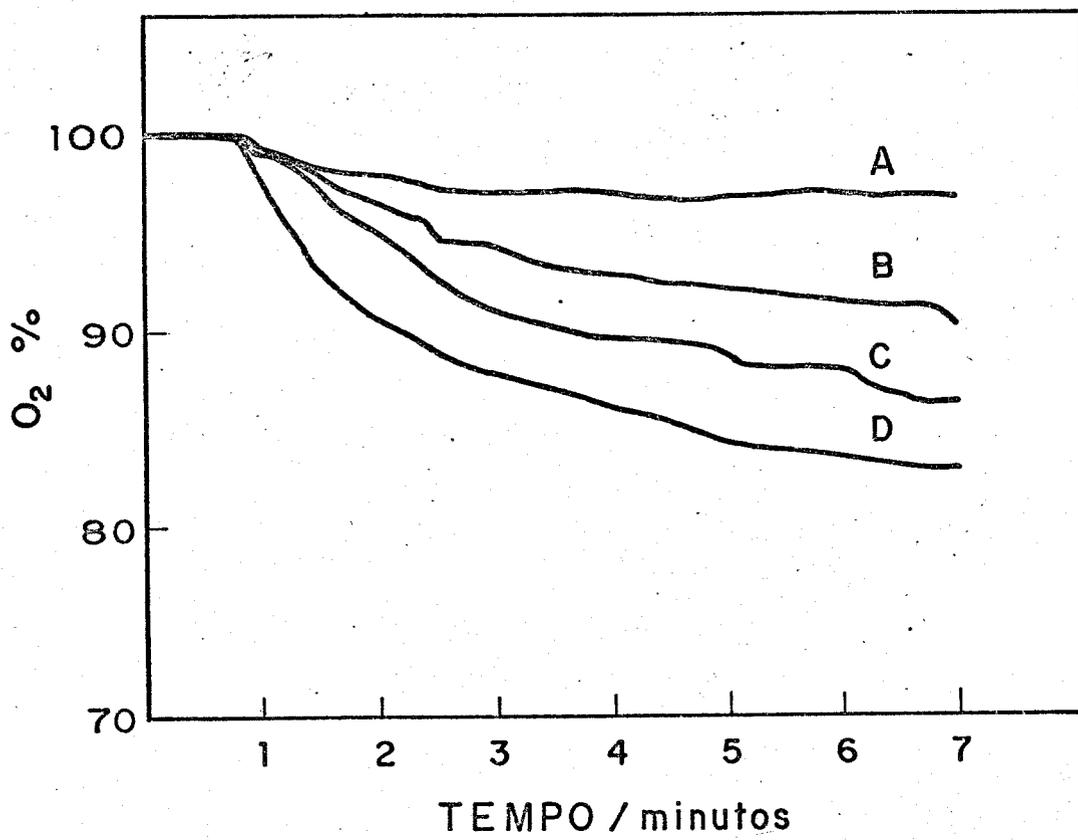


Figura 13 - Efeito da temperatura no eletrodo enzimático. Medidas cinéticas O₂% Vs. Tempo em minutos. Temperaturas : (A) 20,0°C, (B) 25,0°C, (C) 34,0°C e (D) 28,0°C. Condições pH : 6,89 e soluções de tampão fosfato; 0,1 M saturadas de oxigênio, com adições de 20 µl de β-D-Glicose 4 mM. Volume final 0,5 ml. Concentração final 1,6x 10⁻⁴ M.

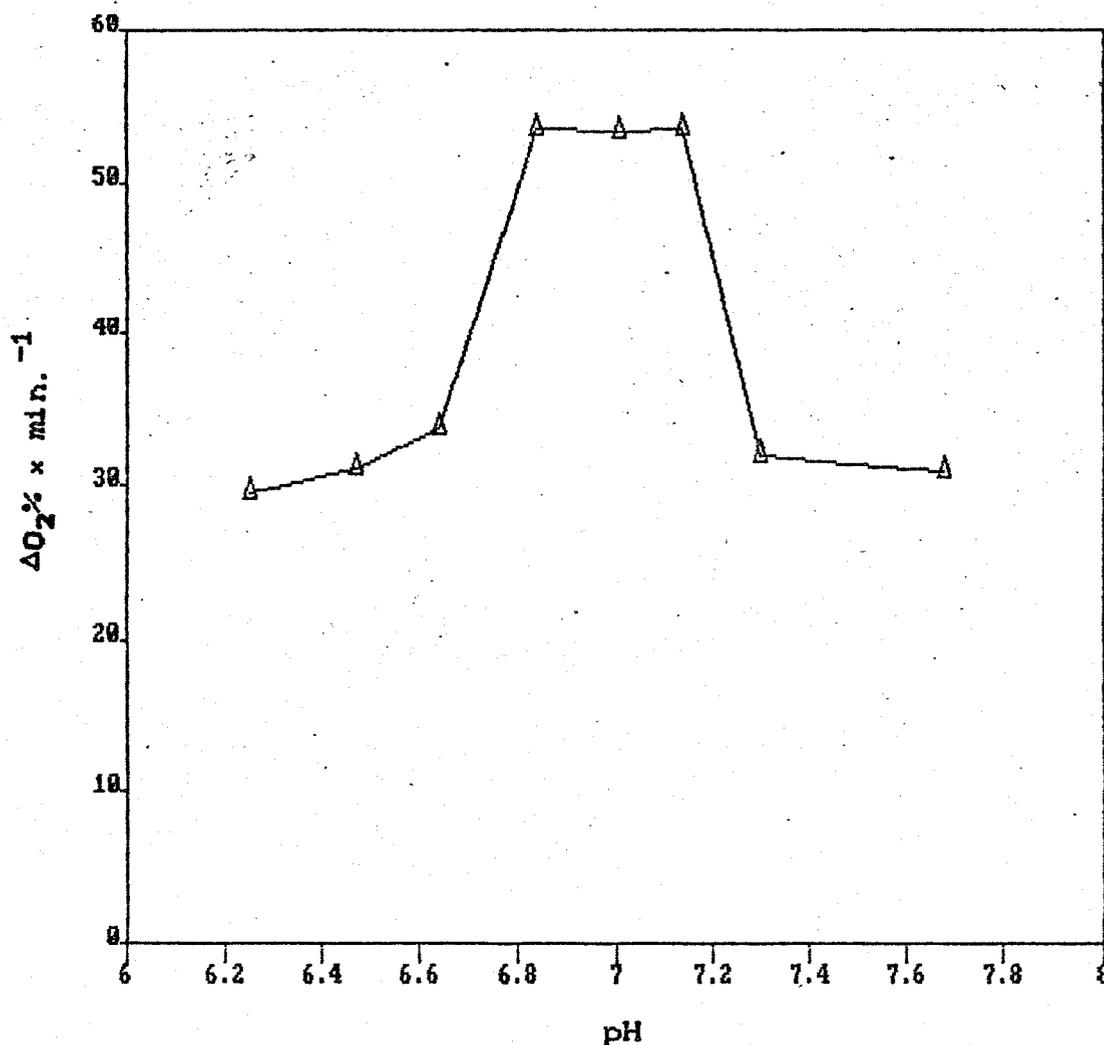


Figura 14 - Efeito do pH no eletrodo enzimático. Gráfico $\Delta O_2\% \times \text{min}^{-1}$ Vs. Variação do pH (K_2HPO_4 / NaH_2PO_4 ; 0,1 MD. Condições: 0,5 ml de solução tampão, temperatura de medida 28,0 °C; soluções saturadas de oxigênio, com adições de 20 μl de β -D-Glicose 50 mM. Volume final 0,5 ml. Concentração final 2,0 mM.

VI.D. Efeito da Concentração de Glicose

A concentração de glicose afeta a atividade enzimática da glicose oxidase e relaciona-se com a sensibilidade do eletrodo [10,11]. A determinação da constante de Michaelis-Menten aparente (K_m) é um parâmetro que indica a faixa ótima de concentração de glicose, relacionando-se na prática com a curva de calibração do eletrodo.

VI.D.1. Determinação da Constante de Michaelis-Menten

Determinou-se o K_m da glicose oxidase imobilizada e solúvel. Com os resultados experimentais obtidos para calcular os parâmetros K_m e V_{max} , utilizou-se a equação de Lineaweaver Burk, construindo-se o gráfico $1/V$ Vs. $1/S$ como ilustra a figura 15, e os resultados obtidos são apresentados na tabela 2. Onde S é a concentração de glicose em moles por litro (M) e V variação da pressão parcial de oxigênio por minuto ($\Delta O_2\% \times \text{min.}^{-1}$).

Tabela 2- Resultados da determinação de K_{map} e V_{max} para glicose oxidase solúvel e imobilizada. Através da equação de Lineaweaver Burk.

glicose oxidase	K_m mM	V_{max} ($\Delta O_2 \times \text{min}^{-1}$)
imobilizado (600U)	3,1	$1,2 \times 10^3$
solúvel (600U/ml)	3,6	$2,0 \times 10^3$

VI.D.2. Curva de Calibração

A curva de calibração abrange uma faixa linear de $8,0 \times 10^{-5}$ à $1,0 \times 10^{-3}$ M de glicose conforme mostra figura 16, com adições de 20 μ l de solução padrão de glicose, com concentrações que variam de 2,0 à $30,0 \times 10^{-3}$ M em condições iguais aos ensaios anteriores (tampão fosfato pH : 6,89; 0,1 M saturadas de oxigênio e temperatura 28°C), medindo-se a variação de pressão parcial do oxigênio por minuto.

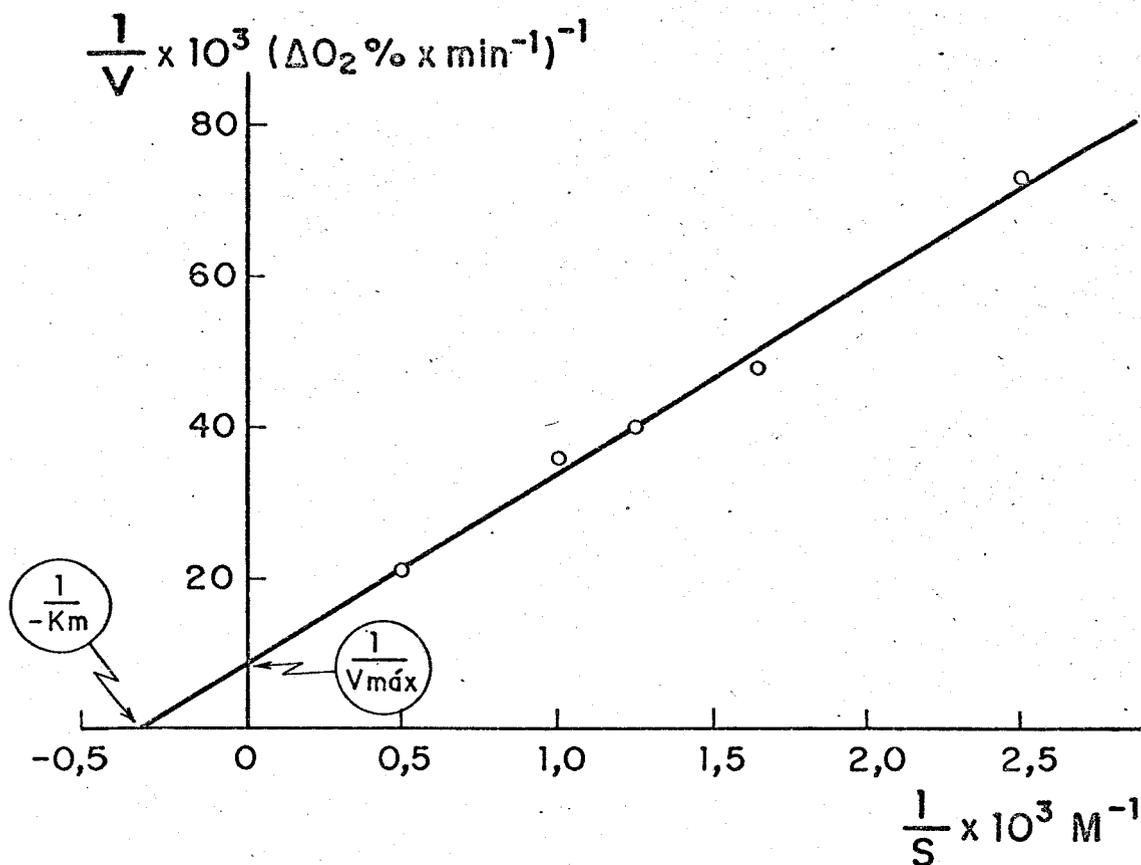


Figura 15 - Determinação da constante de Michaelis-Menten aparente (K_m) para a GOD imobilizada (600U) em colágeno. Gráfico $1/V$ Vs. $1/S$. Obtendo K_m pela equação de Lineweaver-Burk, $K_m = 3,1$ mM, $V_{\text{max}} = 1,2 \times 10^3 \Delta O_2\% \times \text{min}^{-1}$. Condições 0,5 ml de tampão fosfato 0,1M pH 6,89; saturado com oxigênio (ar), temperatura 28,0 °C.

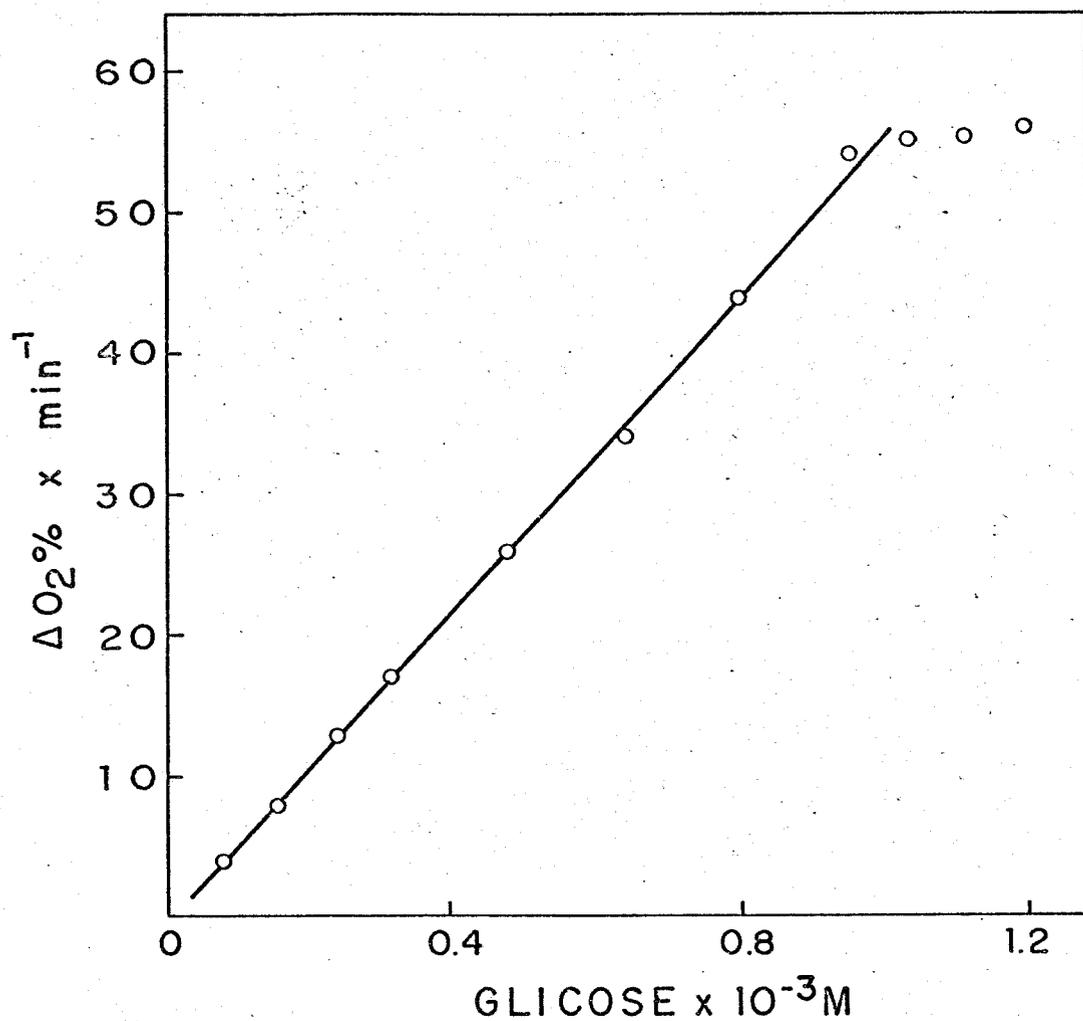


Figura 16 - Curva de calibração para o eletrodo enzimático, gráfico $\Delta O_2\% \times \text{min}^{-1}$ Vs concentração de glicose; adições de 20 μl de β -D-Glicose na micro célula com 0,5 ml de tampão fosfato 0,1M pH 6,89; saturado com oxigênio (ar), temperatura 28,0 °C.

VI.E. Estabilidade

Para estudo de estabilidade da membrana enzimática construída, foi realizada a comparação com uma membrana comercial da firma americana Universal Sensors. Resolveu-se acoplar as membranas pelo método convencional, que é o empregado no eletrodo comercial, para melhor comparação.

No tempo de utilização do eletrodo em dias, estão considerados as análises com padrões e com as amostras de café solúvel, assunto discutido á seguir. O eletrodo construído teve um tempo de vida útil de 11 dias com total de 320 análises, enquanto que o comercial teve 8 dias com total de 210 análises possíveis. Após cada dia de uso os eletrodos foram armazenados em tampão fosfato 0,1M pH 6,89 à 4°C. A comparação dos dois eletrodos está representada na figura 17.

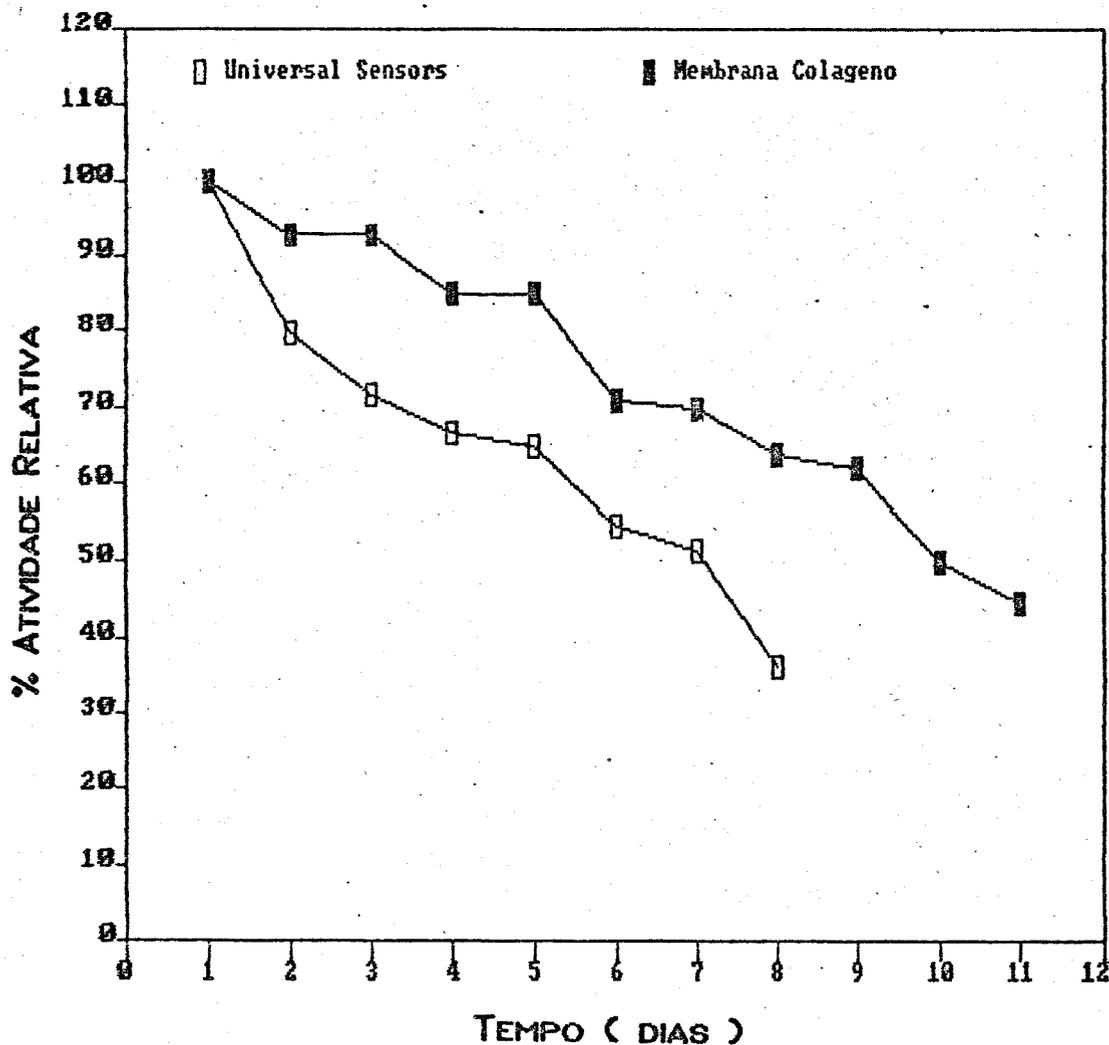


Figura 17 - Estabilidade do eletrodo enzimático (acoplamento convencional, figura 10A). Comparação entre o eletrodo comercial (Universal Sensors Inc.) (□) e o eletrodo construído no laboratório (■) (GOD imobilizada 600U em colágeno). Medida de atividade relativa Vs. Tempo em dias de uso contínuo. Condições pH : 6,89 e temperatura 28,0°C, com adições de 20 µl de β-D-Glicose 4 mM. Volume final 0,5 ml. Concentração final $1,6 \times 10^{-4}$ M.

VI.F. Estudo de Interferentes

A combinação da alta especificidade da glicose oxidase com o eletrodo de oxigênio tipo Clark torna este tipo de eletrodo enzimático altamente seletivo. Uma vez que o eletrodo de oxigênio empregado não sofre a interferência de substâncias eletroativas, os possíveis interferentes serão aqueles que afetam a atividade da glicose oxidase. Entre eles estão : Ag^+ , Hg^{2+} , Cu^{2+} , p-cloro benzoato de mercúrio e fenil acetato de mercúrio; que são substâncias que reagem com os grupos S-H presentes no sítio ativo da enzima [10].

Como outros açúcares, 2-desoxi-D-glicose, D-manose, D-galactose e D-xilose, reagem com a glicose oxidase. Decidiu-se estudar a interferência daqueles três últimos, adicionado 20,0 μl de soluções contendo 4,0 mM de glicose mais o açúcar interferente; os resultados estão apresentados na tabela 3.

Tabela 3- Efeito de outros açúcares interferentes no eletrodo enzimático (acoplamento lateral figura 10B). Condições: adição de 20,0 µl solução contendo 4,0 mM de Glicose mais o açúcar interferente. Célula com 0,5 ml de tampão fosfato (0,1M; pH 6,88) e 28,0 °C. Concentração final de glicose $1,6 \times 10^{-4}$ M.

Açúcar	Conc. mM	Conc. de glicose Encontrado (n = 5)		% erro relativo
		X	s	
D(+)-Manose	20	2,5	0,18	-37
	10	3,9	0,18	-2,5
	6,0	4,0	0,20	
D(+)-Galactose	30	5,5	0,20	37
	20	3,9	0,20	-2,5
	10	3,9	0,25	-2,5
D(+)-Xilose	60	2,9	0,44	-28
	50	3,9	0,11	-2,5
	6,0	3,9	0,12	-2,5

VI.G. Conclusões

O efeito da temperatura apresentou um máximo de resposta à 28,0°C, sendo que acima e abaixo desta temperatura a resposta diminui (figura 13).

Aumentando a temperatura de 20,0 à 28,0°C aumenta a atividade da enzima e o processo de permeação de oxigênio pela membrana de polipropileno. Acima de 28,0°C o oxigênio dissolvido provavelmente sofre um processo de volatilização, diminuindo assim a sua concentração, afetando a segunda etapa do mecanismo de reação da glicose oxidase (equação 14) diminuindo a velocidade de reoxidação do FADH_2 pelo O_2 , afetando conseqüentemente; a oxidação da glicose na primeira etapa (equação 13).

Diferentemente Guilbault e Lubrano [20] estudaram o efeito da temperatura de 10 à 50°C, para a glicose oxidase immobilizada por ligação covalente com formação de diazo derivados, e concluíram que aumentando a temperatura aumentava a atividade da enzima. Constantinides e colaboradores [39] decreveram que numa variação de temperatura de 40 à 45°C, o valor absoluto do coeficiente de temperatura para o glicose oxidase solúvel e immobilizada em colágeno são respectivamente 9,9 e 3,3 Kcal/g mol (a temperaturas menores os valores são praticamente iguais). Isto é uma forte evidência que a enzima na forma immobilizada é mais estável, e as energias de ativação,

estimadas através do gráfico de Arrhenius, são quase iguais para a enzima solúvel e imobilizada [40].

Neste trabalho a utilização do eletrodo à 28,0°C além de manter na temperatura ótima de resposta do eletrodo, evita a desnaturação excessiva da enzima e deste modo aumenta a durabilidade [10,11]. Para a reprodutibilidade do resultados analíticos, é importante, portanto, um controle adequado da temperatura.

O pH ótimo para a glicose oxidase imobilizada está numa faixa restrita de 6,84 à 7,14. Outros autores estudando o efeito do pH para a enzima solúvel numa faixa de pH 4 à 7 encontraram um máximo por volta de 5,5. Isto significa uma diferença de aproximadamente 1,5 unidades de pH para a enzima imobilizada. Segundo Guilbaut e Lubrano [20] este resultado não é de todo imprevisto, pois o perfil pH versus atividade de um derivado polianiónico de várias enzimas apresenta este efeito em força iônica baixa.

A composição química e a micro estrutura da membrana de colágeno faz com que ela seja carregada negativamente atraindo ions H^+ , mantendo o pH "local" (região de interface da membrana) menor que no resto da solução [13]. E segundo Weibel e Bright [41] na redução da glicose oxidase solúvel existem cineticamente dois estados significantes de ionização E_r ($GOD-FADH_2$) e E_r^- ($GOD-FADH_2^-$). A rápida reoxidação de E_r para regenerar E_o ($GOD-FAD$), é predominante em pH menores que 7. Valores de pH acima de 7, provocam uma rápida reação do E_r^- com O_2 , levando à formação e $E_r^{\cdot-}$, espécie não reativa para

glicose.

A diferença pouco significativa na constante aparente de Michaelis-Menten entre a enzima imobilizada e solúvel, 3,1 e 3,6mM respectivamente, confirma que o colágeno é um material adequado para a imobilização desta enzima.

Thévenot e colaboradores [42] determinaram K_m encontrando o valor de 3 mM, para a glicose oxidase imobilizada em colágeno através da ativação da membrana formando diazo derivados e posterior acoplamento da enzima. Isto significa que o método de imobilização utilizado não provocou alterações na glicose oxidase.

Porém os valores de V_{max} da enzima imobilizada e solúvel, respectivamente 1,2 e $2,0 \times 10^3 \Delta O_2\% \times \text{min}^{-1}$, diferem, pois a enzima solúvel tem menor resistência no transporte de massa (substrato e produtos) na solução [13], e para a enzima imobilizada este efeito é maior. Mas a membrana de colágeno caracteriza-se por sua grande capacidade de absorver água, e em pH neutro chega a absorver a nível de 100 % de seu peso seco, esta dilatação faz com que se minimise a resistência intramolecular na difusão dos substratos e produtos [13].

A curva de calibração do eletrodo se enquadra nas considerações teóricas da cinética enzimática, a região linear da curva de calibração de $8,0 \times 10^{-5}$ a $1,0 \times 10^{-3}$ M de glicose (figura 16) sugere uma reação cinética de pseudo primeira ordem, sendo o K_m 3,1 mM pode-se verificar também pela relação $S \leq 0,1 K_m$ (capítulo II). A região linear da curva de calibração abrange concentrações adequadas

para as determinações de glicose em amostras reais.

A estabilidade do eletrodo construído é melhor ao comercial, com a vantagem de que a membrana de colágeno e o método de imobilização garantem à glicose oxidase um ambiente altamente favorável com baixa desnaturação (figura 17), num total de 320 análises, considerado de boa performance para eletrodos enzimáticos [10 - 12].

O estudo de interferentes confirmou a especificidade da glicose oxidase frente a outros açúcares. Gibson e colaboradores [43], estudaram a cinética e o mecanismo de ação da glicose oxidase solúvel frente aos açúcares 2-desoxi-D-glicose, glicose, manose, galactose, e xilose. Para a 2-desoxi-D-glicose o K_m encontrado foi 0,04 M à 25°C pH 5,5, demonstrando uma significativa afinidade para este açúcar. Para manose, galactose e xilose foram determinadas apenas as constantes cinéticas k_1 , referentes à formação do complexo Er P (Enzima reduzida-Produto), e os valores encontrados foram respectivamente 22, 8 e 3, $M^{-1} \text{seg}^{-1}$.

Comparando os valores das constantes k_1 com os limites de concentração dos açúcares interferentes (tabela 3), 10, 20, 50 mM respectivamente manose, galactose e xilose, observa-se uma correlação de tal ordem que a afinidade da glicose oxidase imobilizada obedece a seguinte sequência : manose > galactose > xilose, e nesta ordem estão de acordo com a grandeza dos valores de k_1 .

Açúcares como a celobiose e maltose podem interferir devido

à presença de outras enzimas hidrolíticas na preparação da glicose oxidase [10]. A enzima utilizada contém quantidades insignificantes dessas enzimas, sendo mais freqüente a maltase e galactose oxidase, representando 2,0 % e 1,2 % da atividade da GOD respectivamente [44], o que explicaria o erro positivo para a galactose na concentração de 30mM. Através da tabela 3 verifica-se a alta seletividade do eletrodo, para açúcares de peso molecular iguais à glicose como a manose e galactose.

Dependendo da amostra real a ser analisada estes limites de interferêntes não influem praticamente nos resultados das análises, conforme verificou-se nas determinações de glicose em café solúvel.

O produto da reação enzimática ácido glicônico (D-glicano- δ -lactona), é um inibidor fraco na oxidação da glicose, visto que 5×10^{-4} M de glicose e 5×10^{-2} M de D-glicano- δ -lactona afeta 30 % na reação em tampão fosfato 0,2 M, pH 6,3 para minimizar mudanças de pH provocadas pela hidrólise espontânea da lactona [43].

Capítulo VII

Aplicação do Eletrodo Enzimático

Determinação de Glicose em Café Solúvel

VII.A. Introdução

Para a aplicação do eletrodo enzimático em amostras reais, decidiu-se analisar amostras de café solúvel, devido à importância desta determinação e à falta de métodos alternativos.

VII.A.1. Importância da Análise

Embora a indústria nacional de café solúvel tenha se expandido nos últimos anos, ela ainda se ressentir de métodos analíticos eficientes e rápidos, para estabelecimento de parâmetros de qualidade. A maior dificuldade para o controle de qualidade do café em geral, e do solúvel em particular reside na grande variedade de tipos de grãos e portanto de produtos disponíveis para o comércio.

Esse fato se reveste da maior importância, quando se nota

que a maior parte da produção brasileira se destina a países, como os Estados Unidos e Japão, extremamente exigentes em termos de qualidade de produto. Dentre aqueles parâmetros de qualidade, os teores de açúcares (glicose, frutose, etc), se constituem em bases indicadores da boa qualidade do produto.

A determinação de carboidratos como a glicose, em materiais tão complexos como o café, se configura como verdadeiro desafio analítico. Métodos gerais para determinação de açúcares redutores, como o do reagente Fehling, não apresentam especificidade, sensibilidade e reprodutibilidade adequadas.

Os métodos cromatográficos, em papel e camada delgada, exigem purificação extensiva e demorada da amostra, antes da análise. Na cromatografia gasosa além da purificação da amostra, a pouca volatilidade dos açúcares exigem reações de derivação.

A cromatografia líquida de alta eficiência, apesar de não precisar de derivação possui limitações sérias, principalmente quando se tratam extratos contendo materiais poliméricos, com baixo teor de açúcar livre; materiais proteicos se ligam à coluna e alguns polissacárideos podem precipitar na fase móvel. Com exceção dos detectores de massa, os demais, como UV, têm sensibilidade pobre e estão sujeitos a interferências [45, 46].

VII. A. 2. Procedimento Analítico - Resultados e Discussões

Pesar exatamente cerca de 2,0 g do café solúvel, dissolver em 100,0 ml de água destilada. Um volume de 20 μ l desta solução são adicionados à microcélula com 0,5 ml de tampão fosfato (pH 6,89; 0,1 M, saturada com O_2 à 28,0°C.). Utilizou-se eletrodo comercial da Universal Sensors (USA) acoplado-se a membrana pelo método convencional. Em seguida foram realizadas medidas de $\Delta O_2\%$ após 5 minutos à adição da amostra, com aproximadamente 2 minutos de estabilização de uma análise para outra. Para fins comparativos, empregou-se o método da AOAC (Association of Official Analytical Chemistry) [47, 48].

A tabela 4 apresenta a reprodutibilidade do eletrodo construído na análise do café solúvel marca Nestlé Casa Grande com baixo teor de glicose na amostra.

Comparando os resultados das análises para a mesma amostra pelos métodos AOAC e eletrodos enzimáticos importado e deste trabalho, nota-se que não há diferença significativa entre eles, segundo a tabela 5.

A tabela 7 mostra os resultados comparativos entre os métodos AOAC e eletrodo enzimático com a membrana acoplada pelo método proposto, para a determinação de seis amostras de cafés solúveis de consumo interno. Apresentando o provável período de fabricação dos produtos, com os respectivos teores expressos em média de 5 análises e a estimativa do desvio padrão (s), para os dois métodos.

Tabela 4 - Reprodutibilidade para o Eletrodo Enzimático*, para determinação de glicose em amostra de café solúvel (Nestlé-Casa Grande 04/89) n = 5 .

ensaio	$\Delta O_2\% \times \text{min}^{-1}$	mg glicose	teor % m/m
1	6,0	31	2,9
2	6,0	31	2,9
3	5,0	27	2,5
4	5,0	27	2,5
5	5,0	27	2,5

$$\bar{X} = 2,7 \quad s = 0,27$$

* com membrana de colágeno, acoplado pelo método convencional (figura 10A).

Tabela 5 - Resultados obtidos de 5 análises para a determinação de glicose na amostra café solúvel (Nestlé-Casa Grande 04/89).

Método		
AOAC teor % m/m	Eletrodo US ^a teor % m/m	Eletrodo Enzimático teor % m/m
2,2	2,6	2,5
2,4	2,4	2,5
2,5	2,8	3,0
2,6	2,4	2,5
2,9	2,8	3,0
X = 2,5 s = 0,25	X = 2,6 s = 0,20	X = 2,7 s = 0,27

^a com a membrana acoplado pelo método convencional (figura 10A).
Eletrodo Comercial da Universal Sensors.

Tabela 6 - Resultados das análises empregando os métodos AOAC e Eletrodo Enzimático (membrana de colágeno acoplada lateralmente, figura 10B) determinação de glicose em amostras de café solúvel (n = 5).

Amostra	Método	teor % m/m				
		1	2	3	4	5
Iguaçu Ago/90	AOAC	14,8	15,2	15,2	15,2	14,8
	Eletrodo	15,4	15,4	15,9	15,9	15,4
Casa G. Abr/90	AOAC	6,7	7,0	6,7	7,0	7,0
	Eletrodo	7,1	7,5	7,1	7,5	7,1
Tradição Fev/90	AOAC	5,5	6,0	6,0	5,9	6,4
	Eletrodo	5,7	5,7	5,7	6,0	5,7
Tradição Ago/90	AOAC	5,6	6,0	6,0	5,9	6,4
	Eletrodo	5,5	5,8	5,8	6,0	5,7
Requinte Ago/90	AOAC	5,3	5,7	5,8	6,0	5,8
	Eletrodo	5,4	5,4	5,4	5,6	5,2

Tabela 7 - Resultados obtidos a partir das Tabelas 5 e 6, comparando os métodos AOAC e Eletrodo Enzimático para determinação de glicose em café solúvel (n = 5).

Amostra	Fabricação	Eletrodo ^b		AOAC	
		teor % m/m		teor % m/m	
		\bar{X}	s	\bar{X}	s
Iguaçu	Ago/90	16	0,27	15	0,22
Casa Grande	Abr/89	2,7	0,27	2,5	0,25
Casa Grande	Abr/90	7,3	0,22	6,9	0,16
Tradição	Fev/90	5,8	0,13	6,0	0,37
Tradição	Ago/90	5,8	0,18	6,0	0,28
Requinte	Ago/90	5,4	0,14	5,7	0,14

^b com a membrana de colágeno acoplada método proposto (figura 10)

Os resultados obtidos na análise de café solúvel, demonstraram a viabilidade da utilização do eletrodo enzimático. O método da AOAC, método geral Munson-Walker de determinação de glicose em amostras de alimentos, tem boa precisão e exatidão, porém é bastante trabalhoso e demorado [23]. Os resultados obtidos na análise de café solúvel com eletrodo enzimático são comparáveis com o método da AOAC. A figura 18 mostra o gráfico comparativo dos dois métodos com o coeficiente de correlação de 0,9940 e a equação da reta $y = 0,3674 + 0,9461 x$.

A utilização do eletrodo enzimático para esta análise apresenta várias vantagens, como a simplicidade do preparo da amostra, rapidez e baixo custo por análise.

Os diferentes teores de glicose para as amostras analisadas apresentados na tabela 7 estão condizentes com a dificuldade do controle de qualidade do café solúvel.

A diferença existente nos resultados da análise da amostra de café solúvel Casa Grande realizado em 1989, com teor de 2,7%, para outra amostra do mesmo tipo porém realizado em 1990, com teor de 7,3%, poderia ser explicado pela mudança do grau de torrefação ou do tipo de grão utilizado como matéria prima [45, 49].

Já duas amostras do tipo Tradição com diferença de seis meses de fabricação no mesmo ano, não apresentaram alteração significativa nos teores de glicose, indicando que provavelmente não houve alteração no grau de torrefação ou tipo de grão.

Os teores de glicose encontrados nas amostras da marca Nestlé fabricados no mesmo ano, estão de acordo com o grau de torrefação dos grãos (quanto maior o grau, maior o teor de açúcares [49]), em ordem decrescente de teor de glicose as amostras ficam colocados na seguinte seqüência: Casa Grande 7,3%, Tradição 5,8% e Requite 5,4 %; a mesma segundo o grau de torrefação apresentado pelo fabricante. Porém não se deve levar em consideração somente o grau de torrefação, mas também o tipo de grãos de café, a composição e os métodos de elaboração do produto final ("spray dry" ou liofilização); que podem alterar os teores de açúcares [46 - 49].

O café solúvel Iguazu é uma incógnita, com o teor de glicose mais alto 16% entre as amostra analisadas, não existindo a minima informação sobre o produto. O aspecto físico é de um pó mais fino de cor marrom mais clara que o Requite (Menor teor de glicose encontrado e o menos torrado entre os três produtos analisados da marca Nestlé). Um fato curioso é com respeito às pessoas (consumidor comum) que provaram as amostras de cafés solúveis, com maior preferência de sabor e aroma para este produto.

Este fato provavelmente pode ser esclarecido pela ocorrência da reação de Maillar, onde substâncias redutoras como os açúcares, formam produtos de condensação com os amino ácidos durante o processo de elaboração, e estes produtos, açúcares-amino ácidos, influenciam no sabor e aroma do café solúvel [48].

O teor de glicose é um dos parâmetros de qualidade do café solúvel, porém para se chegar à conclusão da boa ou má qualidade necessitam-se outras determinações de teores de, por exemplo: amino ácidos, frutose, sacarose, etc., compostos nitrogenados e outros [45 - 49], e informações do fabricante como, tipo de grão, safra, grau de torrefação e o processo de elaboração.

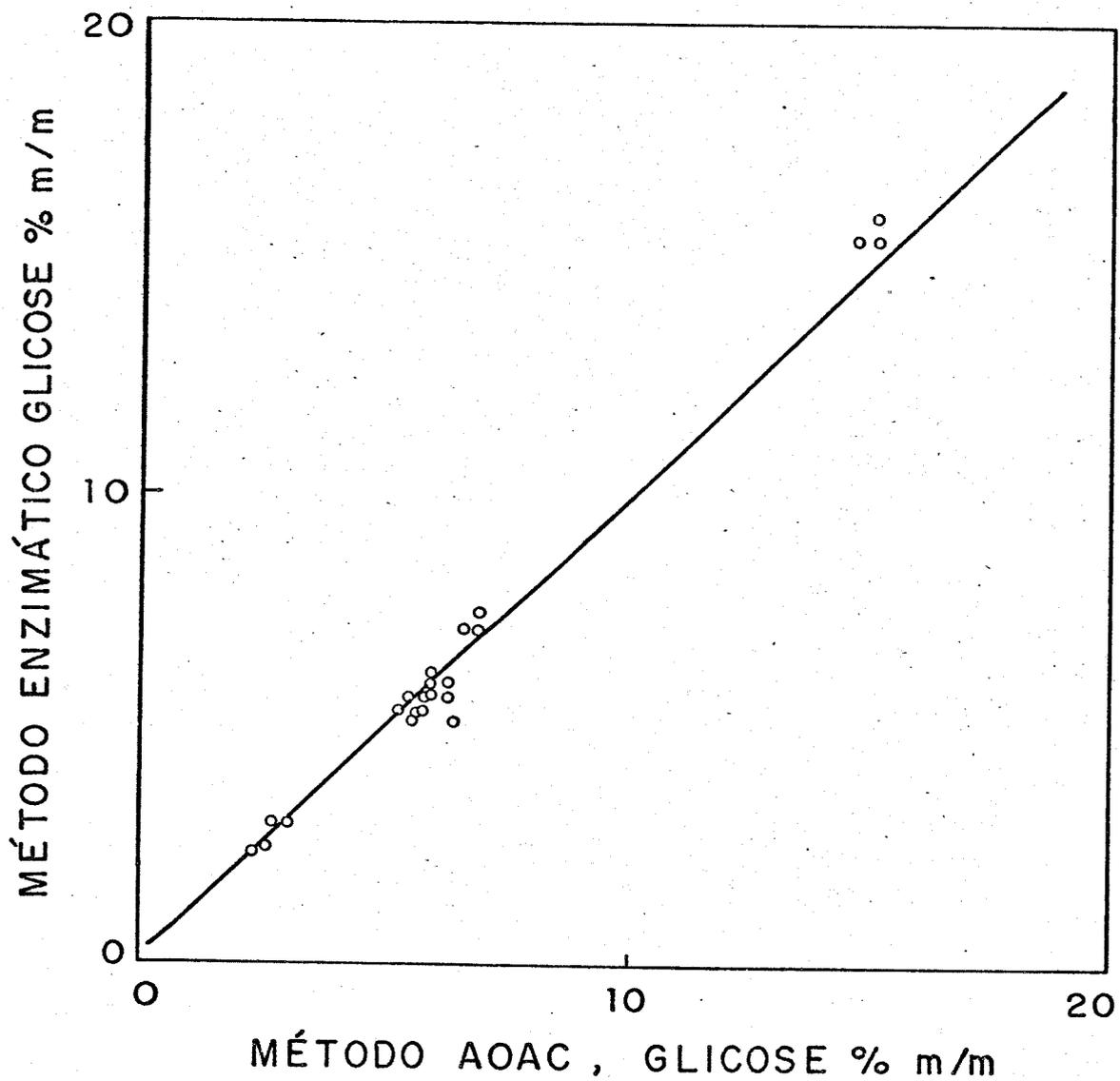


Figura 19- Gráfico comparando os dois métodos com Eletrodos Enzimáticos Vs método AOAC. Com a equação da reta $y = 0,3674 + 0,9461 x$; e coeficiente de correlação 0,9940.

DETALHES EXPERIMENTAIS E MATERIAIS

A. Equipamentos

- Potenciostato-Galvanostato FAC-200, acoplado a microcomputador PC-Prológica 16-Solution com impressora matricial Grafix FT 80.
- Eletrodo de oxigênio (FAC 204-a LAB. O₂ ANALYSER).
- Registrador X-t (E.C.B. modelo RB 201).
- Banho termostaticado Modelo 100-FANEM.
- Agitador magnético não eletrônico.
- Bomba de ar (Betta Silente)

B. Eletrodos

- Referência : Ag/AgCl (marca Ingold) contendo KCl 3M como eletrólito.
- Trabalho : disco de Platina, diâmetro : 0,5 cm ;Ingold.
- Auxiliar : fio de platina.

C. Reagentes

Todos os reagentes utilizados foram de pureza analítica.

- Glicose oxidase (Aspergillus niger, Tipo VII, 134 U/mg de sólido, Sigma).

- Soroalbumina (Merck).
- Glutaraldeído 25% (Merck).
- Pirrol (Aldrich Chemical C.O.) destilado e estocado em atmosfera de nitrogênio.
- α -D-Glicose (Sigma).
- D (+) Manose (Merck).
- D (+) Galactose (Fisher).
- D (+) Xilose (Fisher).

D. Materiais

- Membrana de colágeno, espessura 0,02 mm, desenvolvida pela Johnson e Johnson de Jaguariuna, S.P.
- Software desenvolvido no IQ - Unicamp, para programação experimental e para armazenamento e tratamento dos resultados obtidos em voltametria cíclica.
- Pipeta automática de 20 μ l e 50 μ l (Cacil).
- Microseringa de 10 μ l (Scientific Glass Engineering PTY. LTD.).
- Solução para a calibração do eletrodo amperométrico de oxigênio, consiste de 0,1M de meta bissulfito de sódio em tampão borato pH 9,2, onde o $P\text{O}_2$ é zero ou 0%.
- Soluções de α -D-glicose após a preparação, foram colocadas em equilíbrio durante 24 horas, para a mutarotação (β -D-glicose).

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- (1)- Kulys, J.; Biosensors, 2, 3, (1986).
- (2)- Turner, A.P.F.; Karube, I.; Wilson, G.S.; Eds;
"Biosensor: Fundamental and Applicatinos"; Oxford
University Press, Oxford (1987).
- (3)- Arnold M.A.; Meyerhoff, M.E.; Critical Reviews in
Analytical Chemistry; 20, 149, (1988).
- (4)- Kulys, J.; Laurinavicius, V.; Pesliakienem, M.,
Gureviciene, V.; Biotechnology an Applied
Biochemistry; 11, 149, (1989).
- (5)- Clark, L.; Lyons, C.; Ann. N.Y. Acad Sci; 102,
29, (1962).
- (6)- Updike, S.J.; Hicks, G.P.; Nature; 214, 986, (1971).
- (7)- Oliveira Neto, G.; Yamanaka, H.; Química Nova, 11, 423,
(1988).

- (8)- Bennet, T.P.; Frieden, E.; "Tópicos Modernos de Bioquímica, Estrutura e Função das Moléculas Biológicas", Ed. Edgard Blücher Ltda, São Paulo, 4, (1971).
- (9)- Lehninger, A. L.; "Bioquímica: Componentes Moleculares das Células", vol.1, Ed. Edgard Blücher Ltda, São Paulo, 127, (1976).
- (10)- Guilbault, G. G.; "HandBook of Enzymatic Methods of Analysis", Marcel Dekker, Inc, New York (1976).
- (11)- Guilbault, G.G.; Oliveira Neto, G; "Immobilised Enzyme Electrodes", in "Immobilised Cells an Enzymes", Marcel Dekker Inc., New York, 75, (1984).
- (12)- Wingard Jr.; L. B.; "Eletrochemical Techniques with Immobilised Biological Materals", in "Immobilised Cells and Enzymes", Marcel Dekker Inc., New York, 75, (1984).
- (13)- Vieth, W.R.; Ventasubramanian, K.; "Collagen-Immobilized Enzymes Systems", in "Methods in Enzimology"; 44, 243, (1976).

- (14)- Bartlett, P.N.; Whitaker, R.G.; J. Electroanal. 224,
37, (1987).
- (15)- Bartlett, P.N.; Whitaker, R.G.; J. Electroanal. 224,
27, (1987).
- (16)- Foulds N.C.; Lowe, C.R.; J. Chem. Soc. Faraday trans.,
82, 1259, (1986).
- (17)- Lehninger, A. L.; "Bioquímica: Enzimas de
Oxido-redução e Transporte de Elétrons", vol. 2, Ed.
Edgard Blücher Ltda, São Paulo, 127, (1976).
- (18)- Evans, D.H.; O'Connell, K.M.; Petersen, R.A.; Kelly, M.J.;
J. Chem. Education; 60, 290, (1983).
- (19)-Guilbault, G.G.; Lubrano, G.T.; Anal. Chim. Acta, 60,
255, (1972).
- (20)-Guilbault, G.G.; Lubrano, G.T.; Anal. Chim. Acta, 64,
439, (1973).
- (21)- Umaña, M.; Waller, J.; Anal. Chem., 58, 2979, (1986).

- (22)- Nagy, G.; Von Storp, L.H., Guilbault, G.G.; Anal. Chim. Acta; 66, 443, (1973).
- (23)- Xu, Y., Guilbault, G. G.; Anal. Chem.; 61, 782, 1989.
- (24)- Havas, J. "Ion and Molecule-selective Electrodes in Biological Systems" in "Molecule-Selective Electrodes and Sensors and Their Applications"; Akadémiai Kiadó-Budapest; 172, (1985).
- (25)- Kalvoda, R.; "Electroanalytical Methods in Chemical and Environmental Analysis"; Plenum Press. New York and London SNTL- Publishers of Technical Literature, 184, (1987).
- (26)- Albery, W.J.; Bartlett, P.N.; J. Electroanal. Chem., 194, 211, (1985).
- (27)- Albery, W.J.; Bartlett, P.N.; J. Electroanal. Chem., 194, 223, (1985).
- (28)- Ikariyama, Y.; Heineman, W.R.; Anal. Chem., 58, 1603, (1986).

- (29)- Shimidzu, T.; Ohtani, A.; Iyoda, T.; Honda, K.; J. Electroanal. Chem., 224, 123, (1987).
- (30)- Degani, Y.; Heller, A.; J. Phys. Chem.; 91, 1285, (1987).
- (31)- Swoboda, B.E.P.; Massey, U.; J. Biol. Chem.; 240, 2209, (1965).
- (32)- Mizutani, F.; Asai, M.; Bull. Chem. Soc. Jpn., 61, 4458, (1988).
- (33)- Foulds N.C.; Lowe, C.R.; Anal. Chem.; 60, 2473, (1988).
- (34)- Hale, P.D.; Inagki, T.; Kara, H.I.; Okamoto, Y.; Skotheim, T.A.; J. Am. Chem. Soc.; 11, 3482, (1989).
- (35)- Kitani, A.; Miller, L.L.; J. Am. Chem. Soc.; 103, 3595, (1981).
- (36)- Yamanaka, H.; "Estudo das Aplicações Analíticas da Malato desidrogenase Imobilizada"; Tese de Doutorado I. Q. -USP, Fev./1989.

- (37)-Rahni, M.A.N.; Guilbault, G.G.; Oliveira Neto, G.;
Anal. Chim. Acta; 181, 219, (1986).
- (38)- Winartasaputra, H.; Mallet, V.N.; Kuan, S.S.; Guilbault,
G.G.; Clin. Chem.; 26, 613, (1980).
- (39)- Constantinides, A.; Veith, W.R.; Fernandes, P.M., Mol.
Cell. Biochem., 1, 127, (1973).
- (40)- Venkatasubramanian, K.; Veith, W.R.; Wang, S.S.; J.
Ferment. Technol.; 50, 600, (1972).
- (41)- Weibel, M.K.; Bright, H.J.; The Journal of Biological
Chemistry, 246, 2734, (1971).
- (42)- Theévenot, D. R.; Sternberg, R.; Coulet, P. R.;
Lauret, J.; Gautheron, D. C.; Anal. Chem., 51, 96,
(1976).
- (43)- Gibson, Q.H.; Swoboda, B.E.P.; Massey, V.; The J.
Biol. Chem., 239, 3927, (1964).
- (44)- Catálogo, "Sigma Chem. CO.", Product No. G-6125, 1 19
(1990/1991).
- (45)- "Coffee Chemistry Vol 1", edit. por R. J. Clarke e R.
Macrae, "Carbohydrates. Cap 3, por Trugo L. C."
Elsevier Applied Science Publi., London, 83, (1985).
- (46)- Angelucci, E.; et. al., Coletânea do Instituto de
Tecnologia de Alimentos, 8, 55, (1977).

- (47)- "Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists", 14th ed; Willians, S., Ed., Association of Official Analytical Chemists, Inc.: Washington. DC, 1984.
- (48)- Angelucci, E., "Análise Química do café" ITAL-Campinas, 8, 44, (1982).
- (49)- Angelucci, E.; et. al., Coletânea do Instituto de Tecnologia de Alimentos, 5, 281, (1973/1974).
- (50)- Chen, L.; Lin, M.S.; Hara, M. e Rechnitz, G.A.; Anal. Lett., 24, 1, (1991).
- (51)- Malitesta, C.; Palmisano, F.; Torsi, L. e Zambonin, P.G.; Anal. Chem. , 62, 2735, (1990).
- (52)- Yabuki, S.; Shinohara, H.; Ikariyama, Y. e Aizawa, M.; J. Electroanal. Chem., 277, 179, (1990).
- (53)- "Ion-Selective Electrode Methodology vol. II" edit por A. K. Covington, CRC Press, Boca Raton Florida, 10, (1984).
- (54)- Suzuki, S.; Karube, I. e Watanabe, Y.; em "Fermentation Technology Today" edit por G. Terui, Society of Fermentation Technology Japan, 375, (1972)