

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE QUÍMICA

Este exemplar corresponde à redação final da tese, defendida por Ivanildo Luiz de Mattos e aprovada pela Comissão Julgadora.

Campinas, 24 de Janeiro de 1995

Graciliano Neto

METODOLOGIAS EMPREGANDO SISTEMAS DE ANÁLISE POR INJEÇÃO EM FLUXO PARA DETERMINAÇÃO DE ESPÉCIES QUÍMICAS EM MATERIAIS DE RELEVÂNCIA INDUSTRIAL

TESE DE DOUTORADO

IVANILDO LUIZ DE MATTOS

Orientador: Prof. Dr Graciliano de Oliveira Neto

Co-orientador: Prof. Dr Elias A.G. Zagatto

CAMPINAS - 1994

À Márcia Regina e Rodrigo,
pelo amor e respeito!

"Todas as coisas têm seu tempo,
e todas elas passam debaixo do
céu segundo o termo que a cada
uma foi prescrito."

Eclesiastes, 3:1

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, sem cuja providência nada teria sido feito.

Agradeço à Universidade Estadual de Campinas por ter concedido esta oportunidade.

Agradeço ao Instituto de Química pelas facilidades oferecidas.

Agradeço ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico pelo apoio financeiro.

Agradeço a Tecnoyon - Instrumentação Científica pelo empréstimo de equipamentos durante a realização de parte deste trabalho.

Agradeço aos grandes amigos Prof. Dr Graciliano de Oliveira Neto e Prof. Dr Elias Ayres Guidetti Zagatto pela valiosa orientação.

Agradeço aos pesquisadores, alunos de pós-graduação e funcionários do Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de Sao Paulo pelas sugestões relevantes.

Agradeço aos docentes, alunos de pós-graduação e funcionários do Instituto de Química pelas oportunidades proporcionadas.

Agradeço aos Profs. Drs M. Valcárcel e M.D. Luque de Castro da Universidade de Córdoba (Espanha) e José Luis Costa Lima, e M. Conceição da Universidade do Porto (Portugal), pelas orientações durante minha permanência nestas Universidades.

Agradeço ao Dr Jorge Horii e Dr Luiz Carlos Basso da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" pelas amostras e análises realizadas de caldo de cana-de-açúcar.

Título: METODOLOGIAS EMPREGANDO SISTEMAS DE ANÁLISE POR INJEÇÃO EM FLUXO PARA DETERMINAÇÃO DE ESPÉCIES QUÍMICAS EM MATERIAIS DE RELEVÂNCIA INDUSTRIAL

Orientador: Prof. Dr Graciliano de Oliveira Neto

Co-orientador: Prof. Dr Elias A.G. Zagatto

Aluno: Ivanildo Luiz de Mattos

RESUMO

Metodologias empregando sistemas de análise por injeção em fluxo foram apresentadas para determinação de espécies químicas em materiais de interesse industrial.

Inicialmente, foi projetado um eletrodo tubular, seletivo a periodato, empregado para determinação de glicerol em sabões e similares. O método compreende a oxidação de glicerol pelo periodato com avaliação potenciométrica deste consumo. Posteriormente, foram propostas metodologias fundamentadas na associação de enzimas imobilizadas, glicerol dehidrogenase para determinação de glicerol (em vinho de mesa) e glicose oxidase para determinação de glicose/sacarose (em caldo de cana-de-açúcar) com sistema FIA.

Visando obtenção de maior sensibilidade e seletividade foram investigados os efeitos de variações em volumes injetados de amostra, comprimentos dos reatores, proporções entre fluxos carregador e confluyente, tempos de oxidação, valores de pH, etc.

A determinação de glicerol em sabões e similares empregando eletrodo seletivo a periodato foi conduzida no intervalo de concentração de 0 a

5000 mg/l de glicerol. Após avaliação estatística encontrou-se função $E(\text{mV}) = -6,91 + 0,07[\text{glicerol}]$ com coeficiente de correlação igual a 0,9996 e desvio-padrão relativo (d.p.r.) de 0,5% (N = 11, para solução-padrão de 2000 mg/l de glicerol). O estudo de dados analíticos pelo método dos mínimos quadrados revelou alta correlação entre os resultados referentes ao método proposto e ao de referência - titulação iodométrica (0,8999).

A determinação de glicerol em amostras de vinho fundamentando-se na reação de glicerol dehidrogenase foi conduzida no intervalo de concentração de 0 a 15 mg/l de glicerol. Após avaliação estatística encontrou-se função $I(\text{fl.}) = 0,71 + 2,75[\text{glicerol}]$ com coeficiente de correlação igual a 0,9988 e d.p.r. de 1% (N = 11, para solução-padrão de 6,0 mg/l de glicerol). A correlação entre os resultados referentes ao método proposto e ao de referência (cromatografia líquida de alta eficiência) foi de 0,9970.

A determinação amperométrica de glicose e/ou sacarose (após hidrólise ácida) baseando-se na reação enzimática de glicose oxidase foi conduzida no intervalo de concentração de 0,0 - 0,6 e 0,0 - 8,0 mmol/l em glicose e sacarose respectivamente. Após avaliação estatística foram encontradas as funções: $I(\text{nA}) = -0,68 + 31,6[\text{glicose}]$ com $r = 0,9992$ e d.p.r. de 1,2% (N = 11, para solução-padrão de 0,4 mmol/l em glicose); $I(\mu\text{A}) = 0,0002 + 0,02[\text{sac}] - 0,0007[\text{sac}]^2$ com $r = 0,9998$ e d.p.r. de 1,5% (N = 11, para solução-padrão 8,0 mmol/l em sacarose). As correlações envolvidas entre os resultados referentes ao método proposto e ao de referência (cromatografia/dionex) foram de 0,9888 (glicose) e 0,8978 (sacarose).

Os sistemas propostos processam as amostras, permitindo a análise

aproximadamente 40 amostras por hora, fornecendo resultados precisos (d.p.r. por volta de 1%) e concordantes com métodos convencionais.

As propostas apresentadas são simples em concepção e aplicação, e como não exigem controle de temperatura (para glicerol/periodato, glicose e sacarose), são bastante atraentes para emprego em análise em larga escala.

Title: METHODOLOGIES USING FLOW INJECTION ANALYSIS FOR DETERMINATION OF SPECIES IN INDUSTRIAL RELEVANCE MATERIALS.

Orientador: Prof. Dr Graciliano de Oliveira Neto

Co-orientador: Prof. Dr Elias A.G. Zagatto

Aluno: Ivanildo Luiz de Mattos

ABSTRACT

Methodologies employing flow injection system were presented for determination of chemical species in materials of industrial relevance.

Initially, a tubular periodate selective electrode was proposed and used for determination of glycerol in soaps and similar. The methodology refers to the glycerol oxidation by periodate with potentiometric evaluation of this consume. Latter on, flow based methodologies with enzymes immobilized were proposed with glycerol dehydrogenase for determination of glycerol (in wines) and glucose oxidase, for glucose/sucrose determination (in sugar cane juice).

To improve sensitivity and stability, several parameters were investigated such as samples injected volumes, dimension of the reactors, carrier-to-confluent flow ratios, available time for oxidation, pH values and others.

The glycerol determination in soaps and similar employing a tubular periodate selective electrode was realized in the interval of concentration of 0 to 5000 mg/l of glycerol. Statistics evaluation found $E(\text{mV}) = -6,91 + 0,07[\text{glycerol}]$

with correlation coefficient as 0,9996 and relative standard deviation (r.s.d.) of 0,5% (N = 11, for standard solution of 2000 mg/l of glycerol). The study of analyticals dados by method of least squares indicated a high correlation between the results associated to the proposed and reference methods - iodometric titration (0,8999).

The determination of glycerol in wine samples based on the glycerol dehydrogenase reaction was condused in the interval of concentration of 0 to 15 mg/l of glycerol. Statistics evaluation found $I \text{ (fl.)} = 0,71 + 2,75[\text{glycerol}]$ with correlation coefficient as 0,9988 and r.s.d. of 0,92% (N = 11, for standard-solution of 6,0 mg/l of glycerol). The correlation between the results associated to the proposed method and the reference (high performance liquid chromatography) was 0,9970.

The amperometric determination of glucose and/or sucrose (after acid hidrolisis) based on the glucose oxidase enzymatic reaction was condused in the interval of concentration of 0,0 - 0,6 and 0,0 - 8,0 mmol/l in glucose and sucrose respectively. Statistics evaluation found the functions: $I \text{ (nA)} = -0,68 + 31,6[\text{glucose}]$ with $r = 0,9992$ and r.s.d. of 1,2% (N = 11, for standard-solution of 0,4 mmol/l in glucose); $I \text{ (}\mu\text{A)} = 0,0002 + 0,02[\text{sucrose}] - 0,0007[\text{sucrose}]^2$ with $r = 0,9998$ and r.s.d. of 1,5% (N = 11, for standard-solution of 8,0 mmol/l in sucrose). The correlations related between the results associated to the proposed and reference methods (chromatography/dionex) were 0,9888 (glucose) and 0,8978 (sucrose).

The proposed systems process about 40 samples per hour, yielding precise results (r.s.d. about 1%) and in agreement with conventional methods.

The proposals presented are simple in conception and application, and as temperature control is not required (for glycerol/periodate, glucose and sucrose) they become particularly attractive for large scale analysis.

ÍNDICE GERAL

	página
RESUMO	i
ABSTRACT	iv
ÍNDICE DE FIGURAS	xi
ÍNDICE DE TABELAS	xiii
CAPÍTULO 1	
INTRODUÇÃO GERAL	1
CAPÍTULO 2	
DESENVOLVIMENTO DE ELETRODO TUBULAR SELETIVO A PERIODATO VISANDO DETERMINAÇÃO AUTOMATIZADA DE GLICEROL	5
1. METODOLOGIA	13
1.1. Preparação do eletrodo	13
1.2. Avaliação dos eletrodos convencional e tubular	16
1.2.1. Influência do pH	18
1.2.2. Verificação de espécies interferentes	18
1.3. Determinação de glicerol	18
1.3.1. Influência da concentração de periodato	19
1.3.2. Efeito do tempo de residência, força iônica e pH na reação de oxidação de glicerol	19
2. RESULTADOS E DISCUSSÃO	21
2.1. Avaliação dos eletrodos convencional e tubular	21
2.1.1. Influência do pH	24
2.1.2. Verificação de espécies interferentes	26
2.2. Determinação de glicerol	27

2.2.1. Influência da concentração de periodato	27
2.2.2. Efeito do tempo de residência, força iônica e pH na reação de oxidação de glicerol	30
CAPÍTULO 3	
DETERMINAÇÃO FLUORIMÉTRICA DE GLICEROL EM VINHOS EMPREGANDO SISTEMA DE ANÁLISE POR INJEÇÃO EM FLUXO E ENZIMAS IMOBILIZADAS	35
1. METODOLOGIA	48
1.1. Imobilização de enzimas em vidro de porosidade controlada	48
1.1.1. Imobilização de glicerol desidrogenase	49
1.1.2. Avaliação dos reatores enzimáticos	50
1.1.2.1. Influência da temperatura	54
1.1.2.2. Efeito do volume injetado, vazão, comprimento do reator enzimático e bobina	54
1.1.2.3. Influência do pH e da concentração de β -NAD	55
1.1.2.4. Verificação de espécies interferentes	55
1.1.3. Determinação de glicerol	56
2. RESULTADOS E DISCUSSÃO	57
2.1. Imobilização de enzimas em vidro de porosidade controlada	57
2.1.1. Imobilização de glicerol desidrogenase	60
2.1.2. Avaliação dos reatores enzimáticos	61
2.1.2.1. Influência da temperatura	61
2.1.2.2. Efeito do volume injetado, vazão, comprimento do reator enzimático e bobina	64
2.1.2.3. Influência do pH e da concentração de β -NAD	70
2.1.2.4. Verificação de espécies interferentes	74
2.1.3. Determinação de glicerol	75

CAPÍTULO 4	
DETERMINAÇÃO AMPEROMÉTRICA DE GLICOSE E SACAROSE EM CALDO DE CANA-DE-AÇÚCAR EMPREGANDO SISTEMA DE ANÁLISE POR INJEÇÃO EM FLUXO E ENZIMAS IMOBILIZADAS	79
1. METODOLOGIA	85
1.1. Experimentos preliminares	85
1.1.1. Definição do sistema FIA	86
1.1.2. Simulação com peróxido de hidrogênio	88
1.2. Imobilização de glicose oxidase	88
1.2.1. Avaliação do reator enzimático	88
1.2.1.1. Influência da temperatura	89
1.2.1.2. Efeito do volume injetado, vazão, comprimento do reator enzimático e bobina	89
1.2.1.3. Influência do pH e da força iônica	90
1.2.1.4. Verificação de espécies interferentes	90
1.3. Determinação de glicose e sacarose	91
2. RESULTADOS E DISCUSSÃO	92
2.1 Avaliação do reator enzimático	92
2.1.1. Influência da temperatura	94
2.1.2. Efeito do volume injetado, vazão, comprimento do reator enzimático e bobina	96
2.1.3. Influência do pH	98
2.1.4. Verificação de espécies interferentes	100
2.2. Determinação de glicose e sacarose	100
CAPÍTULO 5	
CONCLUSÃO GERAL	106

CAPÍTULO 6	
PARTE EXPERIMENTAL	109
1. MATERIAL	109
1.1. Instrumentos e acessórios	109
1.2. Reagentes	110
1.3. Soluções	111
1.4. Amostras	112
CAPÍTULO 7	
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	114

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Fases de preparação do corpo do módulo sensor e aplicação do suporte condutor	15
Figura 2. Diagrama de fluxos do sistema FIA utilizado para avaliação dos eletrodos tubulares (1), para estudo da oxidação de glicerol (2) e determinação de glicerol (3)	17
Figura 3. Influência do pH no potencial do eletrodo	25
Figura 4. Influência da concentração de periodato	29
Figura 5. Influência da velocidade de rotação da bomba peristáltica	30
Figura 6. Registro de análise de rotina	32
Figura 7. Curva analítica	33
Figura 8. Classificação das enzimas imobilizadas	36
Figura 9. Diversas formas de imobilização de enzimas	41
Figura 10. Diagrama de fluxos do sistema FIA empregado para estudo das principais variáveis associadas à oxidação de glicerol (1) e determinação de glicerol (2)	52
Figura 11. Influência da temperatura na reação de glicerol desidrogenase	63

Figura 12. Efeito do volume injetado	65
Figura 13. Efeito da vazão na reação de glicerol desidrogenase	67
Figura 14. Influência do aumento do reator enzimático	69
Figura 15. Efeito do pH na reação de glicerol desidrogenase	71
Figura 16. Influência da concentração de β -NAD	73
Figura 17. Curva analítica	76
Figura 18. Representação da célula amperométrica	85
Figura 19. Diagrama de fluxos do sistema FIA empregado para estudo das principais variáveis associadas à oxidação de glicose (1) e determinação de glicose e sacarose (2)	87
Figura 20. Efeito do potencial aplicado ao eletrodo indicador	93
Figura 21. Influência da temperatura na reação de glicose oxidase	95
Figura 22. Influência da velocidade de rotação da bomba peristáltica	97
Figura 23. Influência do pH na reação de glicose oxidase	99
Figura 24. Curva analítica para determinação amperométrica de glicose (A) e sacarose (B)	103

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Distribuição dos tipos de eletrodos empregados em sistemas FIA com detecção potenciométrica	9
Tabela 2. Algumas características dos eletrodos de periodato descritos na literatura	12
Tabela 3. Parâmetros de calibração para os eletrodos de periodato configuração convencional	21
Tabela 4. Características de resposta dos eletrodos de configuração tubular	22
Tabela 5. Coeficiente de seletividade potenciométrico	26
Tabela 6. Comparação dos resultados	34
Tabela 7. Otimização das variáveis	74
Tabela 8. Características analíticas do método proposto	77
Tabela 9. Comparação dos resultados	78
Tabela 10. Otimização das variáveis	102
Tabela 11. Características analíticas do método proposto	104
Tabela 12. Comparação dos resultados	105

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO GERAL

Nota-se no ambiente industrial uma maior preocupação em relação a um acompanhamento no controle de seus processos de produção (De Winter, Grietens e Rijckaert, 1990; Clarke, 1990), porque a produção de bens de consumo de melhor qualidade tem elevado o nível de competitividade industrial, com a otimização do uso da matéria-prima e energia disponível. Evidentemente, este controle deve ser realizado empregando metodologias em perfeita conexão entre o sistema analítico empregado e o processo de análise; normalmente o termo "on-line" tem sido empregado para definir esta proposição (Stockweel, 1990).

Entre as propostas de monitoramento, a maioria refere-se a sistemas automatizados de análises químicas. Neste contexto, destacam-se os sistemas de análise em fluxo contínuo ("Continuous Flow Analysis" - CFA, Foreman e Stockwell, 1975) e os sistemas de análise por injeção em fluxo contínuo ("Flow Injection Analysis" - FIA, Ruzicka e Hansen, 1975; Stewart et alii, 1976). Esta última, por apresentar características analíticas vantajosas, têm sido frequentemente escolhida para condução de trabalhos analíticos (Valcárcel e Luque de Castro, 1987).

Desta forma, sistema FIA, proposta introduzida independentemente por Ruzicka e Hansen em 1975 e por Stewart et alii em 1976 tem se tornado uma valiosa ferramenta de trabalho quando são necessários resultados analíticos rápidos e precisos. Dentre as inúmeras

aplicações sobressaem os métodos espectrofotométricos, eletroquímicos e espectrofluorimétricos (Gisin e Thommen, 1986; Ruzicka e Hansen, 1986; Cammann, 1988; Stulik, 1989; Trojanowicz, 1991).

O uso de eletrodos íon-seletivos, permitindo, em muitos casos, a determinação direta de espécies sem a necessidade de complexos preparos de amostra (Cosofret, 1980; Cosofret, 1982), e o emprego da imobilização enzimática (Guilbault e Oliveira Neto, 1985; Marko-Varga e Dominguez, 1991) corroboram a potencialidade destas incorporações com os sistemas FIA em análise de processos.

Algumas características analíticas demonstram que trabalhos fundamentados na detecção potenciométrica, particularmente eletrodos íon seletivos, são extremamente satisfatórios em aplicações industriais devido às seguintes evidências (Cammann, 1988; Frenzel, 1988):

- a) não são afetados pela coloração ou turbidez da amostra e não necessitam de reagente específico;
- b) volume morto extremamente pequeno no detector e amplo intervalo útil de concentração;
- c) fornece informações do estado de oxidação (essencial em análise de especiação).

Quando incorporadas aos sistemas de análise por injeção em fluxo, estas características são potencializadas:

- a) em função do fluxo controlado e condicionamento automático (íon) feito pela solução carregadora, nota-se potencial reprodutível;
- b) o potencial de junção líquido no diafragma do eletrodo de

referência é estabilizado, resultando em sinais mais reprodutíveis;

c) a seletividade é incrementada;

d) eliminam-se problemas de contaminação (vazamento);

Segundo Guilbault (1984) e Gorton et alii (1991), métodos baseados na associação FIA/imobilização enzimática têm contribuído para incentivar áreas de investigações e desenvolvimento destes procedimentos. Ainda, métodos baseados nesta incorporação constituem-se em uma tendência particularmente notável pois, além das inúmeras características analíticas favoráveis dos sistemas FIA, limites de detecção são bastante melhorados. Com relação à esta incorporação, algumas vantagens podem ser evidenciadas:

a) determinações simultâneas (Morishita et alii, 1986; Matsumoto et alii, 1988; Luque de Castro e Tena, 1993);

b) monitoramento de processos industriais em tempo real (Prinzing et alii, 1990; Ogbomo et alii, 1991);

c) controle automatizado (Valcárcel e Luque de Castro, 1987);

d) aumento da atividade da enzima utilizada/melhoria dos rendimentos por unidade de enzima (Marko-Varga e Dominguez, 1991);

e) aumento da estabilidade da enzima (Gorton et alii, 1991);

f) melhor resistência às variações de pH e aos tratamentos térmicos do que as espécies em solução (Kiba et alii, 1986);

g) minimização dos problemas de contaminação bacteriana (Tena e Luque de Castro, 1992).

Com esses fatos em mente, objetivou-se neste trabalho o

desenvolvimento de metodologias analíticas empregando sistemas de análise por injeção em fluxo associados à eletrodos íon-seletivo e/ou enzimas imobilizadas visando determinações de espécies químicas em materiais de relevância industrial.

Primeiramente, demonstra-se o desenvolvimento e aplicação do eletrodo tubular seletivo a periodato, e posteriormente, metodologias fundamentadas em reações enzimáticas. Estas propostas aplicadas a amostras de interesse industrial apresentam características analíticas vantajosas e podem ser utilizadas em larga.

CAPÍTULO 2

DESENVOLVIMENTO DE ELETRODO TUBULAR SELETIVO A PERIODATO VISANDO DETERMINAÇÃO AUTOMATIZADA DE GLICEROL

Os métodos potenciométricos, são aqueles baseados em medidas da diferença de potencial entre dois eletrodos imersos em uma solução. Os eletrodos e a solução constituem uma célula eletroquímica e o potencial entre estes eletrodos é geralmente medido com um pHmetro ou um voltímetro de alta impedância. O potencial do eletrodo de referência (Ag/AgCl ou Hg₂Cl₂) não é afetado pela solução a ser analisada, mantendo-se constante durante seu emprego, enquanto que o potencial do eletrodo indicador varia de acordo com a atividade (ou concentração) da espécie que está sendo analisada.

Os eletrodos íon-seletivos baseiam-se nas propriedades das membranas trocadoras iônicas de diferentes espécies; a grande variedade de eletrodos, disponível atualmente, pode ser convenientemente discutida, baseando-se no tipo de material de que são constituídas estas membranas.

a) eletrodos de membrana de vidro, são os mais amplamente empregados à íons hidrogênio; nestes detectores, a resposta iônica seletiva é função da composição da membrana de vidro. Assim, membranas contendo 22% de Na₂O, 72% de SiO₂ e 6% de CaO monitoram variações

de íons H^+ , enquanto que membranas constituídas de 11% de Na_2O , 18% de Al_2O_3 e 71% de SiO_2 apresentam resposta preferencial a íons Na^+ .

b) eletrodos baseados em sais inorgânicos, correspondem a primeira geração de eletrodos íon-seletivos comerciais; os primeiros tipos de tais eletrodos foram os de membranas heterogêneas em que o material ativo é disperso em uma matriz inerte, que por sua vez, confere propriedades mecânicas à membrana. Tais eletrodos precederam os eletrodos de membrana homogênea, nos quais a membrana é composta por um cristal simples, tal como fluoreto de lantânio em eletrodos de fluoreto, ou uma mistura homogênea, como nos eletrodos de prata e haletos em que as membranas são obtidas a partir de pastilhas prensadas de sais de prata co-precipitados com sulfeto de prata.

c) eletrodos baseados em trocadores iônicos, denominados inicialmente de eletrodos íon seletivos de membrana líquida pelo fato de o trocador ter sido incorporado em uma solução de solvente orgânico. Esta terminologia não é mais empregada, pois incorpora-se, hoje, o componente ativo em matrizes inertes, como cloreto de polivinila (PVC), polietileno ou borracha de silicone. No sistema de membrana líquida com trocador iônico orgânico dissolvido, o sítio e o íon movem-se, concomitantemente, através da membrana e na interface com a solução, ocorrendo um processo de troca iônica entre os íons do sítio e íons livres na fase aquosa, mecanismo responsável pela diferença de potencial na interface da membrana com a solução.

d) eletrodos sensores de gases, são células eletroquímicas completas,

incorporando o eletrodo íon-seletivo e o eletrodo de referência num mesmo dispositivo. São sensíveis às pressões parciais dos gases em solução e não sofrem interferências de íons, sendo muito distintos, no seu princípio de operação e rendimento, dos demais tipos de eletrodos.

e) eletrodos enzimáticos, são semelhantes, em conceito aos eletrodos sensores de gás; a enzima é imobilizada na superfície do sensor por um gel. O sensor é imerso na amostra, que reage com a enzima (ou substrato) a uma velocidade constante, e o potencial é conhecido quando ocorre o equilíbrio; a reação ocorre somente no interior do gel e na interface gel-amostra. Por combinação de altas seletividades da reação enzimática e do eletrodo íon seletivo ou eletrodo de gás, muitas propostas têm sido apresentadas (Guilbault e Oliveira Neto, 1985; Gorton et alii, 1991).

A resposta do eletrodo íon-seletivo para ambos, o íon primário e interferente é descrita pela equação semi-empírica de Nikolskii-Eisenman:

$$E = E^{\circ} + S \log (a_i + \sum K_{ij} a_j^{z_i/z_j}) \quad (1)$$

onde, E é a medida do potencial; E° é o potencial-padrão da célula; S é o coeficiente angular do eletrodo (curva analítica, mV por década de concentração); a_i é a atividade do íon primário (i); K_{ij} é o coeficiente de seletividade do eletrodo contra o j -ésimo íon interferente; a_j é a atividade do íon interferente (j); z_i e z_j são as cargas dos íons primário e interferente respectivamente. A somatória $(\sum K_{ij} a_j^{z_i/z_j})$ refere-se a contribuição de todas as espécies interferentes em questão.

Segundo a IUPAC (1976), uma substância interferente é qualquer outra espécie, diferente do íon primário, que, presente numa solução a ser analisada, afeta a medida do potencial da célula. O termo $K_{A,B}^{POT}$, chamado de coeficiente de seletividade potenciométrico, é uma medida da contribuição do íon B^{n+} ao potencial da célula medido. Portanto, quando um eletrodo é muito seletivo a A^{m+} , em comparação com B^{n+} , então $K_{A,B}^{POT}$ será menor do que a unidade. O método das soluções separadas ou o das soluções misturadas, são propostas, cada qual apresentando suas características, usualmente empregados para a determinação do coeficiente de seletividade:

$$- \log K_{A,B}^{pot} = (E_1 - E_2)/S \quad (2)$$

onde, E_1 e E_2 são os potenciais observados antes e após a adição do íon interferente.

A seguir, serão apresentadas algumas considerações dos tipos de eletrodos mais empregados em sistema FIA com detecção potenciométrica, dos eletrodos de configuração tubular e outras características dos eletrodos seletivos a periodato.

Em recente trabalho de revisão, Ferreira e Lima (1993), apresentaram os diferentes tipos de eletrodos empregados em sistemas FIA com detecção potenciométrica. Os eletrodos de membrana cristalina somados ao de suporte móvel representaram ao redor de 66% dos trabalhos referenciados.

Tab. 1. Distribuição dos tipos de eletrodos empregados em sistemas FIA com detecção potenciométrica (referenciados até outubro de 1992).

Tipos de eletrodos	Distribuição (%)
cristalino	32,5
matriz rígida	6,0
suporte	33,1
sensível a gás	2,6
ISFET	5,3
redox	1,3
primeira classe	2,6
segunda classe	16,6

Nota-se, também, um significativo número de propostas incluindo os eletrodos de primeira e segunda classe. Segundo os autores, a reabilitação dos eletrodos de segunda classe em propostas analíticas, foi resultado da maneira pelo qual as determinações em sistemas FIA são conduzidas: a solução carregadora flui através do eletrodo indicador, limpando e condicionando sistematicamente sua superfície. Além desta importante característica, outro fato refere-se às medidas serem realizadas a tempos fixos após a introdução da amostra no sistema.

Segundo Magalhães e Machado (1991), a configuração tubular tem sido preferida para os detectores potenciométricos em aproximadamente 36% dos trabalhos recentemente publicados. Esta

preferência, é justificada pelas vantagens (tempo de resposta, estabilidade, limites nernstiano e de detecção, etc) que os eletrodos tubulares apresentam em comparação com outras configurações, e aumentam em muito às potencialidades da detecção potenciométrica, principalmente nas chamadas determinações multiparamétricas.

Como anteriormente relatado (Montenegro et alii, 1993), as referências apresentadas na literatura sobre a construção de eletrodos sensíveis a periodato, incluem na maioria dos casos eletrodos com o sensor iônico na forma líquida (Hassan e Elsaied, 1987; Jain et alii, 1989; Kudoh, Kataoka e Kambara, 1980).

Sais quaternários de amônio de cadeia curta do tipo aliquat (tricaprililmetilamônio) (Lima e Machado, 1978) e capriquat (Kudoh et alii, 1980) são alguns dos mais comuns trocadores iônicos empregados para a troca de periodato. Assim como estes, outros trocadores iônicos (vários sais quaternários de amônio de cadeia longa) têm sido citados para a construção destes eletrodos de periodato (Pan e Hao, 1982; Elmosalmy, Moody e Thomas, 1987).

Como solventes mediadores não plastificantes ou com fracas características plastificantes têm sido empregados, o nitrobenzeno (Hassan e Elsaied, 1987; Kudoh, Kataoka e Kambara, 1980), o nitrotolueno (Jain et alii, 1989) e o decanol (Lima e Machado, 1978). Orto-2-nitrofenilfenileter e 2-nitrofenil octileter, são exemplos de mediadores plastificantes citados em literatura (Montenegro, 1993).

A oxidação pelo periodato é muito empregada na química de

carboidratos, é fácil de ser conduzida, é seletiva e se efetua sob condições suaves. Somado a isso, tem sido muito empregada em métodos automatizados para determinação de açúcar e glicerol (Bobbit, 1956; Zagatto et alii, 1988), e é a base do método oficial para determinação de glicerol em sabões, detergentes e similares (Barbour e Devine, 1971). Por estas razões, foi selecionada a proposta da determinação de glicerol baseada nesta reação.

Tab. 2. Algumas características dos eletrodos de periodato descritos na literatura.

Sensor	Tipo	Limite inferior (mol/l)	Tempo de resposta (s)	Referência
Difenil fenantrolina	memb. líquida			Hartofylax et alii, 1989
Difenil fenantrolina	memb. acetato de celulose			Hartofylax et alii, 1986
Nitron nitrobenzeno	memb. líquida	5×10^{-6}	30 - 60	Hassan e Elsaied, 1987
Berberina o-nitrotolueno	memb. líquida	$2,5 \times 10^{-5}$	5 - 10	Jain et alii, 1989
Aliquat n-decanol	PVC c/ ref. interna	5×10^{-5}	60	Lima e Machado, 1978
Violeta de etila	PVC c/ ref. interna	2×10^{-6}	30 - 60	Pan e Hao, 1982
Capriquat nitrobenzeno	memb. líquida	10^{-7}		Kudoh et alii, 1980
Nitron nitrofenil octil éter	PVC c/ ref. interna		60	Elmosalamy et alii, 1987
Sais de amônio quaternário	PVC c/ sol. ref. interna		30	Yu, 1986

1. METODOLOGIA

1.1. Preparação do eletrodo

Para a preparação do eletrodo, algumas etapas prévias foram realizadas como segue.

Inicialmente, o suporte condutor do eletrodo foi preparado misturando-se 0,14 g de resina epoxi a base de bisfenol, 0,24 g de grafite e 0,06 g de endurecedor HR (contém álcool benzil isophoronediamina).

Para construção do eletrodo tubular, esta pasta foi depositada no interior de um pequeno tubo de "perspex", com 6-mm de diâmetro interno e 7-mm de comprimento (v. Fig. 1, ítem A). Nesse tubo, foi efetuado, lateralmente, um pequeno orifício, onde se adaptava um cabo condutor coaxial (B); o condutor central do referido cabo foi enrolado o mais próximo possível das paredes da cavidade do orifício (C), e foi fixado pelo material de enchimento (pasta de araldite e grafite) do cilindro (D), numa fase mais adiantada de preparação destes módulos tubulares.

O sensor iônico foi preparado adicionando-se 0,36 g de brometo de tetraoctilamônio, 9,75 g de dibutilftalato (para eletrodos do tipo I) e 4,71 g de 2-nitrofeniloctileter (para eletrodos do tipo II) em 10 ml de clorofórmio. Esta mistura foi agitada com 6 alíquotas de 15 ml de solução 0,1 mol/l em NaIO_4 . A fase aquosa foi descartada e o clorofórmio foi evaporado lentamente.

Para a preparação da membrana misturaram-se 0,18 g de

Determinação de glicerol/eletrodo seletivo a periodato/14

PVC, 6 ml de tetrahidrofurano e 0,4 ml do material referente ao sensor iônico. Esta mistura foi depositada sobre a superfície dos eletrodos convencional e tubular (F), conforme o caso.

A aplicação da membrana sensora nos módulos tubulares, foi realizada com muito cuidado, visto que deveria ser depositada através das faces internas do orifício central (1-mm diâmetro interno) deste módulo (F); este foi colocado verticalmente, proporcionando-se um melhor escoamento desta membrana sensora, sem, no entanto, provocar obstrução do orifício. Após 24 horas (tempo necessário para secagem completa das membranas, com a evaporação do tetrahidrofurano), colocava-se este eletrodo em contato com solução 10^{-2} mol/l em NaIO_4 , por pelo menos 72 horas, de forma a atingir o equilíbrio com o sistema de referência da membrana.

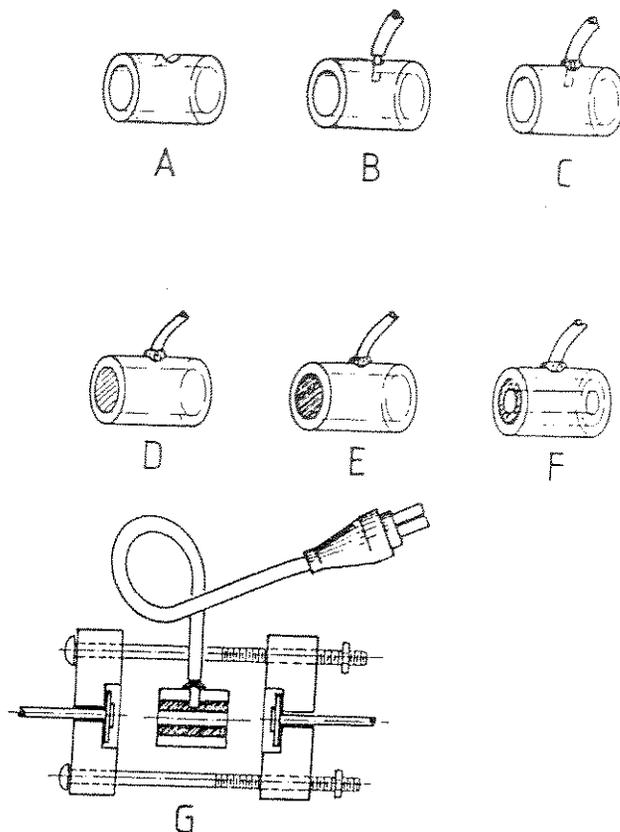


Fig. 1. Fases de preparação do corpo do modulo sensor e aplicação do suporte condutor. A, orifício lateral no tubo de "perspex"; B, adaptação do cabo condutor coaxial; C, posicionamento do cabo condutor o mais próximo possível das paredes da cavidade do orifício; D, fixação do cabo condutor pelo material de enchimento; E, etapa de secagem (24 horas); F, confecção de orifício interno (1-mm) e aplicação da membrana sensora; G, após 24 horas (secagem completa da membrana), posicionar o eletrodo no compartimento de acrílico.

1.2. Avaliação dos eletrodos convencional e tubular

Inicialmente, avaliaram-se as características gerais de funcionamento dos eletrodos de configuração convencional, tais como, o intervalo de resposta linear, a inclinação das retas de calibração, a repetibilidade dos potenciais e o tempo de resposta. Para isto foram efetuadas calibrações repetidas com soluções-padrão (10^{-1} a 10^{-7} mol/l em NaIO_4) sem e com força iônica ajustada a 10^{-1} mol/l com sulfato de sódio.

A avaliação dos eletrodos de configuração tubular, foi realizada empregando-se o sistema FIA da Fig. 2: um sistema em linha única (Fig. 2.1), com pequena dispersão da zona de amostra (fração volumétrica $> 0,95$). Para verificação dos limites inferiores de resposta linear dos eletrodos, usou-se como transportador uma solução de sulfato de sódio 3×10^{-2} mol/l e periodato de sódio 10^{-6} mol/l. Nos experimentos de avaliação de seletividade, reprodutibilidade e influência do pH nos potenciais dos eletrodos, aumentou-se esta concentração para 5×10^{-5} mol/l.

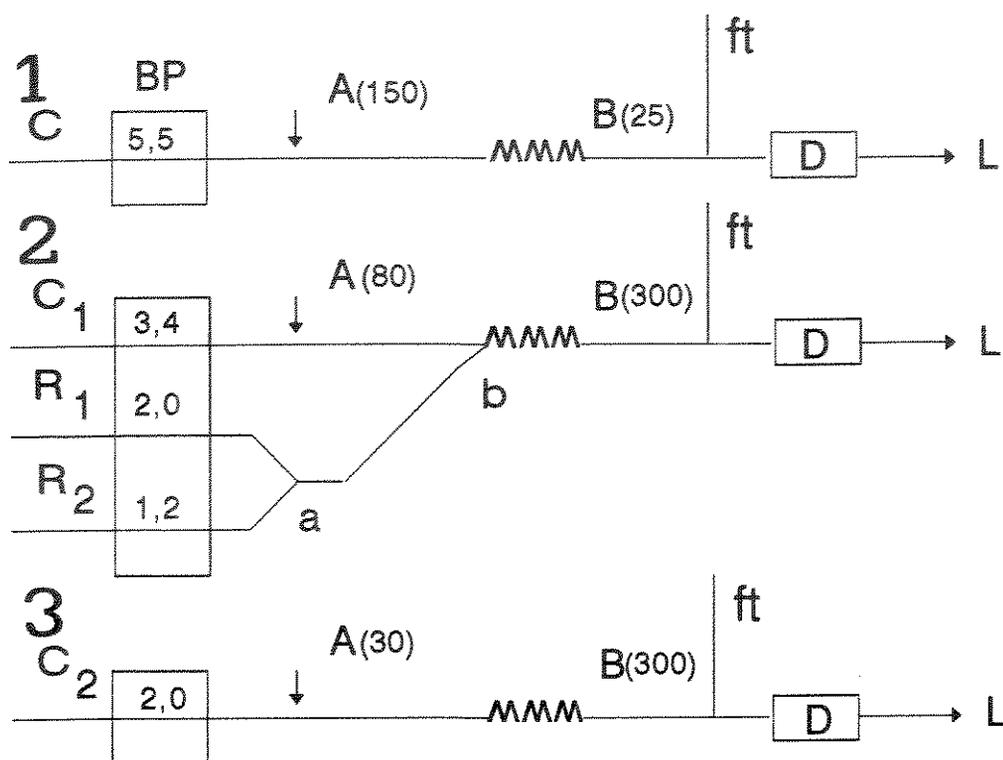


Fig. 2. Diagrama de fluxos dos sistemas FIA utilizados para avaliação dos eletrodos tubulares (1), para estudo da oxidação de glicerol (2) e determinação de glicerol (3). C - solução transportadora; C₁ - água destilada; C₂ - reagente combinado; R₁ - solução-tampão ácido acético/acetato de sódio + sulfato de sódio; R₂ - solução em periodato de sódio; BP - bomba peristáltica com vazões em ml/min; A - amostra, com especificação dos volumes injetados em µl; B - bobina de reação/homogeneização, com especificação do comprimento, em cm; D - detector (eletrodo de referência - Ag/AgCl); L - lixo; a e b, pontos de confluência; ft, fio-terra do sistema.

1.2.1. Influência do pH

A influência do pH entre os valores de 2 e 13 foi investigada utilizando-se soluções 10^{-1} , 10^{-3} e 10^{-5} mol/l em NaIO_4 verificando-se simultaneamente o registro de potencial versus variação de pH, após pequenas adições de soluções de ácido sulfúrico e hidróxido de sódio concentrados.

1.2.2. Verificação de espécies interferentes

A influência de íons interferentes foi avaliada pelo método das soluções separadas (IUPAC, 1981) utilizando-se soluções 10^{-2} , 10^{-3} , e 10^{-4} mol/l em ambos IO_4^- e íons interferentes. Desde que iodato foi formado após oxidação de glicerol, sua interferência também foi avaliada.

1.3. Determinação de glicerol

O sistema da Fig. 2.2, com o eletrodo tubular tipo I, foi utilizado para investigar os principais parâmetros envolvidos na determinação automatizada de glicerol. Assim, soluções-padrão em glicerol no intervalo de 100 a 500 mg/l foram empregadas. Após injeção da amostra, solução-tampão e solução em periodato de sódio foram misturadas (a) seguindo em direção ao detector, passando através da bobina de reação/homogeneização onde situavam-se as melhores

condições de pH e força iônica para oxidação de glicerol. A passagem da zona de amostra através do detector, resultava em um aumento transiente na medida do potencial registrado na forma de um pico proporcional à concentração de glicerol presente na amostra.

1.3.1. Influência da concentração de periodato

Para se verificar o efeito da concentração de periodato de sódio na oxidação de glicerol, utilizou-se o sistema FIA da Fig. 2.2. Variou-se esta concentração no intervalo de 10^{-5} a 10^{-2} mol/l.

1.3.2. Efeito do tempo de residência, força iônica e pH na reação de oxidação de glicerol

A influência da rotação da bomba peristáltica (25, 50, 75 e 100% em relação aos fluxos apresentados na Fig. 2.2 resultando-se vazões de 1,7; 3,3; 5,0; 6,7 ml/min respectivamente), força iônica (0,0 a 1,0 mol/l Na_2SO_4 em R_1) e pH para oxidação de glicerol foram investigadas.

Finalmente o sistema FIA foi simplificado para uma configuração em linha-única (Fig. 2.3). O volume da amostra foi reduzido a $30\mu\text{l}$, a solução transportadora foi combinada ($3 \cdot 10^{-3}$ mol/l NaIO_4 + $5 \cdot 10^{-1}$ mol/l Na_2SO_4 + 10^{-1} mol/l ácido acético + 10^{-1} mol/l acetato de sódio) e o comprimento do reator foi selecionado como 300 cm. Com este sistema simplificado, as características analíticas foram avaliadas.

Determinação de glicerol/eletrodo seletivo a periodato/20

Após todos os ajustes, as principais características analíticas do sistema proposto foram investigadas. Para avaliação da precisão, estimativas do desvio-padrão dos resultados obtidos após 11 sucessivas determinações de glicerol realizadas em algumas amostras. Com relação à exatidão, foram avaliados os resultados obtidos e comparados com aqueles obtidos pelo método oficial (A.O.C.S., 1959).

2. RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.1. Avaliação dos eletrodos convencional e tubular

As características gerais de funcionamento dos eletrodos de configuração convencional, tanto para o eletrodo tipo I (ou seja, preparado com dibutilftalato como solvente mediador) e eletrodo tipo II (o-nitrofeniloctiléter como solvente mediador) podem ser observadas por meio da Tab. 3.

Tab. 3. Parâmetros de calibração para os eletrodos de periodato configuração convencional.

Características	Sem ajuste da força iônica		Com ajuste da força iônica	
	Tipo I	Tipo II	Tipo I	Tipo II
Limite nernstiano (mol/l)	6×10^{-5}	9×10^{-6}	6×10^{-5}	1×10^{-5}
Limite de detecção (mol/l)	3×10^{-5}	3×10^{-6}	3×10^{-5}	3×10^{-6}
Coefficiente angular (mV/década)	$61,6 \pm 0,2$	$59,5 \pm 0,5$	$60,5 \pm 0,2$	$57,4 \pm 0,3$
Reprodutibilidade (mV/dia)*	$\pm 0,15$	$\pm 0,5$	$\pm 0,1$	$\pm 0,2$
Velocidade de resposta (s)	<10	<10	1	1

* Valores correspondentes a duas determinações com três detectores.

Observa-se, por meio da tabela 3, características gerais mais favoráveis ao eletrodo confeccionado com dibutilftalato do que àquele referente a o-nitrofeniloctiléter. Nota-se, que, para o primeiro tipo de eletrodo, a influência da força iônica somente altera a velocidade de resposta; os demais parâmetros mantêm-se praticamente constantes. Por outro lado, o eletrodo tipo II, é mais suscetível à influência da força iônica: além da alteração do parâmetro velocidade de resposta, o limite inferior de resposta linear também foi afetado.

Tab. 4. Características de resposta dos eletrodos de configuração tubular quando inseridos no sistema da Fig. 2.1.⁽¹⁾

Características	Tipo I	Tipo II
Limite nernstiano (mol/l)	2×10^{-5}	2×10^{-5}
Coefficiente angular (mV/década)	$60,5 \pm 0,2$	$58,1 \pm 0,3$
Reprodutibilidade (mV/dia)	$\pm 0,7$	$\pm 0,4$
Ritmo de amostragem (amostra/h)	120	180

⁽¹⁾ Valores correspondentes a duas determinações com três detectores.

Os detectores potenciométricos configuração tubular (tipo I e II) foram avaliados genericamente no sistema FIA. A tabela 4, apresenta os parâmetros de calibração avaliados. Independente da

configuração do eletrodo, a resposta referente ao limite inferior linear foi sempre ao redor de $5 \cdot 10^{-5}$ mol/l em periodato. Durante 8 horas de trabalho, variações de potencial observados para 10^{-4} - 10^{-1} mol/l foram menores do que 0,2 mV. Isto demonstrou uma linha base sem qualquer variação neste sistema em fluxo.

Neste intervalo de concentração, o tempo de resposta do eletrodo convencional foi muito rápido: após duplicar a concentração de periodato, o equilíbrio foi obtido em menos do que 2 segundos. O tempo de resposta dinâmico do eletrodo tubular (tipo II) foi verificado empregando-se solução 10^{-1} e 10^{-3} mol/l IO_4^- (também 10^{-1} mol/l Na_2SO_4) com fluxo intermitente de 2,0 ml/min a 10 cm do detector. Quando o injetor era acionado, solução 10^{-3} mol/l em periodato era monitorada. O tempo de transição entre o registro do sinal no estado estacionário da solução-padrão 10^{-1} mol/l e 10^{-3} mol/l, foi cerca de 2 segundos, enfatizando-se a potencialidade deste eletrodo tubular para estudos em aplicações em fluxo contínuo.

Foram observadas para ambos os eletrodos, respostas nernstianas ($60,5 \pm 0,2\text{mV/decada}$ - tipo I; $57,4 \pm 0,3\text{mV/decada}$ - tipo II). Em função do baixo tempo de resposta, coeficientes angulares similares foram obtidos para os eletrodos de configuração convencional e tubular.

2.1.1. Influência do pH

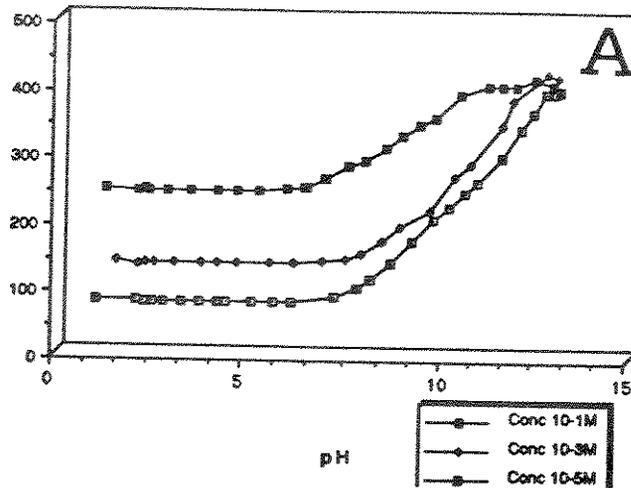
A influência do pH no potencial do eletrodo, para as diferentes concentrações de periodato (tanto para o eletrodo tipo I quanto II) podem ser observadas por meio da Fig. 3.

Para os eletrodos tipo I registrou-se um patamar operacional (zona de pH onde não se verifica variação significativa do potencial dos eletrodos com o pH) compreendido entre 2 e 7 para todos os níveis de concentração. Nestes eletrodos verifica-se um aumento de potencial à medida que o valor do pH vai crescendo. Este comportamento, segundo (Lima e Montenegro, 1993) é justificável pela protólise de H_4IO_6^- . Este incremento no potencial corresponde a uma diminuição do ânion (IO_4^-) em solução. Nos eletrodos do tipo II verifica-se um efeito inverso, este fato pode ser devido a uma interferência de membrana comandada pela presença de o-nitrofeniloctiléter.

Considerando-se concentração de periodato = 10^{-3} mol/l NaIO_4 , para valor de pH entre 3,0 e 7,5 não foi verificada influência significativa no potencial do eletrodo. Isto demonstra a potencialidade do eletrodo para realização da determinação de glicerol fundamentando-se na oxidação pelo periodato, o qual ocorre preferencialmente a pH 4,5 (Jackson, 1947).

Determinação de glicerol/eletrodo seletivo a periodato/25

Diagramas de Relley para electrodos de periodato preparados com dibutilftalato



Diagramas de Relley para electrodos de periodato preparados com o-nitrofeniloctiléter.

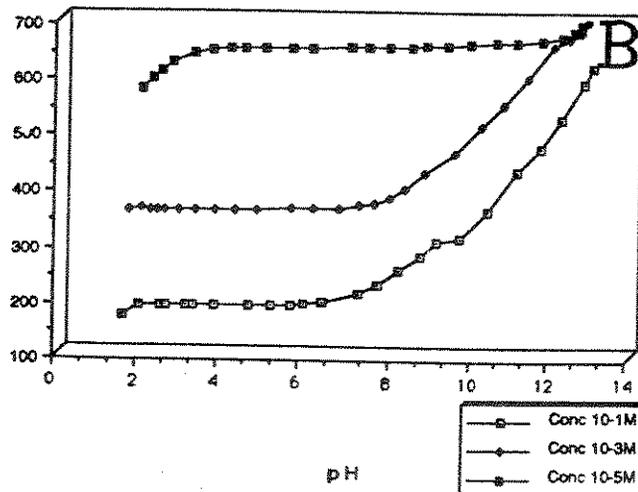


Fig. 3. Influência do pH no potencial do eletrodo. A) eletrodo de periodato configuração convencional preparado com dibutilftalato; B) eletrodo de periodato preparado com o-nitrofeniloctiléter. Emprego do sistema FIA da Fig. 2.1, com pequenas injeções de ácido sulfúrico e hidróxido de sódio na presença de soluções 10^{-1} a 10^{-5} mol/l em NaIO_4 .

2.1.2. Verificação de espécies interferentes

Os dados de seletividade relativos aos eletrodos convencional (tipo I e II) estão expostos na Tabela 5. Dados obtidos em condições em batelada, foram similares àqueles obtidos em fluxo, enfatizando-se que aspectos cinéticos não foram relevantes.

Tab. 5. Coeficiente de seletividade potenciométrico ($\log K^{pot}$). Dados com desvio-padrão entre parênteses, estão referidos às medidas em batelada conduzidas com os eletrodos tipo I e II em configuração convencional.

Espécies	10^{-2} mol/l		10^{-3} mol/l		10^{-4} mol/l	
	I	II	I	II	I	II
Cloreto	-3,97(0,02)	-3,06(0,04)	-2,97(0,04)	-2,09(0,08)	-1,90(0,01)	-1,10(0,10)
Nitrato	-2,63(0,04)	-2,75(0,03)	-2,33(0,03)	-1,65(0,03)	-1,75(0,02)	-0,98(0,05)
Brometo	-3,23(0,05)	-2,63(0,03)	-2,80(0,01)	-1,94(0,01)	-2,16(0,04)	-1,06(0,02)
Perclorato	-0,20(0,03)	0,014(0,003)	-0,41(0,02)	0,009(0,008)	-0,23(0,01)	0,03(0,02)
Iodato	-0,08(0,02)	-3,08(0,01)	-0,25(0,01)	-1,67(0,01)	0,34(0,02)	-0,54(0,01)
Sulfato	-4,89(0,03)	-5,19(0,17)	-5,15(0,04)	-5,28(0,09)	-5,14(0,04)	-5,32(0,13)

Os dados apresentados na tabela 5, são melhores do que os anteriormente reportados (Lima e Machado, 1978; Kudoh et alii, 1980; Hassan e Elsaied, 1987; Jain et alii, 1989), especialmente em relação ao íon sulfato. Por esta razão, sulfato de sódio foi escolhido para promover

o ajuste da força iônica nos experimentos referentes a avaliação dos eletrodos e outras aplicações analíticas. Apesar destes eletrodos sofrerem a interferência de perclorato, esta é muito menor se comparada a outros valores já referenciados.

Altas concentrações de glicerol devem ser evitadas, quando maiores do que 10^{-1} mol/l, contribuem para deterioração da membrana. Desde que este problema não foi observado para concentrações de glicerol menores do que 10^{-2} mol/l, em condições de fluxo, o sistema FIA proposto foi projetado para promover altas dispersões.

2.2. Determinação de glicerol

O sistema tampão ácido acético/acetato de sódio foi escolhido após considerações das informações apresentadas na Fig. 3. Valor de pH 4,5 é o melhor meio para oxidação de glicerol pelo íon periodato (Jackson, 1947). Nenhuma alteração no desempenho do eletrodo tubular (tipo I) foi verificado empregando-se este valor de pH, como consequência, o limite nernstiano foi mantido.

2.2.1. Influência da concentração de periodato

A concentração de periodato foi um importante parâmetro no procedimento para determinação de glicerol. Em concentrações menores do que 10^{-5} mol/l no sistema FIA da Fig. 2.2, a linha base foi ruidosa e as

alturas dos picos registrados não foram mensuráveis, pois o periodato remanescente aproximou-se do limite de detecção. Nesta condição, o intervalo de tempo entre o máximo do pico e restauração da linha de base foi significativamente alto (> 20 s). Para concentrações de periodato entre 10^{-4} - 10^{-1} mol/l, a flutuação do potencial da linha base foi ao redor de $\pm 0,2$ mV (exceto para $\text{IO}_4^- = 10^{-4}$ mol/l - Fig. 4), com diminuição do intervalo de tempo para restauração da linha base após injeção de amostra (11 segundos), e demonstração da tendência à linearização entre a concentração de glicerol e os sinais analíticos registrados. Isto foi devido a combinação da resposta nernstiana do eletrodo e aspectos cinéticos da oxidação de glicerol, o qual, na etapa inicial de desenvolvimento, tende a primeira ordem relativamente a periodato. Melhor linearidade ($r > 0,99$) foi observada para $\text{IO}_4^- = 3,0 \times 10^{-3}$ mol/l. Para concentrações de periodato maiores do que 10^{-2} mol/l, diminuição em linearidade e altura de picos foram observadas (Fig. 4). Nesta situação, a concentração de glicerol foi muito menor relativa ao oxidante; como consequência, o eletrodo seletivo a periodato não discriminava a variação entre o periodato inicial e o remanescente. Desta forma, para condução dos experimentos, esta concentração foi mantida como $3 \cdot 10^{-3}$ mol/l em NaIO_4 .

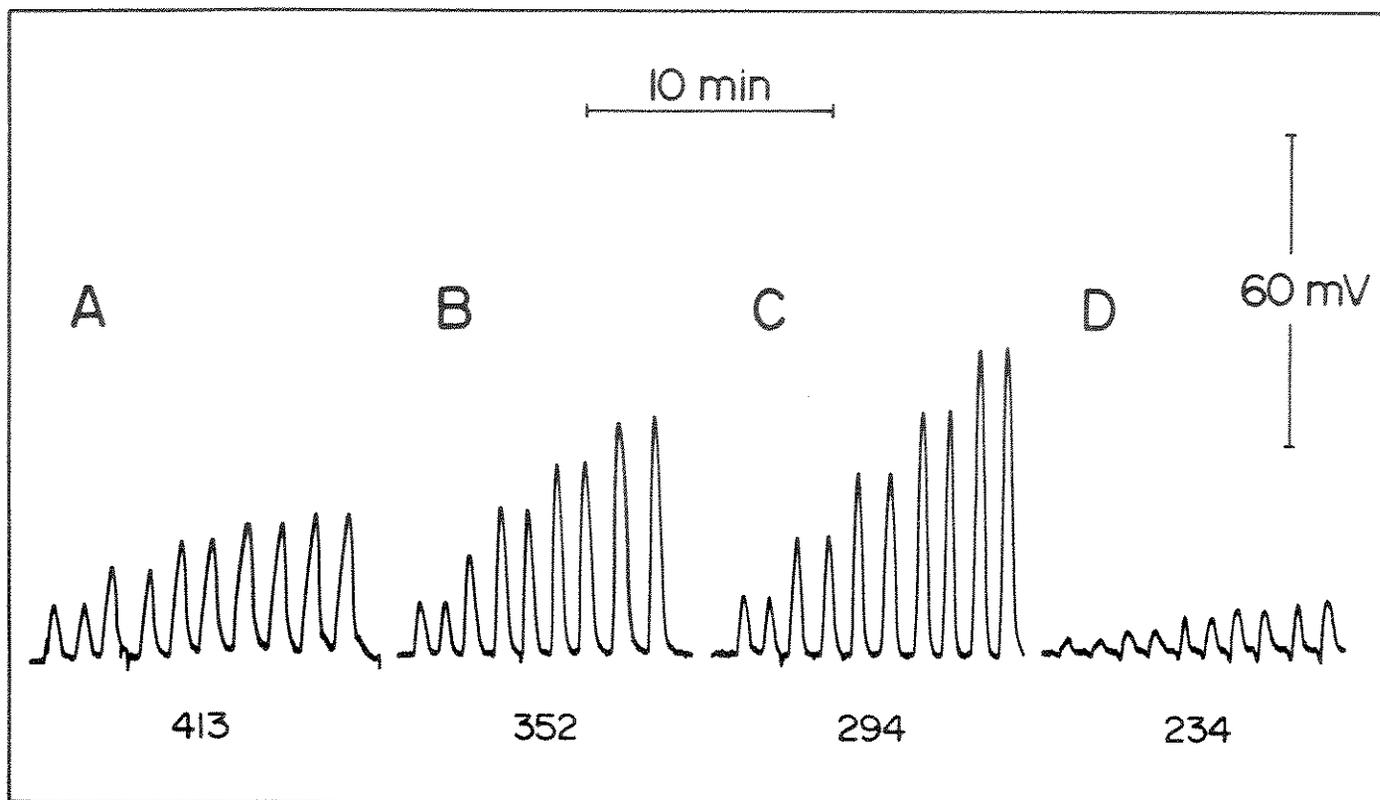


Fig. 4. Influência da concentração de periodato. A figura refere-se ao sistema FIA da Fig. 2.2 com $R_1 = 10^{-1}$ mol/l em ácido acético + 10^{-1} mol/l acetato de sódio + 10^{-1} mol/l sulfato de sódio. A, B, C e D correspondem a concentrações de periodato de 10^{-4} , 10^{-3} , 10^{-2} e 10^{-1} mol/l em R_2 . A partir da esquerda, picos registrados correspondem a 100, 200, 300, 400 e 500 mg de glicerol/l. Números referem-se aos potenciais da linha base, em mV.

2.2.2. Efeito do tempo de residência, força iônica e pH na reação de oxidação de glicerol

A sensibilidade foi muito dependente da velocidade de rotação da bomba peristáltica, a qual foi proporcional ao tempo médio de residência (Fig. 5).

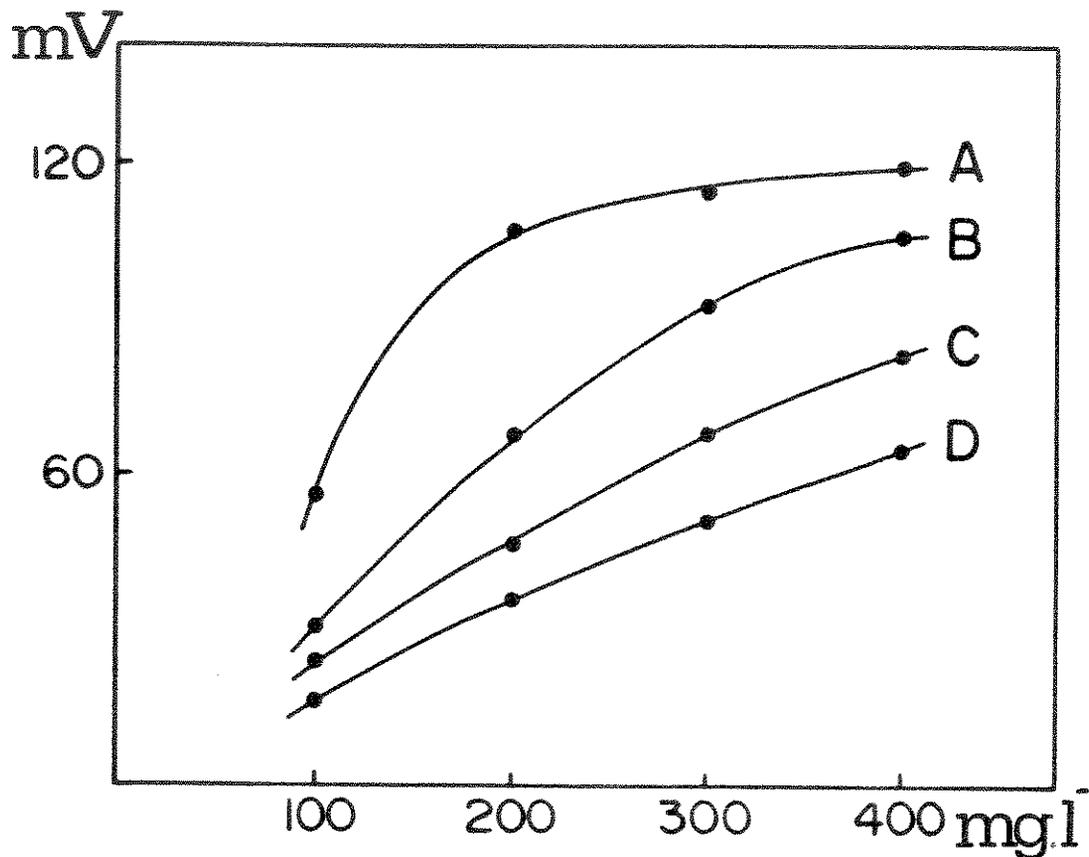


Fig. 5. Influência da velocidade de rotação da bomba peristáltica. A, B, C e D correspondem a 25, 50, 75 e 100% da vazão expressa no sistema da Fig. 2.2. (correspondente a vazões de 1,7; 3,3; 5,0 e 6,7 ml/min respectivamente).

Entretanto, este parâmetro não pode ser selecionado ao máximo (25%), pois a linearidade da curva de calibração também foi afetada pela variação no tempo médio para oxidação de glicerol. Observa-se que para concentração de glicerol igual a 100 mg/l, o aumento em altura de pico foi proporcional a rotação da bomba peristáltica (ou ao fluxo envolvido) : a redução de 50 a 25% (ou 3,3 a 1,7 ml/min), representou um incremento em altura de sinal da ordem de 100%. Para concentrações > 200 mg/l, este incremento não foi significativo (curva A). Quando a rotação da bomba peristáltica foi aumentada, além de ser observada uma maior velocidade analítica, notou-se, também, melhor correlação entre as alturas registradas e as concentrações de glicerol (curvas B, C e D).

Assim, o valor da vazão para o sistema FIA da Fig. 2.2, foi selecionado como um compromisso entre sensibilidade, velocidade analítica e linearidade da curva analítica.

O sistema da Fig. 2.2, é muito estável e adequado para determinação de glicerol em lixívias e similares até 5000 mg/l. Como está envolvida alta dispersão, variações em força iônica da solução injetada no intervalo de 0,0 a $5 \cdot 10^{-1}$ mol/l não foram relevantes. Também quando a alcalinidade da amostra variou entre 10^{-1} e $5 \cdot 10^{-1}$ mol/l NaOH, pequenas variações (< 5%) na altura de picos foram observadas.

Após definição das concentrações dos reagentes, e estudo dos parâmetros de maior relevância e dispersões envolvidas, foi proposto um sistema FIA em linha única (Fig. 2C). Com este sistema ao redor de 40 amostras podem ser analisadas por hora, correspondendo a um consumo

de cerca de 1,8 mg de NaIO_4 por determinação. Resultados reprodutíveis (desvio-padrão $< 0,2$ mV) foram observados sem variação da linha de base (Fig. 6), o qual confirma também a estabilidade do reagente periodato empregado. A tabela 6 ilustra a exatidão obtida.

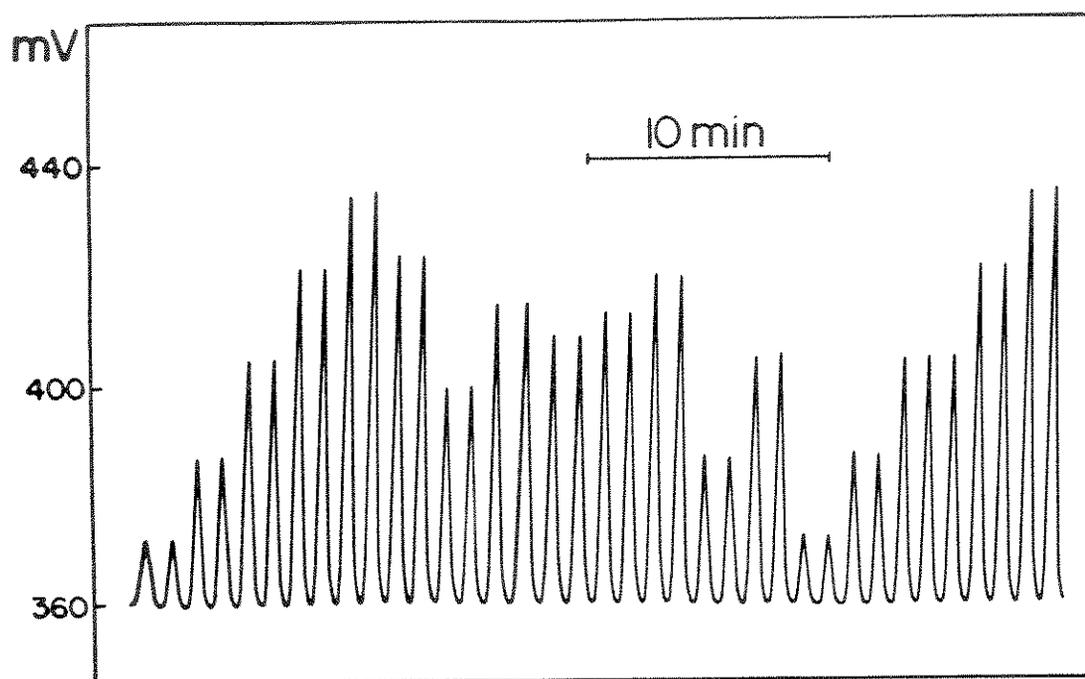


Fig. 6. Registro de análises de rotina. Da esquerda para a direita sinais analíticos registrados em duplicata referentes a soluções-padrão de glicerol (1000, 2000, 3000, 4000 e 5000 mg/l), seguidas de 8 amostras de lixívia (e as soluções-padrão novamente).

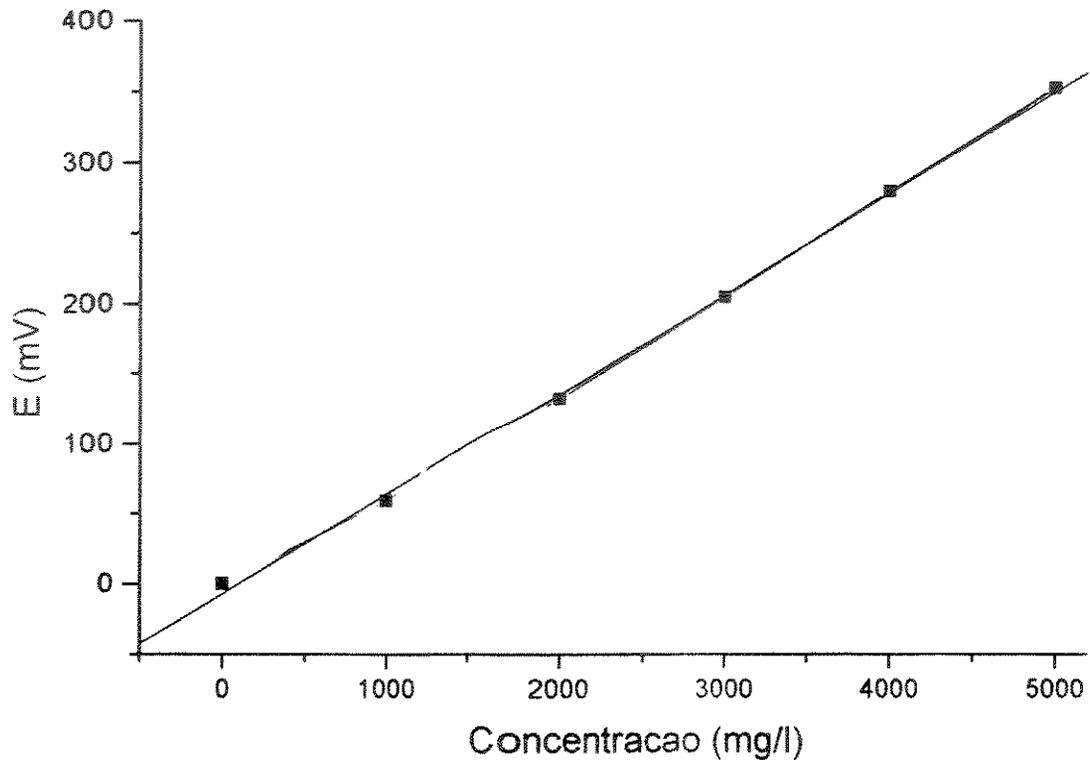


Fig. 7. Curva analítica. A figura se refere ao sistema FIA da Fig. 2.3. Concentração de glicerol no intervalo de 0 a 5000 mg/l.

Após cálculo estatístico, encontra-se função $E(\text{mV}) = -6,91 + 0,07[\text{glicerol}]$ com coeficiente de correlação igual a 0,9996, demonstrando a potencialidade do método para condução de análise em amostras de sabões e similares.

Tabela 6. Comparação dos resultados. Concentração de glicerol em líxívia (% m/v) determinados pelo sistema FIA da Fig. 2C; e pelo método oficial (AOCS,1959). Desvios-padrão relativos ao sistema FIA e ao método oficial expressos em percentagem (%).

Amostra	F.I.A.	A.O.C.S.
1	34,1±0,5	32,3±1,0
2	26,0±0,5	27,0±1,0
3	34,3±0,5	-
4	31,5±0,5	31,2±1,0
5	26,2±0,5	27,4±1,0
6	37,8±0,5	35,4±1,0
7	29,0±0,5	32,7±1,0
8	29,4±0,5	29,6±1,0

Após comparação dos dois métodos, pode-se verificar coeficiente de correlação igual a 0,8999 com função $FIA = -8,66 + 1,27[A.O.C.S.]$. Com isso, o tratamento dos dados analíticos pelo método dos mínimos quadrados revelou boa correlação entre resultados referentes ao método proposto e ao de referência (AOCS, 1959).

CAPÍTULO 3

DETERMINAÇÃO FLUORIMÉTRICA DE GLICEROL EM VINHOS EMPREGANDO SISTEMA DE ANÁLISE POR INJEÇÃO EM FLUXO E ENZIMAS IMOBILIZADAS

Primeiramente serão apresentadas algumas considerações da imobilização enzimática demonstrando suas potencialidades e limitações (Berset, 1984; Kennedy e White, 1985).

Em 1916, Nelson e Griffin demonstraram pela primeira vez que a imobilização enzimática sobre um suporte insolúvel era acompanhada, frequentemente, por um aumento na estabilidade da enzima; verificaram que a invertase adsorvida em carvão ativo conservava sua atividade. Entretanto, as primeiras aplicações foram somente apresentadas em 1954, por Grubhofer e Schleith.

A atividade das enzimas está associada à manutenção da integridade de sua conformação terciária, em particular, a nível de seu sítio ativo; os processos de imobilização devem fazer uso de métodos brandos e bem controlados, respeitando-se a estrutura nativa da proteína, as ligações criadas entre o suporte e a enzima, e excluindo-se os aminoácidos implicados diretamente na reação catalítica.

De maneira geral, as enzimas imobilizadas são classificadas de acordo com o método de fixação empregado e são consideradas como um caso particular de enzimas modificadas. A classificação deve ser baseada na combinação da natureza da interação responsável pela imobilização e características do suporte (Guilbault e Oliveira Neto, 1985; Kennedy e White, 1985).

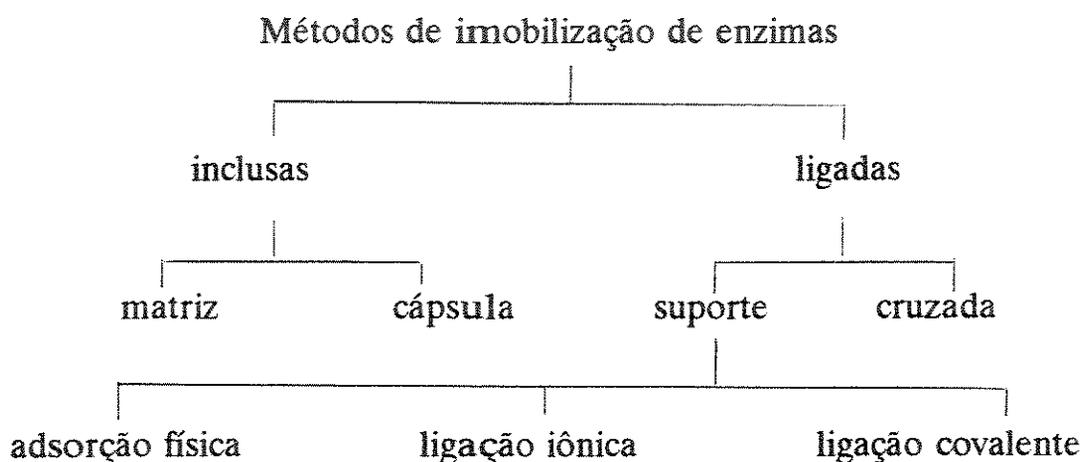


Fig. 8. Classificação das enzimas imobilizadas. (Kennedy e White, 1985)

Na imobilização por inclusão, as enzimas ficam retidas na rede tridimensional de um polímero insolúvel na água ou aprisionadas no interior de microcápsulas; estas são delimitadas por uma membrana semipermeável cujos poros são suficientemente pequenos para impedir a difusão de macromoléculas, mas suficientes para permitir a passagem do substrato e dos

produtos da reação enzimática. Neste procedimento, a enzima não está ligada ao suporte, e conserva sua integridade molecular.

Quando a enzima é dissolvida e dispersa numa solução de um monômero que, em seguida, é polimerizado na presença de um agente de reticulação e de um colóide protetor (albumina, agarose ou dextrana), diz-se que trata-se de inclusão em uma matriz (Vieth et alii, 1973); se está no interior de uma cápsula delimitada por uma membrana semipermeável, trata-se de imobilização por microencapsulação (Chibata, 1978).

Esses métodos, que não empregam os agrupamentos reativos da proteína, convêm a todos os tipos de enzimas e, em particular, ao caso de oligômeros ou dos sistemas multienzimáticos, para os quais a reassociação de subunidades é facilitada pela sua retenção em um volume restrito. Além disso, a totalidade da massa protéica está inclusa dentro da rede de polímero ou das microcápsulas, resultando em grande área superficial facilitando o contato do substrato e enzima (Kennedy e White, 1985).

Entretanto, uma parte não negligível destas macromoléculas pode exsudar no decorrer do tempo, além das condições de polimerização, às vezes, serem desnaturantes para a enzima. Mas, o principal fator que limita o emprego dessas técnicas é a restrição que os fenômenos de impedimento estérico e de difusão através do gel ou da membrana impõem às transferências de matéria no seio do suporte.

Outra forma de imobilização, na qual a enzima deve ser fixada ao suporte tão solidamente quanto possível, refere-se a fixação das enzimas sobre suporte sólido (Chibata, 1978; Guilbault, 1984). Nesta técnica, deve-se levar em conta, as características próprias tanto da proteína que se quer fixar, como do suporte: formato das partículas, relação molar dos agrupamentos hidrófilos e hidrofóbicos, agrupamentos reativos, etc.

Na fixação por adsorção (Fig. 8), emprega-se um grande número de forças de interação de baixa energia (Van der Waals, ligações hidrogências ou ligações hidrofóbicas) entre o suporte e a proteína. Neste caso, se o biocatalisador fixa-se em suportes não porosos, formam-se, nas vizinhanças das partículas sólidas, camadas sucessivas de moléculas de enzima cada vez menos fortemente ligadas; quando o material é poroso, as macromoléculas protéicas penetram nos poros. Entretanto, se o suporte é portador de cargas elétricas, as ligações iônicas, que se podem estabelecer além das forças físicas de adsorção, conferem ao complexo uma estabilidade muito maior.

A concentração em proteína enzimática, pH, temperatura, formato das partículas e natureza do suporte, são alguns dos diferentes parâmetros que vão influir na quantidade da enzima fixada e na estabilidade das ligações criadas. Assim, a massa ligada ao suporte aumenta com a concentração da espécie adsorvida até um patamar de saturação (a trajetória

da curva depende ao mesmo tempo da natureza da enzima e da do suporte).

Do pH do meio dependem o número e a natureza das cargas sustentadas pelo suporte e pelos agrupamentos funcionais ionizáveis dos resíduos de aminoácidos da proteína. Suas modificações vão, portanto, influir fortemente na quantidade de enzima fixada por ligações iônicas; bruscas variações do pH acarretarão uma dessorção considerável da enzima.

Sob o efeito de uma elevação de temperatura, produz-se o início do desdobramento da estrutura tridimensional da proteína, com o desmascaramento de um certo número de sítios de interação potencial e a probabilidade de maior criação de ligações com o suporte. Entretanto, existe uma limitação causada pelo risco de perda de atividade da enzima.

A massa de enzima adsorvida cresce com a área específica e, portanto, com a fina espessura das partículas do suporte. Os suportes ricos em sítios hidrófilos são mais adsorventes que os suportes hidrófobos e fornecem complexos mais estáveis por causa da coroa polar de macromoléculas protéicas formada pelos agrupamentos hidrófilos dos aminoácidos de superfície.

Desta forma, os minerais argilosos constituem uma matéria-prima abundante e barata; a estrutura em folhas da montmorilonita, favorecendo a adsorção interlaminar da enzima, aumenta a taxa de retenção do biocatalisador e o protege em face das degradações bacterianas e

proteolíticas. Com suportes de vidro poroso, além das interações físicas, são estabelecidas ligações iônicas entre os resíduos de aminoácidos carregados positivamente e os agrupamentos SiO_3 .

A grande facilidade de preparação dos complexos, o emprego de métodos brandos que preservem a atividade das enzimas, a aplicação a todos os tipos de biocatalisadores, tornam a técnica de imobilização por adsorção muito atraente. Entretanto, a afinidade das enzimas varia muito com o tipo de suporte, além de a atividade dos complexos não ser diretamente proporcional à massa de enzima fixada; a adsorção em camadas sucessivas dificulta a acessibilidade dos sítios ativos, ao passo que a criação de ligações entre o suporte e certos agrupamentos funcionais da enzima pode entravar a ação catalítica.

Com relação a fixação das enzimas por ligações covalentes (Fig. 8), uma reação química cria uma ligação entre a molécula enzimática e os grupos reativos do suporte, consolidando a fixação (Fig. 9).

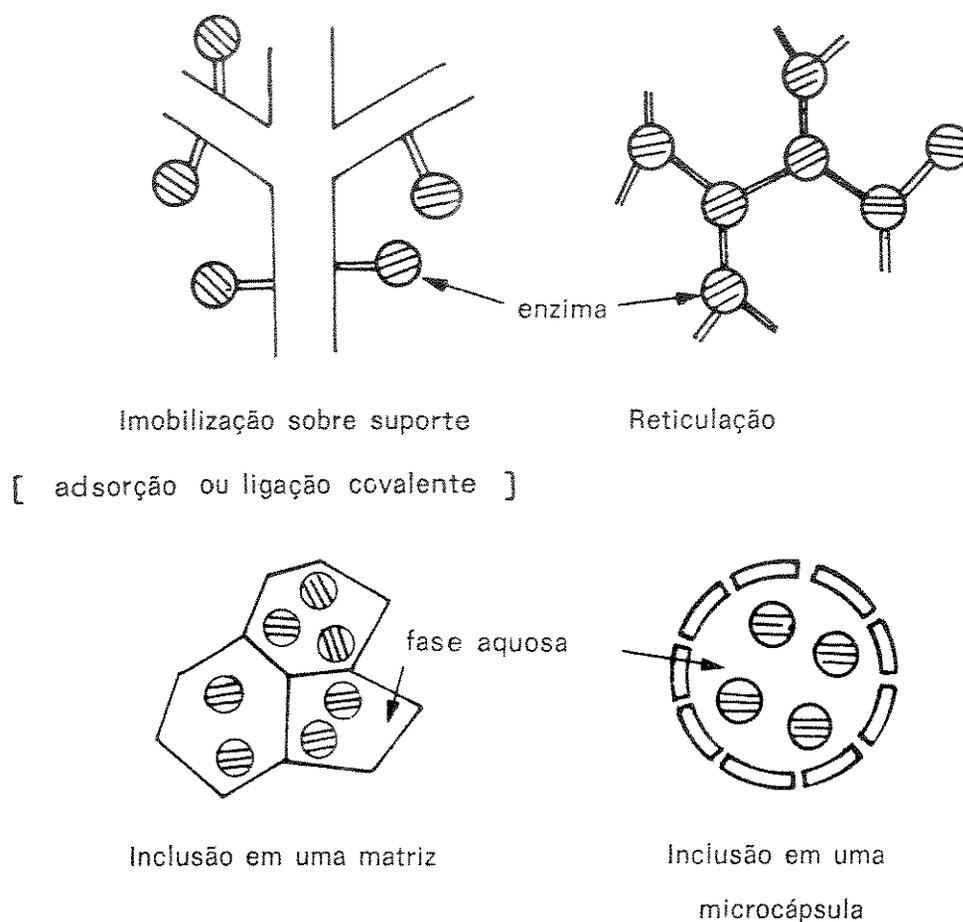


Fig. 9. Diversas formas de imobilização de enzimas. (Chibata, 1978).

Como a reação química de formação da ligação covalente deve ser menos desnaturante possível para a macromolécula biológica, é necessário proceder a uma ativação prévia dos agrupamentos suscetíveis de

entrar em reação. Por razões ligadas à dificuldade de manter intacta a atividade da enzima, geralmente, escolhe-se ativar o suporte (minerais argilosos, vidro, alumino-silicatos ou carvão ativo).

Os métodos propostos para ativar esses diversos suportes são numerosos e estão abundantemente descritos em literatura (Guilbault, 1984; Guilbault e Oliveira Neto, 1985; Kennedy e White, 1985):

a) sais de diazônio, o suporte deve comportar núcleos aromáticos portadores de uma função amino. Esta imobilização, ativada pelo nitrito de sódio em meio ácido, dá um agrupamento diazônico sobre o qual a molécula enzimática pode se ligar por um agrupamento aminado, o núcleo imidazol de uma histidina ou o núcleo fenólico de uma tirosina. Entre os suportes ativados desta maneira, o p-aminobenzoilcelulose ou o vidro são frequentemente empregados.

b) método a azoteto, parte-se do éster metílico da carboximetilcelulose que é transformado em derivado azoteto, o qual reage com a enzima a baixa temperatura para formar uma ligação do tipo amido (Mitz e Summaria, 1961). É necessário, no curso das operações, proteger os agrupamentos sulfidrilas da proteína e, especialmente, aqueles implicados no sítio ativo que poderiam reagir com o azoteto, provocando a inativação da enzima.

c) alquilação, realiza-se a condensação dos grupos amino, fenol ou sulfidrilas das proteínas e de um agrupamento halogenado do suporte

bromoacetilcelulose ou iodoacetilcelulose.

d) reativos multifuncionais, fundamentado na formação de pontes entre os grupos aminados de um suporte e da enzima por intermédio de um ligante bi ou multifuncional; permite separar o biocatalisador de seu suporte sólido, o que melhora a acessibilidade do substrato ao sítio ativo da enzima. O glutaraldeído correntemente usado em histoquímica como fixador de estruturas é, certamente, o reativo de uso mais difundido. Outros agentes polifuncionais podem igualmente ser utilizados. Como exemplos, citam-se, diamino-butano (pentano ou hexano), 1,5-difluoro, 2,4-dinitrobenzeno, 2-isocianato, 4'-isotiocianato tolueno ou ainda o ácido bis-diazobenzidina 2,2'-dissulfônico (Matsukura et alii, 1993).

e) reticulação, as moléculas de enzima ligam-se entre si por pontes intermoleculares, fazendo intervir agentes bi- ou multifuncionais. Obtêm-se, assim, estruturas de peso molecular muito alto; como exemplo, cita-se a correticulação por hexametenodiisotiocianato (Ozawa, 1967).

A imobilização dos biocatalisadores por ligações covalentes (Fig. 9) caracteriza-se pela solidez do vínculo proteína-suporte. As quantidades de enzimas adicionadas são mais baixas do que no caso da inclusão ou da fixação por adsorção e as perdas pela liberação no meio são mínimas. Essa técnica, embora relativamente complexa para ser utilizada, é particularmente adaptada às enzimas de preço elevado.

O inconveniente principal do processo está nos riscos de inativação parcial ou total da enzima no decorrer da reação de fixação. Além disso, como em outras técnicas, os suportes orgânicos são suscetíveis de serem atacados por microorganismos e são sensíveis às condições do meio: variações do pH, emprego de certos solventes, etc. Os suportes minerais, muito mais resistentes, geralmente apresentam uma densidade de sítios de interação mais baixa.

A técnica de reticulação (Fig. 9) entre enzimas e proteínas inativas, frequentemente, proporciona complexos de alta atividade e grande resistência à degradação proteolítica que é explicada por fenômenos de impedimento estérico (Guilbault e Oliveira Neto, 1985).

Os efeitos da imobilização sobre a atividade das enzimas resultam da interação de diferentes fatores (Chibata, 1978; Guilbault e Oliveira Neto, 1985):

- a) modificação da estrutura tridimensional da enzima, sob a ação de injunções devidas à fixação;
- b) modificações do microambiente: pH local, interações eletrostáticas;
- c) fenômenos de difusão no interior do complexo;
- d) impedimento estérico.

Esse conjunto de fatores representa papel importante na atividade e estabilidade da enzima. As condições ótimas de ação das enzimas

imobilizadas frequentemente diferem daquelas das enzimas em solução e precisam ser perfeitamente conhecidas para evitar todo risco de erros de interpretação. Como exemplo, cita-se urease fixada sobre bentonite, a atividade com pH 7,7 só atinge 75% da atividade da enzima livre, ao passo que ela é de 100% com pH 7,1 (Berset, 1984; Kennedy e White, 1985; Silva, 1991).

As quantidades de proteína retidas são, também, muito variáveis e dependem da enzima considerada, do suporte utilizado, do método de imobilização empregado. Não existe, devido aos fenômenos de impedimento estérico, uma relação linear entre a atividade, relacionada à unidade de massa do complexo, e a quantidade de biocatalisador fixado.

A imobilização da enzima, na presença do substrato ou de um inibidor competitivo, protege o sítio ativo e impede a criação de ligações entre o suporte e os aminoácidos que intervêm na catálise. Para as enzimas com agrupamentos -SH, muito sensíveis à oxidação, é preferível bloquear as funções tiol antes da fixação e reativá-las no momento do emprego (Guilbault e Oliveira Neto, 1985).

As condições de pH e de temperatura necessárias à reação de imobilização podem provocar a desnaturação parcial ou total da proteína. Mas, uma vez que a imobilização foi realizada, observa-se, frequentemente, que as enzimas fixadas resistem melhor às variações de pH e aos

tratamentos térmicos do que as espécies em solução. Ainda aqui, a resposta difere de acordo com a origem da enzima, o suporte utilizado e o método de fixação considerado. Inúmeros autores observaram uma defasagem de valores do pH ótimo que pode diferir em até duas unidades dependendo da enzima estudada ser imobilizada ou em solução. Tal fenômeno pode ser explicado facilmente quando o suporte sólido comportar numerosos grupos ionizados:

a) o suporte é carregado negativamente, cria-se na vizinhança imediata das partículas sólidas, uma concentração de prótons do meio. O pH nessa zona é mais ácido do que o medido no reator; esses prótons podem ser produzidos no curso da reação catalítica, neste caso, a velocidade de difusão de íons H^+ na massa da solução influi no perfil de atividade em função do pH.

b) o suporte está carregado positivamente, em consequência da repulsão dos prótons, o pH ótimo aparente situa-se em zona mais ácida.

Em relação aos fenômenos de difusão, enquanto a atividade das enzimas em solução é regida pelas leis da catálise homogênea, no emprego das enzimas imobilizadas intervêm duas fases distintas: a catálise heterogênea e os mecanismos de difusão (Berset, 1984).

Na imobilização por ligação covalente cruzada, as moléculas das enzimas ligam-se entre si por pontes intermoleculares, utilizando agentes bi

ou multifuncionais, obtendo-se desta forma, estruturas de alto peso molecular (Kennedy e White, 1985; Silva, 1991).

Alguns destes reagentes são o glutaraldeído (Jansen e Olson, 1969; Massom e Towshend, 1984), ácido bisdiazobenzidina-2,2-dissulfônico (Goldman et alii, 1975), ácido difenil-4,4-ditioacetato-2,2-dissulfônico (Manecke e Gurgel, 1967), entre outros. Dentre estes reagentes polifuncionais, o glutaraldeído é um dos mais utilizados para este tipo de imobilização (v. item 2.1).

Quando uma enzima é imobilizada, algumas de suas características podem se alterar: pH ótimo, devido a modificação do microambiente (pH local, interações eletrostáticas, etc); constante de Michaelis-Menten, devido ao efeito de difusão, modificação na estrutura tridimensional, etc.; maior estabilidade, a velocidade de desnaturação é menor que a enzima livre (Berset, 1984).

Estas novas características conferem vantagens às enzimas imobilizadas em relação às solúveis como, baixo custo por análise, reutilização, eficiência em reações com múltiplas etapas, maior reprodutibilidade e precisão (Silva, 1991; Mottola, 1987).

Em função das diferentes características químicas e de composição das enzimas, métodos de imobilização têm sido largamente citados (Kennedy e White, 1985; Guilbault e Oliveira Neto, 1985). Assim,

novos métodos de imobilização têm sido desenvolvidos, muitas vezes aprimorando os já existentes, e aplicados às mais diversas enzimas (Yokoyama et alii, 1991; Umana e Waller, 1986; Shinobara et alii, 1987; Janda e Weber, 1991; Foulds e Lower, 1986; Bartlett e Whitaker, 1987).

1. METODOLOGIA

1.1. Imobilização de enzimas em vidro de porosidade controlada

Para imobilização de enzimas em vidro de porosidade controlada, alguns procedimentos prévios devem ser realizados para preparar o material que suportará estes biocatalisadores (Masoom e Townshend, 1984; Massom e Townshend, 1985; Guilbault e Oliveira Neto, 1985).

Assim, toma-se 1 g de vidro de porosidade controlada e leva-se a ferver durante 30 minutos em solução de ácido nítrico a 5%, com agitação. Recomenda-se manter sempre um nível de solução, ao redor de 40 ml de ácido, e utilizar vidro de relógio para evitar perda de material. Após terminada esta etapa, leva-se o mesmo à filtração à vácuo, lavando-se com água destilada. A seguir, seca-se em estufa (95 °C) por aproximadamente 2 horas.

Posteriormente, na etapa relativa à silanização, toma-se 5 ml de

3-aminopropil-trietoxi-silano e junta-se a 45 ml de solução-tampão pH 4,7 (0,05 mol/l em ácido acético/acetato de sódio). Esta solução mais o vidro, previamente limpo e seco, é levado a banho-maria (95 °C) durante 2 horas; a cada 15 minutos realiza-se pequena agitação de forma a facilitar a interação desta solução com o vidro. Após o termo pré-estabelecido, leva-se à filtração e à estufa (95 °C) até secura (recomenda-se algo em torno de 10 a 12 horas).

Na terceira e última etapa, referente ao acoplamento com glutaraldeído, prepara-se uma solução em glutaraldeído (50 ml) a 15% em solução-tampão pirofosfato 0,1 mol/l (pH 8,5) e junta-se ao vidro-silanizado seco; logo a seguir, agitou-se a mistura por aproximadamente uma hora a temperatura ambiente. Terminado este tempo, leva-se à filtração, lavando-se sempre com água destilada. Este material é deixado em dessecador por, pelo menos, 15 horas. O material resultante, pode ser armazenado, protegido da luz, por tempo indefinido.

1.1.1. Imobilização de glicerol desidrogenase

Para imobilização de glicerol desidrogenase, foi realizado o seguinte procedimento:

Preparou-se, utilizando-se solução-tampão pH 6,8 (0,1 mol/l em

fosfato de sódio ou potássio), solução enzimática contendo 250 unidades/ml. Juntou-se 100 mg de vidro ativado a esta solução enzimática, e manteve-se em refrigeração, por volta de 4 °C, durante 24 horas (recomenda-se realizar pequenas agitações a cada 15 minutos na primeira hora de armazenamento).

A partir deste material, foram confeccionados os reatores enzimáticos, normalmente, com dimensões que não excediam 15-mm de comprimento com 2-mm de diâmetro interno; este procedimento, evitava ruptura nas conexões destes reatores, normalmente presentes, quando há um incremento na pressão interna do sistema FIA.

1.1.2. Avaliação dos reatores enzimáticos

O ponto inicial do trabalho teve como principal objetivo a maximização da sensibilidade analítica e, em virtude disto, melhoria em seletividade para o método. Desta forma, o sistema proposto foi projetado com base em algumas condições experimentais apresentadas por Kiba et alii (1986).

O sistema FIA da Fig. 10A, foi utilizado para estudo das principais variáveis associadas na oxidação de glicerol por β -nicotinamida adenina dinucleotídeo (β -NAD⁺), na presença de glicerol dehidrogenase.



A forma reduzida da coenzima, normalmente, é monitorada espectrofotometricamente a 340 nm. Alternativamente, esta detecção pode ser realizada espectrofluorimetricamente a 340 nm e 460 nm (excitação e emissão respectivamente). Esta última, por apresentar melhor sensibilidade, foi escolhida para a determinação de glicerol em vinhos de mesa, no intervalo de concentração de 1 a 15 mg/l.

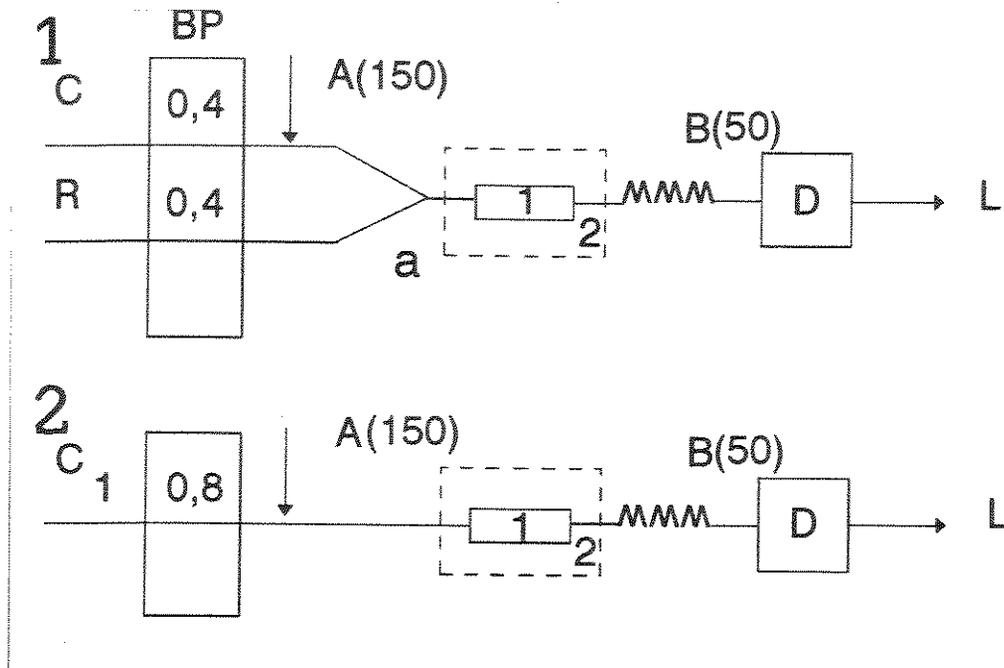


Fig. 10. Diagrama de fluxos do sistema FIA empregado para estudo das principais variáveis associadas à oxidação de glicerol (1) e determinação de glicerol (2). C - solução carregadora; C₁ - reagente combinado; R - solução em β-NAD; 1 - reator enzimático (glicerol desidrogenase); 2 - banho termostatizado; BP - bomba peristáltica com vazões em ml/min; A - amostra com especificação do volume injetado em µl; B - bobina de homogeneização, com especificação do comprimento em cm; D - detector; L - lixo; a - ponto de confluência.

Assim, foram utilizadas as seguintes soluções-padrão: solução-tampão pH 10 (0,1 mol/l bicarbonato de potássio/carbonato de sódio), solução β -NAD diluída na mesma solução-tampão e solução-padrão no intervalo de 10,0 a 100,0 mg de glicerol/ml.

Na posição especificada na Fig. 10.1, a amostra (A) era aspirada através da alça de amostragem sendo efluida.

Na posição alternativa, o volume selecionado de amostra era inserido no fluxo carregador (C), sendo transportado à detecção; no ponto de confluência (a), a zona de amostra tamponada a pH 10, recebia solução 4,5 mmol/l em β -NAD. Durante sua passagem pelo reator enzimático (1, GDH), esta reação era catalisada pela enzima glicerol dehidrogenase, e o produto desta, NADH, era medido originando um sinal analítico proporcional ao teor de glicerol presente na amostra.

Após verificar-se o desempenho do sistema, foram iniciados experimentos visando verificar a influência da temperatura na reação enzimática, assim como das variáveis envolvidas no sistema FIA (volume injetado, vazão e comprimento do reator enzimático) e das variáveis químicas (concentração dos reativos e pH). Para isto, foi empregada solução-padrão 100,0 mg glicerol/l.

1.1.2.1. Influência da temperatura

O efeito da temperatura é um parâmetro de grande importância nas reações enzimáticas (Guilbault, 1984), e experimentos foram conduzidos no sentido de se verificar esta influência na reação de glicerol desidrogenase.

Utilizando-se sistema da Fig. 10.1, foi realizado experimento para verificar a influência da temperatura na reação de redução de β -NAD pela enzima em questão. Assim, este valor foi variado em 25, 30, 35, e 40 °C, com o reator enzimático sendo inserido em banho-maria.

1.1.2.2. Efeito do volume injetado, vazão, comprimento do reator enzimático e bobina

Em função de terem sido classificados como variáveis FIA, estes parâmetros foram citados no mesmo item.

Para realização deste experimento, a temperatura na reação enzimática foi mantida como 35° C e as demais variáveis fixadas como indicado no sistema FIA da Fig. 10.1.

A influência do volume injetado foi verificada após variação deste valor entre 50 e 250 μ l.

Utilizando-se este mesmo sistema, e fixando-se o valor do volume injetado em 150 μ l, variou-se o valor da vazão em 0,2, 0,4, 0,6, 0,8 e 1,0 ml/min (25, 50, 75, 100 e 125%).

O valor do comprimento do reator enzimático foi variado entre 1 - 3 cm, e a bobina de reação/homogeneização foi estudada variando-se este valor entre 50 e 400 cm de comprimento.

1.1.2.3. Influência do pH e da concentração de β -NAD⁺

A influência do pH, assim como da concentração de cofator (β -NAD⁺) na oxidação de glicerol foi verificada variando-se este valor entre 7 - 13 e 1,0 - 6,0 mmol/l respectivamente.

1.1.2.4. Verificação de espécies interferentes

As espécies foram selecionadas em função de suas presenças em amostras de vinho. Foram testados os açúcares redutores (glicose e frutose) além da sacarose: soluções a 20% (m/v); ácidos acético e succínico: soluções a 0,5%; etanol: solução a 1%.

1.1.3. Determinação de glicerol

Para determinação de glicerol em amostras de vinho, o sistema FIA da Fig. 10 foi simplificado para uma configuração em linha única (Fig. 10.2). A solução-carregadora foi combinada (solução-tampão 0,1 mol/l em bicarbonato de potássio/carbonato de sódio + 4,5 mmol/l β -NAD⁺) e o comprimento do reator foi fixado como 50 cm. Com este sistema, as características analíticas foram avaliadas.

2. RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.1. Imobilização de enzimas em vidro de porosidade controlada

A eficiência da imobilização enzimática está intimamente relacionada com a área específica; isto foi comprovado, empregando-se vidros de porosidade controlada com áreas superficiais de 77,5 e 6,65 m²/g respectivamente.

No primeiro caso, foi notada estabilidade do reator enzimático por mais de 6 meses; apenas pequenas variações, por volta de 10% foram notadas em sinal analítico após este intervalo de tempo. Por outro lado, empregando-se o segundo tipo de vidro de porosidade controlada, observou-se variação em torno de 20 a 25% após 24 horas e 85% após uma semana de uso do reator enzimático.

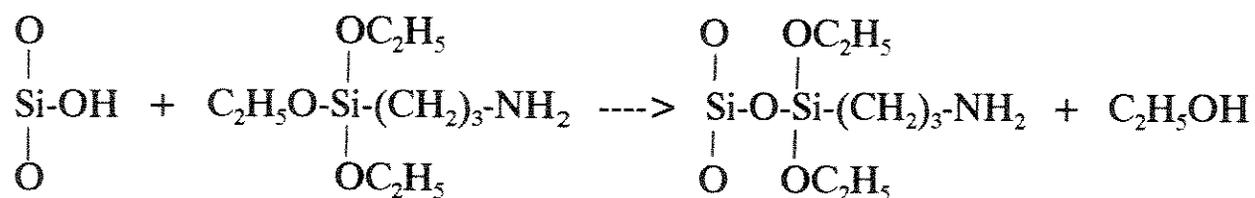
Saliente-se que, após um período de trabalho, todos os reatores enzimáticos passavam por um período de regeneração com solução-tampão fosfato (pH 6,8).

A limpeza do vidro é de grande importância para eliminar metais e outras impurezas comumente presentes neste material. A presença destas espécies também comprometem a eficiência de imobilização enzimática, visto que ocupariam posições importantes nas reações de

imobilização (v. representações a seguir). Após experimentos, verificou-se que o tempo especificado, com ácido nítrico a 5% foi suficiente para garantir a eliminação destas impurezas.

Com relação a etapa de silanização, foi observado que trata-se da fase mais crítica do procedimento para preparo do suporte do biocatalisador. A perfeita condução desta etapa vai resultar ao vidro, após acoplamento com glutaraldeído, em coloração vermelho-tijolo, tonalidade característica de que a etapa de silanização foi bem realizada.

A seguir representa-se a reação de 3-aminopropil-trietoxi-silano com o vidro (após lavagem com ácido nítrico):

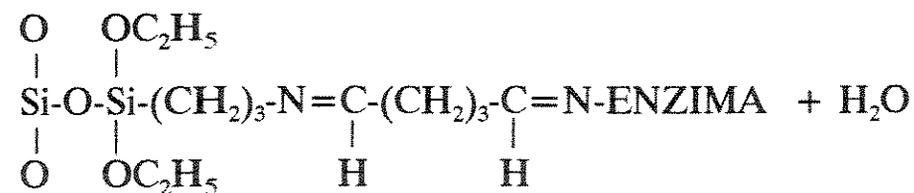
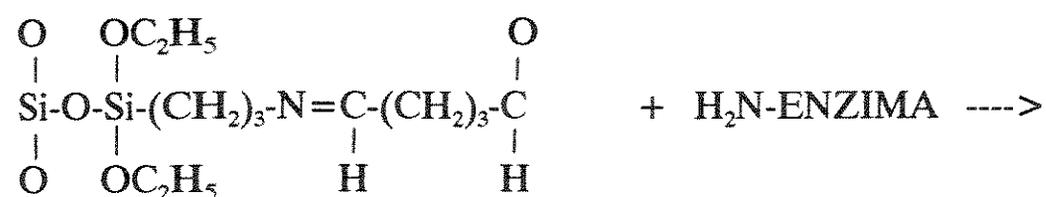
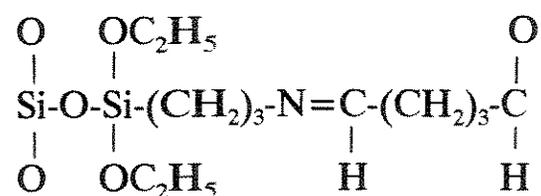
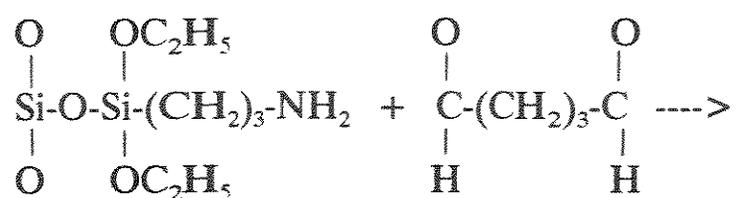


O controle do pH do meio, assim como a utilização do vidro limpo e seco, são indispensáveis nesta etapa; enfatiza-se que agitação periódica contribui, também, para aumentar a eficiência na reação de silanização, pois incrementa-se a interação entre o vidro e o reativo.

O acoplamento com glutaraldeído, consiste na etapa final da preparação do suporte: após boa condução das etapas anteriores, será

detectada, coloração característica após adição do reativo.

Para finalizar a representação do procedimento analítico, serão esquematizadas às reações do acoplamento do vidro silanizado com glutaraldeído e com a enzima.



O método proposto para determinação de glicerol empregando glicerol desidrogenase, demonstrou ser extremamente simples e robusto; pois, além da enzima empregada ter grande estabilidade, como por exemplo, não sofrer tanto às variações de temperatura (Fig. 11), resulta resposta analítica muito similar àquela obtida alguns meses antes. Além disso é bem mais simples e barato do que os métodos alternativos que utilizam um sistemas com duas ou três enzimas: glicerol quinase e glicerol-3-fosfato desidrogenase (Wieland, 1974), ou glicerol quinase, piruvato quinase e lactato desidrogenase (Eggstein e Kuhlmann, 1974).

2.1.1. Imobilização de glicerol desidrogenase

O controle do pH é de extrema importância para uma perfeita imobilização enzimática. No caso de glicerol desidrogenase, pH 6,8 em solução-tampão fosfato (0,1 mol/l) foi o mais indicado.

O tempo de permanência enzima/suporte deve ser rigorosamente respeitado, pois caso contrário, não será observada grande eficiência da imobilização. Este tempo, ao redor de 24 horas, à temperatura 4°C, com agitação periódica (p.e. a cada 30 minutos), forneceu os melhores resultados.

Recomenda-se, sempre ao final de uma análise ou após um dia de trabalho, que solução-tampão, no caso, fosfato pH 6,8 (0,1 mol/l), flua

através da coluna enzimática de forma a regenerá-la garantindo maior estabilidade enzimática.

2.1.2. Avaliação dos reatores enzimáticos

Quando do início dos experimentos com glicerol dehidrogenase, foi necessário possuir um sistema FIA de partida: apresentar um sistema inicial de forma a conhecer o comportamento da reação enzimática e a partir daí, conhecendo-se um pouco mais do sistema em questão, poder propor um sistema FIA mais elaborado verificando as influências das inúmeras variáveis, tais como, temperatura, vazão, volume injetado, concentração de reativos, solução-tampão, etc.

2.1.2.1. Influência da temperatura

A reação proposta, é dependente da temperatura. Entretanto, como pode ser observado por meio da Fig. 11, este efeito não é tão crítico. De fato, incrementando-se este valor em 10° C, nota-se aumento na altura do sinal analítico da ordem de 45%. Considerando-se outras enzimas, glicerol dehidrogenase não demonstrou ser tão sensível neste aspecto. A

reação de glicerol com glicerol dehidrogenase, como pode ser verificada pela figura, foi favorecida pelo aumento da temperatura (25 - 35° C) resultando em aumento da cinética da reação. Para valores de temperatura maiores do que 35° C era sempre notada uma queda no sinal analítico denotando certa desnaturação enzimática. Saliente-se que dependendo da sensibilidade requerida, pode-se variar o valor da mesma entre 25 e 40°C; dependendo da necessidade de análise, e do compromisso em manter por mais tempo a estabilidade enzimática.

Considerando-se a proposta original do trabalho, qual seja, da determinação de glicerol em larga escala, foi escolhida como valor mais satisfatório a temperatura de 35°C. Com este valor notou-se maior sensibilidade associada a estabilidade enzimática (1 a 2 meses).

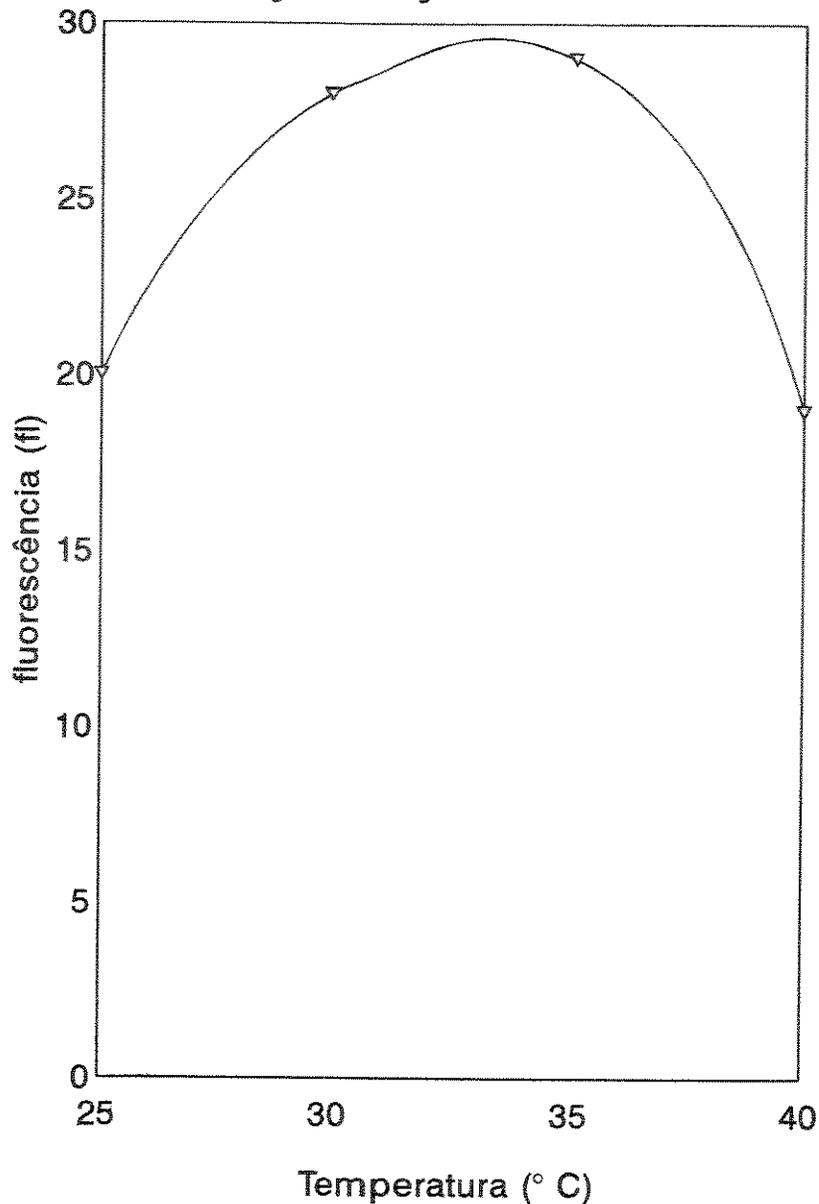


Fig. 11. Influência da temperatura na reação de glicerol desidrogenase. A figura se refere ao sistema da Fig. 10.1, com solução-padrão 15 mg glicerol/l sendo injetada como amostra (150 μ l); C (0,4 ml/min) como solução carregadora (0,1 mol/l bicarbonato de potássio/carbonato de sódio, pH 10) e R (0,4 ml/min) como solução em β -NAD⁺ (diluídos na mesma solução carregadora); comprimento do reator enzimático = 1,5 cm.

2.1.2.2. Efeito do volume injetado, vazão e comprimento do reator enzimático

Aumentando-se o volume injetado de 50 a 100 μL , notou-se aumento no sinal analítico da ordem de 100% (Fig. 12); e este aumento foi proporcional até 150 μl . A partir deste valor até 200 μL , o incremento não foi tão significativo ($\pm 10\%$). Isto demonstrou que a saturação no sinal analítico foi atingido. Além deste aspecto, utilizando-se um volume injetado maior observou-se diminuição da frequência de amostragem com aumento do tempo de limpeza do pico registrado (tempo necessário à restauração da linha base). Dependendo da sensibilidade e do compromisso de análise, pode-se também, como no caso da temperatura, escolher o melhor valor. Neste trabalho, escolheu-se 150 μl como valor de volume injetado, suficiente para garantir as necessidades de análise; além disto, com este valor, evitou-se a necessidade de diluições prévias, principalmente no caso de amostras de vinho tinto.

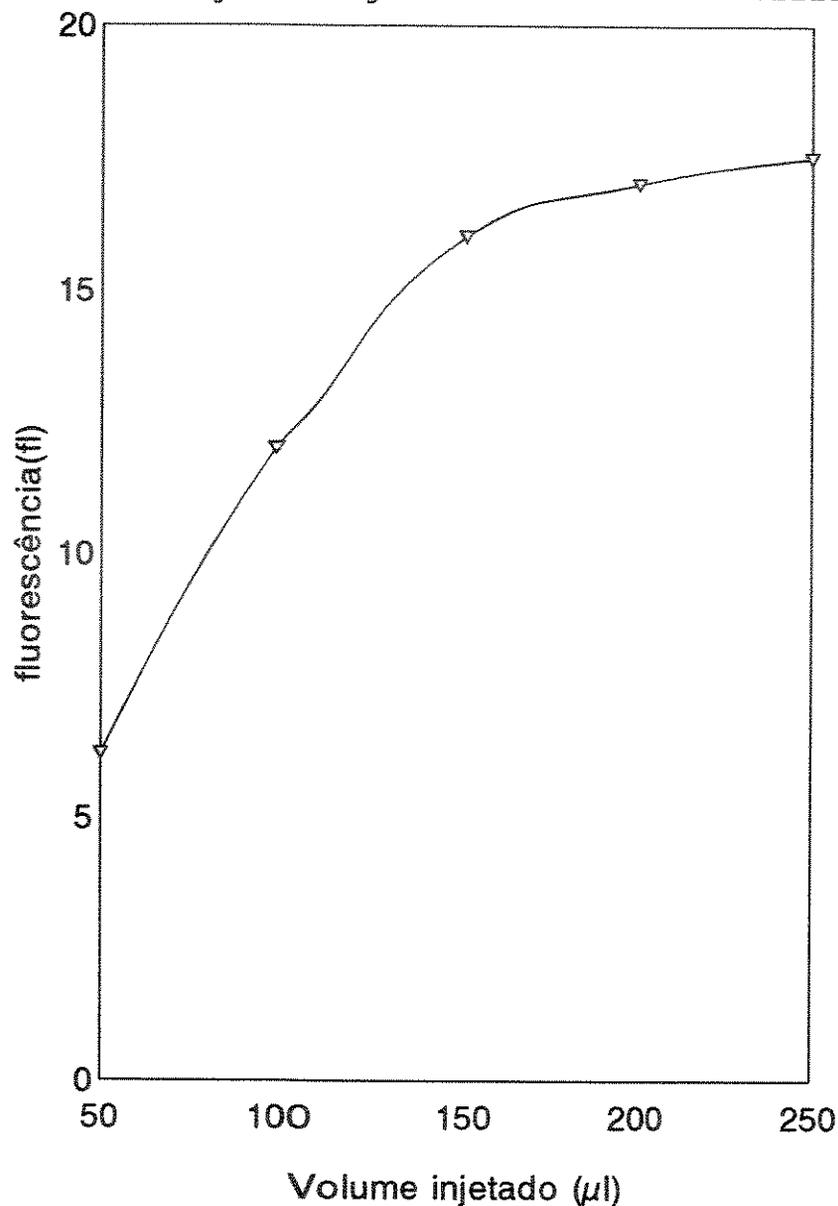


Fig. 12. Efeito do volume injetado. A figura se refere ao sistema da Fig. 10.1, com solução-padrão 5 mg glicerol/l sendo injetada como amostra ($150\mu\text{l}$); C ($0,4\text{ ml/min}$) como solução carregadora ($0,1\text{ mol/l}$ bicarbonato de potássio/carbonato de sódio, pH 10) e R ($0,4\text{ ml/min}$) como solução em $\beta\text{-NAD}^+$ (diluídos na mesma solução carregadora); temperatura = 35° C ; comprimento do reator enzimático = $1,5\text{ cm}$.

Com o aumento da vazão, foi notada diminuição significativa no sinal analítico (Fig. 13), pois diminuiu-se o tempo médio de residência entre glicerol e glicerol desidrogenase. De fato, quando este valor passou de 0,2 - 1,0 ml/min, foi observada perda no sinal analítico da ordem de 80%. Considerando-se o intervalo de variação deste parâmetro, pode-se afirmar que foi observada expressiva influência. Volta-se a afirmar que, dependendo do compromisso assumido, este valor pode ser melhor selecionado; no caso deste trabalho, fixou-se esta vazão em 0,8 ml/min. Valores menores, apesar de apresentarem maiores sinais analíticos, resultariam em metodologia mais lenta, comprometendo a velocidade analítica; maiores valores, acima de 0,8 ml/min, comprometiam a pressão interna do sistema, com ruptura das conexões dos reatores.

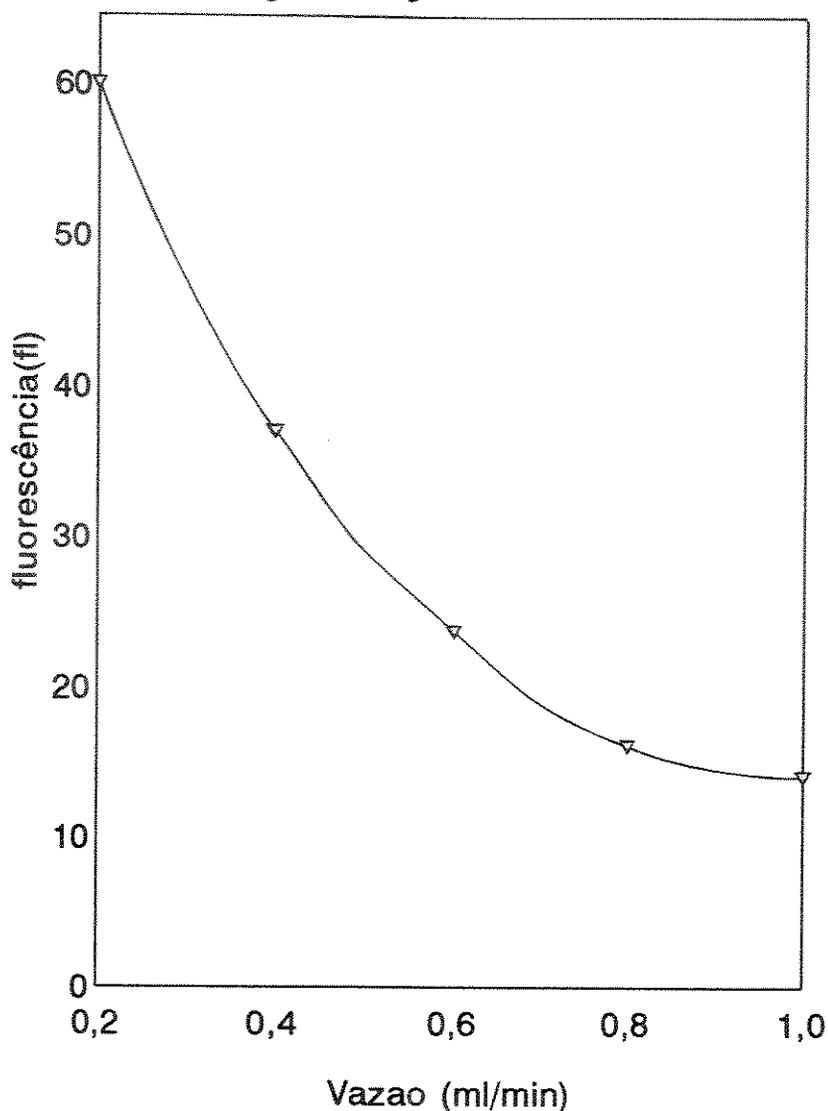


Fig. 13. Efeito da vazão na reação de glicerol desidrogenase. A figura se refere ao sistema da Fig. 10.1, com solução-padrão 5 mg glicerol/l sendo injetada como amostra ($150\mu\text{l}$); C, como solução carregadora (0,1 mol/l bicarbonato de potássio/carbonato de sódio, pH 10) e R, como solução em $\beta\text{-NAD}^+$ (diluídos na mesma solução carregadora); temperatura = 35°C ; comprimento do reator enzimático = 1,5 cm.

Aumentando-se o tamanho do reator enzimático observa-se maior sinal analítico (Fig. 14) pois maior quantidade de enzimas estava sendo empregada para a mesma concentração de analito. Entretanto, uma das características da imobilização enzimática é garantir uma análise de baixo custo, empregando, na medida do possível, a menor quantidade de enzimas. Saliente-se, que aumentando-se o comprimento do reator enzimático observou-se, também, maior pressão interna no sistema.

Considerando-se as necessidades de análise do sistema em questão, o tamanho do reator enzimático foi fixado como 1,5-cm; este comprimento foi suficiente para garantir o processamento das amostras com significativa sensibilidade, e com menor custo.

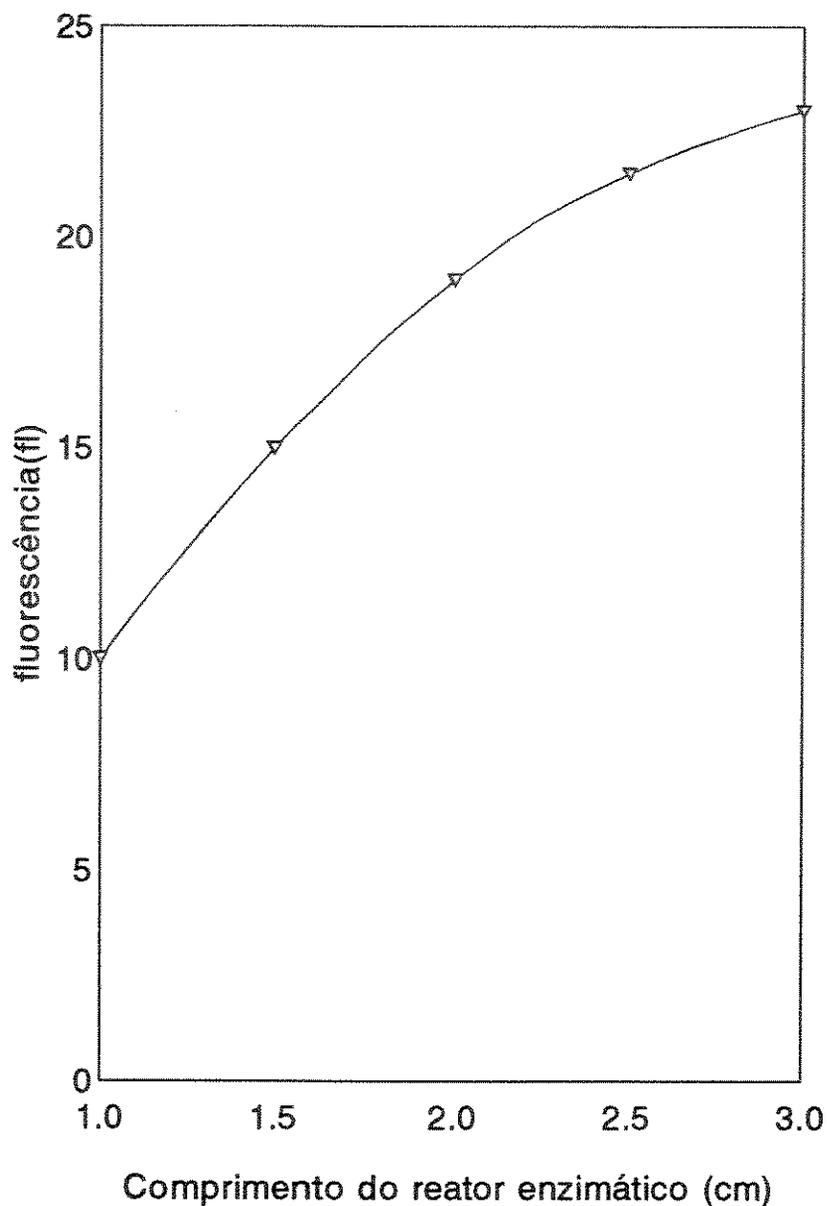


Fig. 14. Influência do aumento do reator enzimático. A figura se refere ao sistema da Fig. 10.1, com solução-padrão 5 mg glicerol/l sendo injetada como amostra (150 μ l); C (0,4 ml/min) como solução carregadora (0,1 mol/l bicarbonato de potássio/carbonato de sódio, pH 10) e R (0,4 ml/min) como solução em β -NAD⁺ (diluídos na mesma solução carregadora); temperatura = 35° C.

2.1.2.3. Efeito do pH e da concentração de β -NAD⁺

A reação enzimática de glicerol desidrogenase é dependente do pH (Fig. 15). De fato, para valores abaixo de 10, eleito como melhor para processamento das amostras, sempre foi observada diminuição significativa no sinal analítico. Para valor igual a 11, foi registrado maior sinal analítico, entretanto, com menor estabilidade enzimática. Esta instabilidade refletiu-se na perda de repetibilidade quando foram realizadas injeções consecutivas. Desta forma, o melhor valor de pH para a reação foi definido como 10.

Saliente-se que, quando da realização de testes preliminares com glicerol desidrogenase em solução, foi encontrado 8,5 como valor ótimo de pH; e este valor foi alterado (Fig. 15) quando em condições de imobilização. Apesar de ter sido fixado como 10 o melhor valor de pH para a análise em questão, este valor pode ser variado em função das necessidades de maior ou menor sensibilidade. Evidentemente, nestas novas situações, sempre há um comprometimento com outros parâmetros, como por exemplo, a estabilidade enzimática.

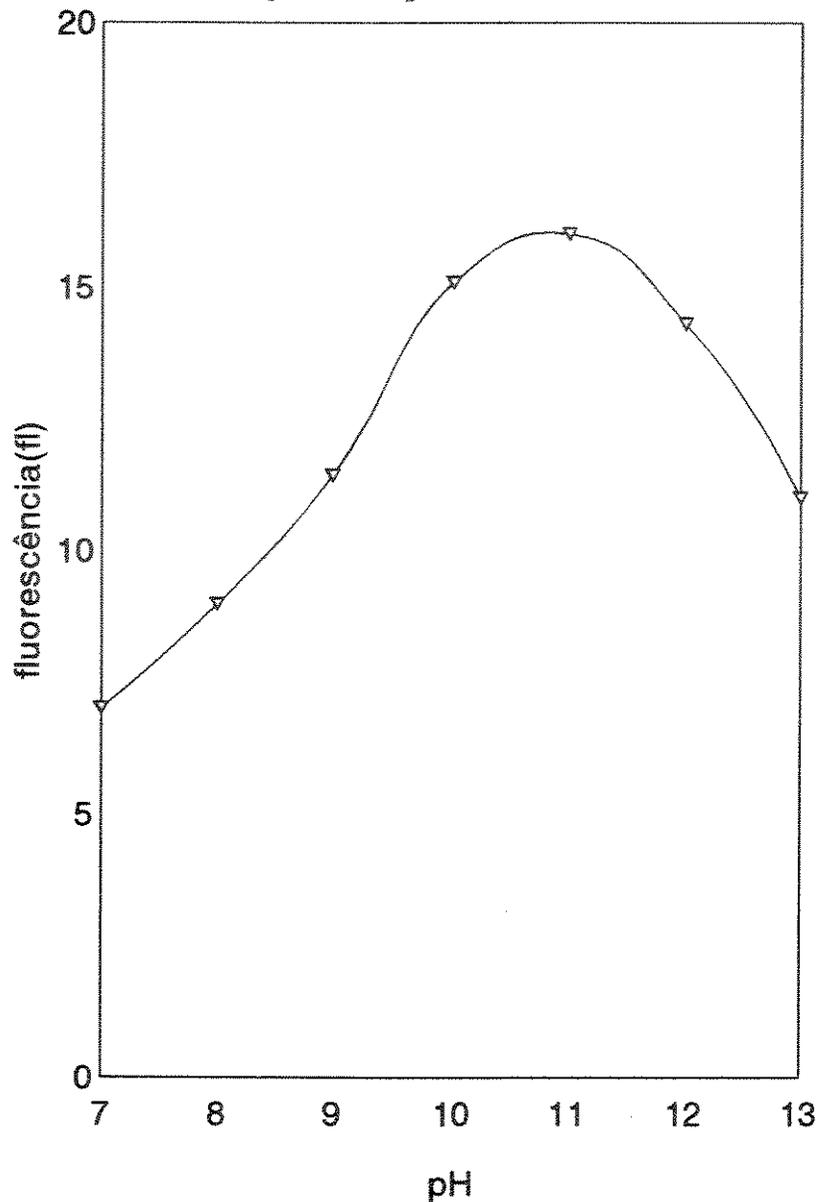


Fig. 15. Efeito do pH na reação de glicerol desidrogenase. A figura se refere ao sistema da Fig. 10.1, com solução-padrão 5 mg glicerol/l sendo injetada como amostra ($150\mu\text{l}$); C ($0,4\text{ ml/min}$) como solução carregadora ($0,1\text{ mol/l}$ bicarbonato de potássio/carbonato de sódio, pH 10) e R ($0,4\text{ ml/min}$) como solução em $\beta\text{-NAD}^+$ (diluídos na mesma solução carregadora); temperatura = 35° C ; comprimento do reator enzimático = $1,5\text{ cm}$.

Aumentando-se a concentração de β -NAD⁺ observou-se maior sinal analítico (Fig. 16); um excesso do cofator favorece o equilíbrio da reação enzimática para a direita, com conseqüente maior formação da espécie a ser monitorada NADH. Assim, para valores entre 1,0 e 4,5 mmol/l, foi observado aumento em altura de pico da ordem de 80%.

Entretanto, a partir deste valor até 6,0 mmol/l, a dependência diminuiu. Isto demonstra que, para as necessidades impostas, 4,5 mmol/l em β -NAD⁺ foi suficiente para garantir as necessidades de análise.

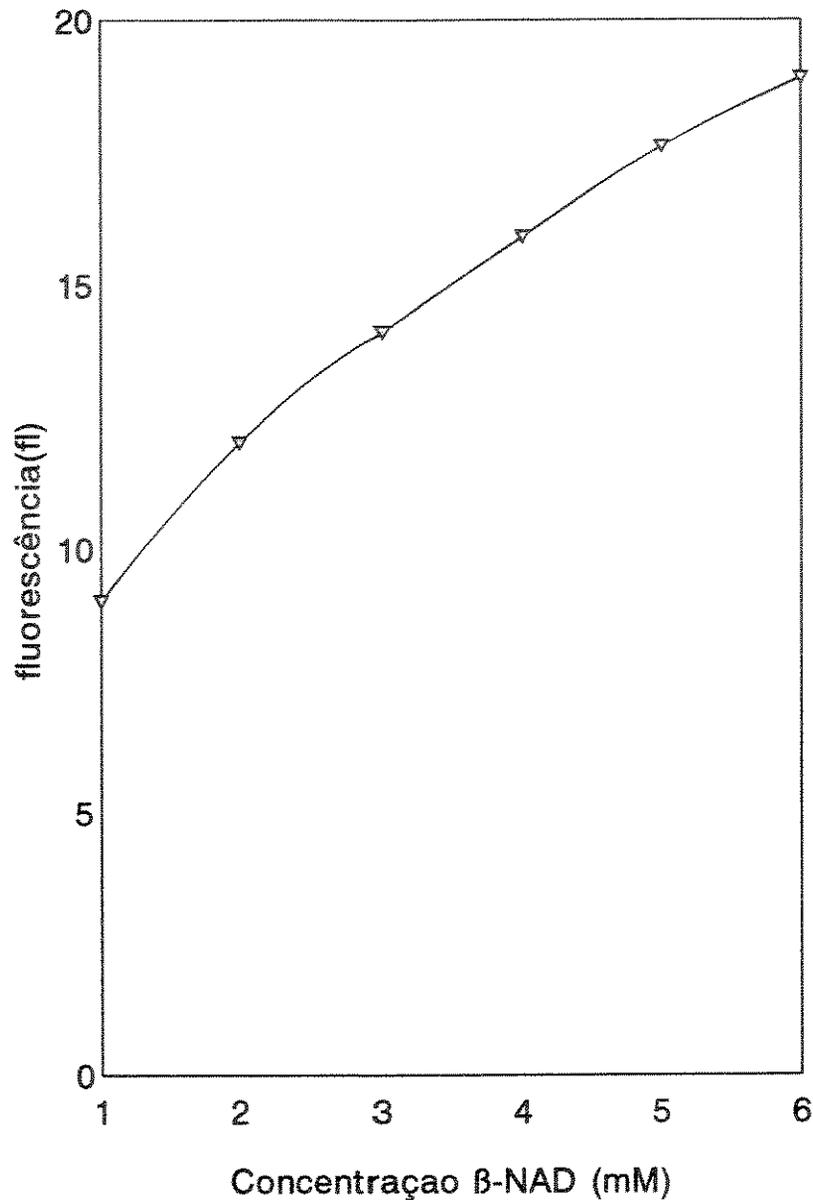


Fig. 16. Influência da concentração de β -NAD⁺. A figura se refere ao sistema da Fig. 10.1, com solução-padrão 5 mg glicerol/l sendo injetada como amostra (150 μ l); C (0,4 ml/min) como solução carregadora (0,1 mol/l bicarbonato de potássio/carbonato de sódio, pH 10) e R (0,4 ml/min) como solução em β -NAD⁺ (diluídos na mesma solução carregadora); temperatura = 35° C; comprimento do reator enzimático = 1,5 cm.

A otimização das variáveis envolvidas no sistema, foram agrupadas em física, química e hidrodinâmica, e foram definidas pelo método univariado. A tabela 7, demonstra os intervalos nos quais estas variáveis foram estudadas e o valor selecionado encontrado para cada situação.

Tab. 7. Otimização das variáveis. Valores obtidos empregando-se o sistema FIA da Fig. 10.1.

Tipo	Variável	Intervalo	Valor ótimo
Física	temperatura, °C	25 - 45	35
	FIA	vazão, ml/min	0,2 - 1,0
Química	reator, cm	1 - 3	1,5
	bobina, cm	50 - 400	50
	volume, μ l	50 - 200	150
	[C], mmol/l		100
	pH	7 - 13	10
	[β -NAD], mmol/l	1 - 6	4,5

2.1.2.4. Verificação de espécies interferentes

Para estudo de espécies interferentes, foram escolhidas àquelas espécies encontradas em maior concentração em amostras de vinhos. A baixa

razão interferente/analito encontrada em literatura (Delanoe et alii, 1987), e a alta diluição da amostra (no sistema FIA) necessária para ajustar a concentração de glicerol em vinhos, permitiu restringir os interferentes em potencial.

As espécies interferentes foram adicionadas às amostras em concentrações maiores do que aquelas que normalmente aparecem. Glicose, frutose e sacarose foram toleradas até a razão de 20.000:1 (interferente:analito); ácidos acético e succínico não causaram interferência até a razão de 50:1. Etanol foi tolerado até a razão de 1000:1.

2.1.3. Determinação de glicerol

Empregando-se os valores ótimos das variáveis estudadas (Tab. 7), uma série de 7 soluções-padrão com concentrações entre 0,0 e 15,0 mg de glicerol/l foram injetadas em triplicata no sistema FIA da Fig. 10B. Tabela 8 resume as características do método (equação, coeficiente de regressão, intervalo linear e desvio-padrão relativo). O intervalo linear determinado foi apropriado para aplicação da determinação desta espécie em amostras de vinhos de mesa. Saliente-se que experimentos paralelos foram realizados empregando-se soluções-padrão entre 1,0 e 30,0 mg para ser verificado o intervalo linear do método proposto.

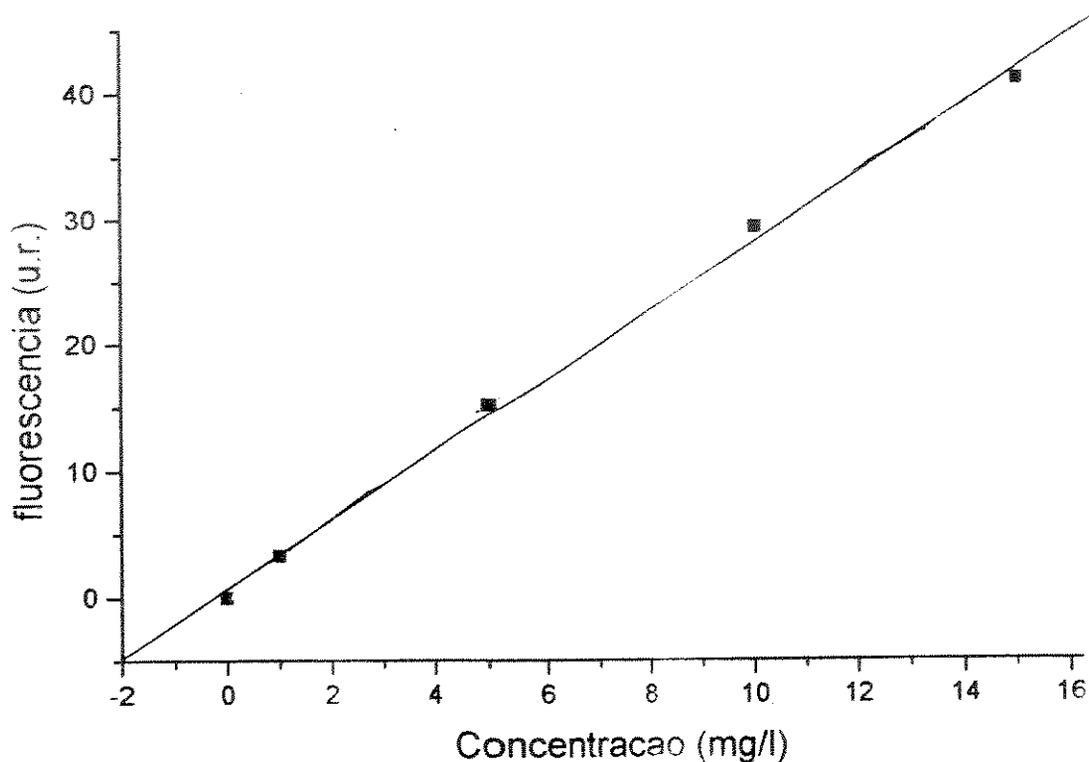


Fig. 17. Curva analítica. A figura se refere ao sistema da Fig. 10.2, com soluções-padrão entre 0,0 e 15,0 mg glicerol/l sendo injetada como amostra ($150\mu\text{l}$); C_1 (0,8 ml/min) como solução carregadora (0,1 mol/l bicarbonato de potássio/carbonato de sódio, pH 10 + $\beta\text{-NAD}^+$ 4,5 mmol/l); temperatura = 35°C ; comprimento do reator enzimático = 1,5 cm.

Tab. 8. Características analíticas do método proposto. Experimento realizado com sistema FIA da Fig. 10.2.

Equação	r	Intervalo linear	d.p.r.(%)
$0,71 + 2,75[G]$	0,9988	0,0 - 15,0	1,0

A precisão foi calculada ($N = 11$), empregando-se solução-padrão de 6,0 mg de glicerol /l. Nesta condição observou-se uma frequência analítica de 60 amostras por hora. Exatidão pode ser verificada por meio da Tabela 9.

Tab. 9. Comparação dos resultados. Concentração de glicerol (mg/l) em vinhos de mesa determinados pelo sistema FIA da Fig. 10.2 e pelo método cromatográfico (H.P.L.C.). Desvios-padrão relativos ao sistema FIA e HPLC expressos em percentagem (%).

Amostra	FIA	HPLC
1	2,5±0,5	2,4±0,5
2	0,8±0,5	0,7±0,5
3	2,3±0,5	2,2±0,5
4	2,7±0,5	2,6±0,5
5	2,7±0,5	2,5±0,5
6	2,9±0,5	2,8±0,5
7	2,8±0,5	2,8±0,5
8	2,0±0,5	1,9±0,5

A comparação entre os métodos, mostra coeficiente de correlação igual a 0,9971 com função $FIA = 0,12 + 0,99[H.P.L.C.]$.

CAPÍTULO 4

DETERMINAÇÃO AMPEROMÉTRICA DE GLICOSE E SACAROSE EM CALDO DE CANA-DE-AÇÚCAR EMPREGANDO SISTEMA DE ANÁLISES POR INJEÇÃO EM FLUXO E ENZIMAS IMOBILIZADAS

A determinação de açúcares (especialmente glicose e sacarose) tem sido amplamente investigada nos mais diversos materiais. Muitas das propostas são fundamentadas em reações enzimáticas, as quais em função de seletividade e alta atividade em baixa concentração (dependendo da enzima) tem demonstrado grande aplicabilidade.

A introdução de métodos baseados em enzimas imobilizadas contribuiu ainda mais para o desenvolvimento nesta área, pois o elevado custo destes biocatalisadores, restringiam em muito as aplicações analíticas. Recentemente, propostas de automação baseando-se nos sistemas de análise por injeção em fluxo e enzimas imobilizadas têm demonstrado importância (Morishita et alii, 1986; Gorton et alii, 1991;).

Desde o desenvolvimento do primeiro sensor para glicose apresentado por Clark e Lyons (1962), e fabricado por Updike e Hicks (1967), há um considerável interesse na utilização de eletrodos enzimáticos fundamentados em detecção amperométrica, especialmente para glicose

(Narasimhan e Wingard, 1986; Foulds e Lowe, 1988; Dong e Kuwasa, 1991).

A intenção deste texto é demonstrar alguns dos trabalhos apresentados em literatura sobre a determinação amperométrica de açúcares redutores totais, especialmente glicose e sacarose (após inversão), fundamentando-se na incorporação das enzimas imobilizadas e sistemas de análise por injeção em fluxo.

Em 1983, Mascini e Palleschi apresentaram proposta da determinação de glicose e uréia em soro de sangue, imobilizando glicose oxidase e urease; glicose foi determinada após quantificação de peróxido de hidrogênio e uréia, após hidrólise, foi determinada empregando-se eletrodo seletivo a amônia. Resultados concordantes com aqueles obtidos por espectrofotometria convencional foram reportados.

Neste mesmo ano, e também investigando amostras de soro de sangue, Yao apresentou a determinação de glicose com eletrodo enzimático quimicamente modificado. Detalhes da construção do sensor amperométrico e do procedimento para imobilização da glicose oxidase, assim como das interferências observadas, foram apresentadas. Segundo o autor, substâncias redutoras que poderiam ser classificadas como interferentes deveriam ser eliminadas após introdução de uma coluna de ditiocarbamato de cobre(II) imediatamente antes do sensor amperométrico. Curva analítica no intervalo de 50 a 400 mg/l e desvio-padrão relativo < 1% foram obtidos.

Combinando o uso de um reator com glicose-oxidase imobilizada e um eletrodo com peroxidase, Yao et alii (1984), propuseram a determinação automatizada de glicose. O eletrodo media o hexacianoferrato (III) produzido pelo peróxido de hidrogênio gerado no reator enzimático:



O hexacianoferrato (III) era medido amperometricamente e como o eletrodo era polarizado a baixo potencial, havia pequena interferência de outros constituintes normalmente presentes em fluídos biológicos. Corrente de pico linear relativa à concentração de glicose no intervalo de 0,05 a 10,0 g/l e ausência de ácido ascórbico até 0,5 mmol/l foram reportadas.

Masoom e Townshend (1984) imobilizaram glicose oxidase em vidro de porosidade controlada, para determinação amperométrica de glicose. O detector era uma célula de fluxo em vidro contendo dois eletrodos retangulares de platina polarizado a 600 mV; a corrente observada era proporcional à concentração de peróxido de hidrogênio originário da reação enzimática. Resultados concordantes com àqueles obtidos convencionalmente e alta estabilidade do reator enzimático foram apresentados.

A determinação amperométrica de glicose em alimentos foi apresentada por Moody et alii (1986). A proposta apresentava glicose oxidase imobilizada e eletrodo padrão de platina formando a base do

eletrodo enzimático. Curva analítica no intervalo de 0,01 a 3,00 mmol/l em glicose foi reportada. Ainda neste ano, Matsumoto et alii, propuseram a determinação amperométrica de frutose empregando frutose-5-dehidrogenase. Intervalo linear entre 0,02 - 2,00 mmol/l em frutose foi apresentado.

A determinação de glicose em café instantâneo foi reportada por Matsukura et alii (1993). O método amperométrico utilizava um eletrodo enzimático construído pela combinação de um eletrodo de oxigênio com β -D-glicose oxidase imobilizada em membrana de colágeno. Esta imobilização foi realizada em duas formas distintas: inicialmente na superfície do eletrodo de oxigênio e posteriormente ao redor do mesmo. Segundo os autores, melhores resultados foram obtidos utilizando-se a segunda forma de imobilização. Resposta linear no intervalo de $8,0 \times 10^{-5}$ e $1,0 \times 10^{-3}$ mol/l em glicose e resultados concordantes com método oficial (0,9964) foram reportados.

Massom e Townshend (1985) propuseram a determinação simultânea de sacarose e glicose em misturas empregando enzimas imobilizadas. Posicionando colunas de invertase/mutarotase (I) e mutarotase/glicose oxidase (II) em série detectaram amperometricamente peróxido de hidrogênio produzido. Em amostras que possuíam ambos os componentes, a determinação sequencial de sacarose e glicose (10^{-4} a 10^{-2}

mol/l) era realizada intercalando as colunas: numa posição a amostra passava através das colunas (I) e (II), e na outra posição, passava somente através do segundo reator.

Matsumoto et alii (1988) propuseram a determinação simultânea de glicose, frutose e sacarose em alimentos (especialmente frutas) empregando enzimas imobilizadas. A configuração paralela dos reatores enzimáticos com detector multicanal facilitava as medidas: o peróxido de hidrogênio (glicose e sacarose) e hexacianoferrato (II) (frutose) produzidos eram monitorados amperometricamente com intervalos lineares entre 0,1 - 0,5, 0,1 - 10,0 e 0,1 - 1,0 mmol/l para glicose, frutose e sacarose respectivamente. Resultados concordantes com literatura foram reportados.

Appelqvist e Hansen (1990) propuseram a determinação automatizada de glicose em processo de fermentação utilizando sensores enzimáticos baseados nos eletrodos quimicamente modificados. Preparação dos biossensores e seus desempenhos em aplicações práticas, assim como estabilidade do eletrodo enzimático, operando em sistemas FIA, foram reportadas.

Imobilizando glicose oxidase na superfície do eletrodo pela formação de amidas ou aminas secundárias, Schuhmann e Kittsteiner-Eberle (1991) propuseram a determinação de sacarose. Filmes de polipirrol foram depositados nos eletrodos de platina ou disco de carbono-vítreo (1 ou 3 mm

diâmetro) pela eletropolimerização do monômero. Os filmes foram tratados e os grupos nitro foram reduzidos eletroquimicamente a grupos amino, e os eletrodos operados 600 mV (vs Hg₂Cl₂). Tempo de resposta, por volta de 10 s, e intervalo linear de 0,05 - 10 mmol/l em glicose foram reportados.

Também trabalhando com imobilização de glicose oxidase pela eletropolimerização de filme de polipirrol na superfície de eletrodo de platina, Trojanowicz e colaboradores (1990) propuseram a determinação de glicose. Segundo os autores, o tempo de vida do sensor eletroquímico biocatalítico foi dependente do método de imobilização empregado; após 5 dias, o sinal analítico apresentou uma redução da ordem de 20% em relação ao valor inicial. A perda de atividade foi atribuída a interação dos produtos de reação do eletrodo com a enzima no filme de polipirrol, resultando na desnaturação da enzima. Intervalo linear entre 5 e 100 mmol/l em glicose foi reportado.

Para finalizar, apresenta-se a proposta de Chi e Dong (1993) o qual apresentam a determinação amperométrica de glicose em um sensor de glicose baseado na codeposição eletroquímica de paládio e glicose oxidase em um eletrodo de carbono vítreo. Após a deposição do Pd, houve um incremento da área superficial do eletrodo com aumento da eficiência de imobilização de glicose oxidase. Limite de detecção (1×10^{-7} mol/l) e intervalo linear (0,001-8 mmol/l) em glicose foram apresentados.

1. METODOLOGIA

1.1. Experimentos preliminares

Os estudos iniciaram-se pela avaliação do desempenho da célula amperométrica (Fig. 18).

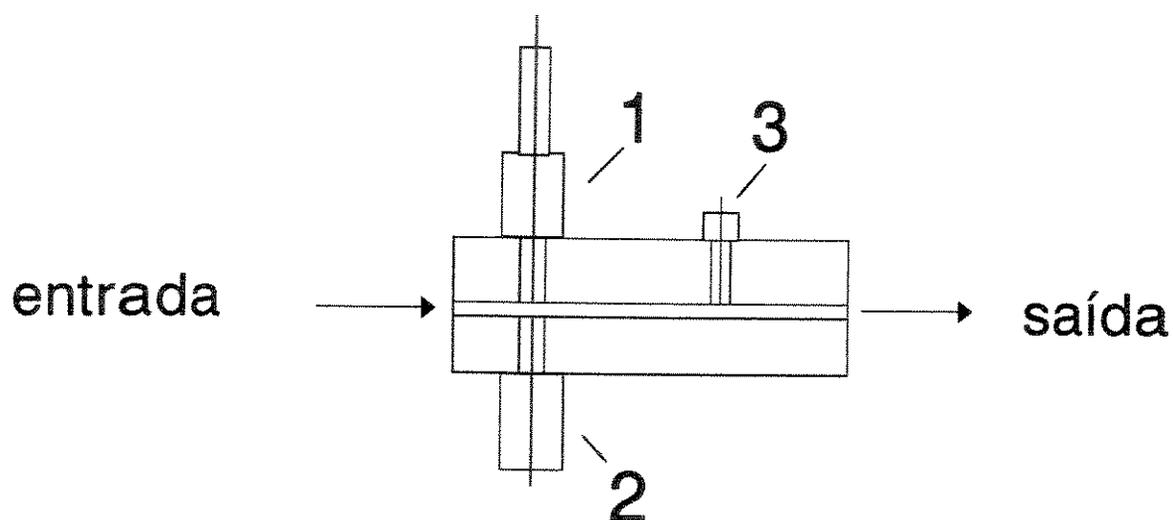


Fig. 18. Representação da célula amperométrica. 1 - sistema do eletrodo de referência Ag/AgCl; 2 - eletrodo indicador de Pt (microeletrodo) ; 3 - eletrodo auxiliar de Pt (disco). A célula amperométrica foi confeccionada em acrílico e as soldas dos eletrodos foi realizada em níquel/cromo.

1.1.1. Definição do sistema FIA

Após alguns testes iniciais (projeto da célula, fixação dos eletrodos de referência, indicador e auxiliar, etc.) foi definido um sistema de análise por injeção em fluxo (Fig. 19) para continuação dos testes envolvidos com a célula amperométrica e finalmente do estudo das principais variáveis associadas na oxidação de glicose pela glicose oxidase.



A formação de peróxido de hidrogênio pode ser monitorada com um precursor cromogênico (oxidação do luminol pelo peróxido de hidrogênio) em presença de peroxidase, incluindo um tempo inicial de incubação antes que as medidas possam ser realizadas (Guilbault, 1984). A alternativa utilizada consistiu na oxidação anódica da H_2O_2 :



Assim, a espécie peróxido de hidrogênio formada da reação de oxidação de $\beta\text{-D-glicose}$, foi amperometricamente monitorada a 650 mV vs. Ag/AgCl. Com relação à imobilização de glicose oxidase, o procedimento foi similar àquele empregado para glicerol dehidrogenase (ítem 1.1.1./cap. 3).

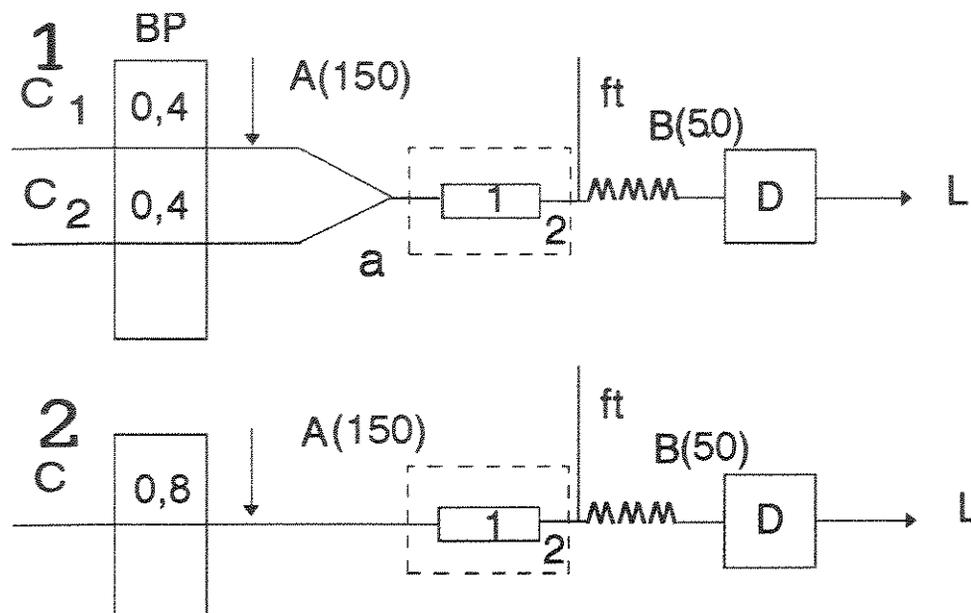


Fig. 19. Diagrama de fluxos do sistema FIA empregado para estudo das principais variáveis associadas à oxidação de glicose (1) e determinação de glicose e sacarose (2). C₁ - solução-tampão; C₂ - solução em KCl; C - solução carregadora (reagente combinado); 1 - reator enzimático (glicose oxidase); 2 - banho termostatizado; BP - bomba peristáltica com vazões em ml/min; A - amostra com especificação do volume injetado em µl; ft - fio-terra do sistema; D - detector (célula amperométrica - Fig. 18); L - lixo; a - ponto de confluência.

1.1.2. Simulação com peróxido de hidrogênio

Antes da utilização da enzima glicose oxidase, e condução dos testes relativos à verificação dos principais parâmetros envolvidos na reação enzimática, foram conduzidos alguns experimentos para dar continuidade ao processo de avaliação da célula amperométrica; para isso, e empregando-se o sistema FIA da Fig. 19.1, foram injetadas soluções-padrão em peróxido de hidrogênio.

Considerando-se que trata-se de uma metodologia fundamentada em reação enzimática, solução-tampão 10^{-2} M em $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ foi empregada como solução carregadora; e para ajuste da força iônica foi empregada solução $5 \cdot 10^{-2}$ M em KCl.

Finalmente, realizaram-se testes para verificar o efeito do potencial aplicado no eletrodo indicador, variando-se este valor entre 500 - 700 mV. Em cada condição de potencial, curva analítica (1 a 5 mM) em peróxido de hidrogênio foi obtida.

1.2. Imobilização de glicose oxidase

1.2.1. Avaliação do reator enzimático

Após verificação do desempenho do sistema amperométrico, com definição da melhor disposição dos eletrodos, e inclusive o potencial mais conveniente a ser aplicado ao eletrodo indicador, iniciaram-se testes visando estudo da influência da temperatura na reação enzimática. A seguir, verificou-se a influência do volume injetado, vazão e comprimento do reator enzimático, e finalmente a concentração e constituição dos reativos e pH.

1.2.1.1. Influência da temperatura

Com o emprego do reator enzimático inserido em banho termostático, e utilizando-se o sistema FIA da Fig. 19.1, verificou-se o efeito da variação temperatura na reação enzimática. Para isto, variou-se este valor no intervalo de 25 a 40° C.

1.2.1.2. Efeito do volume injetado, vazão, comprimento do reator enzimático e bobina

Assim como no caso anterior, estas variáveis foram definidas como parâmetros associados ao sistema FIA.

Para realização deste experimento, a temperatura na reação enzimática foi fixada como 30° C e as demais variáveis mantidas como

indicado no sistema da figura anterior.

A influência do volume injetado (50 a 200 μ l), vazão (0,2 a 1,2 ml/min), comprimento do reator enzimático (1 a 3 cm) e bobina de homogeneização (50 a 400 cm) foram sistematicamente verificadas.

1.2.1.3. Influência do pH e da força iônica

A influência do pH foi verificada variando-se este valor no intervalo de 5 a 11. Soluções-tampão em acetato, fosfato e pirofosfato foram utilizadas. Soluções em KCl (0,0 a 1,0 M) foram empregadas para verificação do efeito do ajuste da força iônica.

1.2.1.4. Verificação de espécies interferentes

As espécies interferentes foram selecionadas, em função da presença destas em amostras de caldo de cana-de-açúcar. Experimentos paralelos, incluíram os ácidos orgânicos (acético e succínico) além do glicerol na tentativa de numa segunda fase, poder ser proposta a determinação de açúcares redutores totais e glicerol em produtos de fermentação etanólica.

1.3. Determinação de glicose e sacarose

A determinação de glicose e sacarose (após hidrólise ácida, conforme Zago et alii, 1989), foi realizada empregando-se o sistema da Fig. 19.2, com solução carregadora constituindo-se de solução-tampão pH 6,8 (0,05 mol/l) + 0,05 mol/l em KCl. Saliente-se que a hidrólise ácida da sacarose também poderia ser realizada no próprio sistema FIA, conforme anteriormente publicado (Mattos et alii, 1988).

2. RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.1. Avaliação do reator enzimático

A célula amperométrica projetada, em dimensões reduzidas, com eletrodo indicador e auxiliar consistindo-se de microeletrodo e anel de platina, e o eletrodo de referência (Ag/AgCl) com uma ponteira porosa, para contato iônico, permitiu uma maior versatilidade e robustez ao sistema detector (Fig. 18).

Fixando-se o potencial em 650 mV vs Ag/AgCl, notou-se após injeções sucessivas de solução-padrão 2 mmol/l em peróxido de hidrogênio, tempo de resposta extremamente rápido, associado à sinais analíticos reprodutíveis (d.p.r. < 3%).

O efeito do potencial aplicado ao eletrodo indicador está representado na Fig. 20, e demonstra boa correlação entre corrente (mA) e concentração (mmol/l) nos diversos valores de potencial aplicado. Nota-se que para maiores valores de potencial, há um incremento significativo em sinal analítico registrado. Entretanto, estes potenciais são muito vulneráveis a interferências (ácidos ascórbico e úrico, cisteína, etc) e normalmente devem ser empregados mediadores na superfície dos eletrodos para diminuir o potencial aplicado no mesmo (ex.: derivado de ferroceno - FeCp_2R^+ sobre

eletrodo de grafite, etc.). Neste trabalho, mesmo considerando-se perda em sinal analítico (Fig. 20), o valor de potencial de 650 mV foi selecionado para condução dos experimentos.

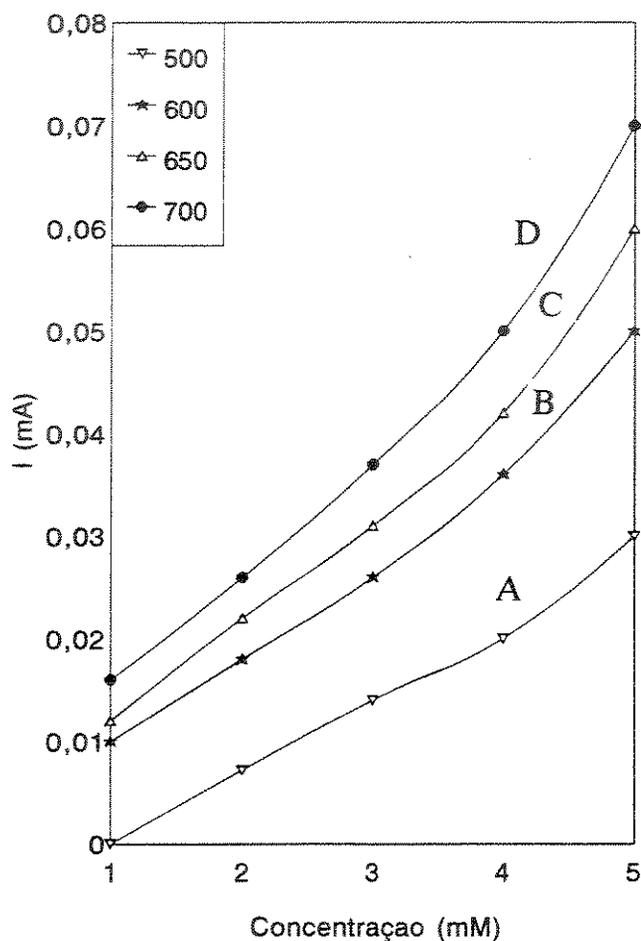


Fig. 20. Efeito do potencial aplicado ao eletrodo indicador. Experimento realizado empregando-se o sistema da Fig. 19.1 (sem reator enzimático), com soluções-padrão entre 1 e 5 mmol/l em H_2O_2 sendo injetadas como amostras ($150\mu l$); C_1 (0,4 ml/min) como solução-tampão (pH 6,8); C_2 (0,4 ml/min) como solução em KCl. Valores de potencial em mV - (A) 500, (B) 600, (C) 650 e (D) 700.

Saliente-se que a presença de coluna similar à enzimática, simulando pressão interna no sistema FIA, não trouxe inconvenientes. De fato, após 4 horas de funcionamento contínuo, pequenas oscilações na linha de base (ao redor de 4%) foram observadas. Destaca-se que em função de imobilização enzimática eficiente, os reatores enzimáticos empregados apresentaram dimensões bastante reduzidas (15-mm x 2-mm).

Para sistemas mais complexos, com vários reatores enzimáticos (p.e. invertase - para hidrólise da sacarose em linha, e mutarotase - para conversão total de α -D-glicose em β -D-glicose), são sempre requeridas a utilização de injetores compatíveis à maiores pressões (comuns em cromatografia líquida).

2.1.1. Influência da temperatura

Aumentando-se o valor de temperatura, foi verificado aumento no sinal analítico. Entretanto, acima de 35° C, foi verificada diminuição neste sinal, devido provavelmente a desnaturação do biocatalisador. Apesar do aumento observado, realizaram-se os experimentos posteriores sem utilização de banho termostático, pois considerou-se as altas concentrações das espécies a serem determinadas (da ordem de 0,5 a 15%) além de tornar a proposta mais simples e versátil.

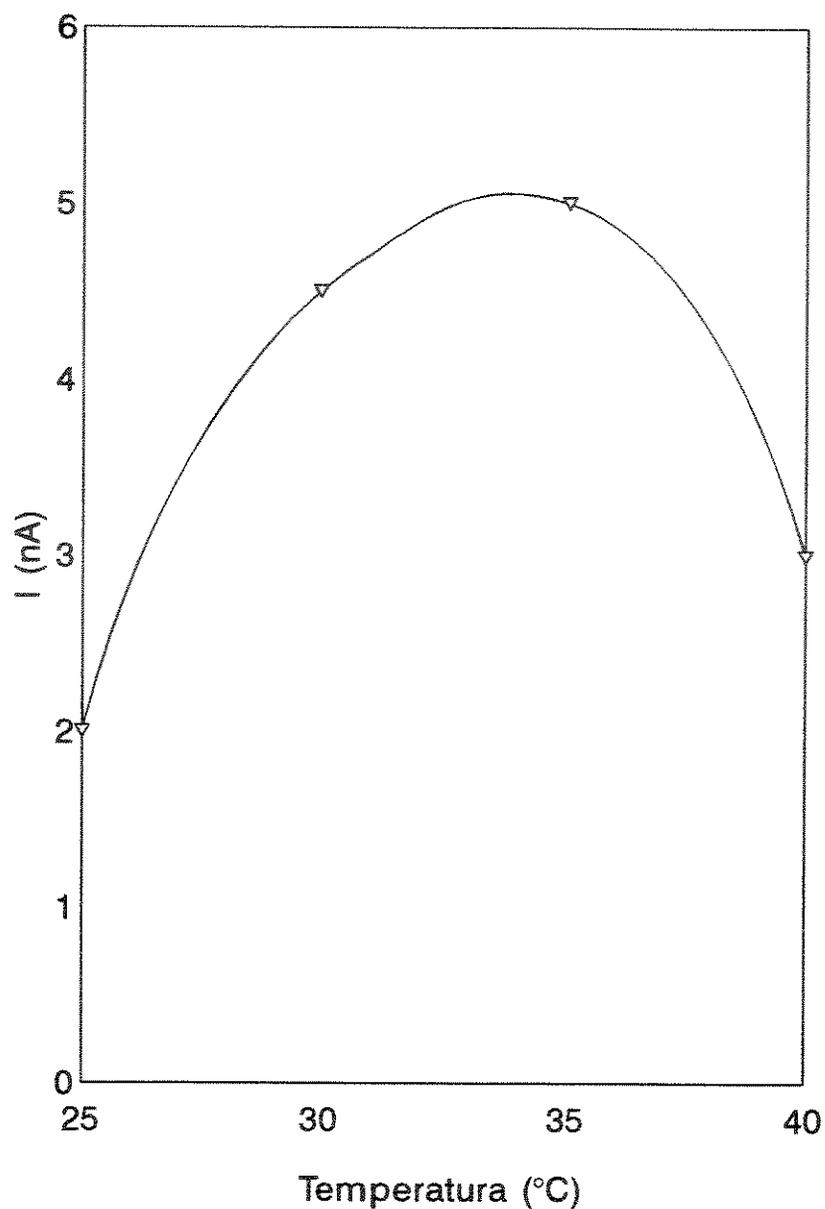


Fig. 21. Influência da temperatura na reação de glicose oxidase. A figura se refere ao sistema da Fig. 19.1, com solução-padrão 2×10^{-4} mol/l em glicose sendo injetada como amostra ($150 \mu\text{l}$); C_1 (0,4 ml/min) como solução-tampão (pH 6,8); C_2 (0,4 ml/min) como solução em KCl; comprimento do reator enzimático = 1,5 cm.

2.1.2. Efeito do volume injetado, vazão, comprimento do reator enzimático e bobina

Aumentando-se o volume injetado de 50 a 100 μ l, notou-se um incremento em sinal analítico da ordem de 100%. A partir deste valor até 250 μ l, não observou-se aumento significativo, demonstrando saturação do biocatalisador. Assim, este valor foi fixado como 150 μ l como um compromisso entre sensibilidade e precisão, desde que um volume menor a 100 μ l resultou em desvio-padrão relativo maior do que 5% nos sinais analíticos registrados, em comparação a 2,5% relativo a 150 μ l.

A sensibilidade foi muito dependente da velocidade de rotação da bomba peristáltica, a qual foi proporcional ao tempo médio de residência. Uma diminuição na vazão representou aumento na magnitude do sinal registrado. O incremento do tempo médio em residência, contribuiu para um pequeno aumento no sinal analítico registrado; entretanto, foi observado expressivo aumento em termos de área; também, notou-se aumento na oscilação do sinal oriundo da bomba peristáltica ($0,4 < q < 0,2$).

Para vazões menores que 0,6 ml/min, notou-se maior tempo para promover a reação de oxidação de β -D-glicose a peróxido de hidrogênio e ácido glicônico. Entretanto, a velocidade analítica é um parâmetro de grande importância em análise de rotina; e, neste situação de alta sensibilidade,

tinha-se o inconveniente de baixa frequência analítica. Desta forma, o valor da vazão para o sistema FIA da Fig. 19, foi selecionado (0,8 ml/min) como um compromisso entre sensibilidade e velocidade analítica.

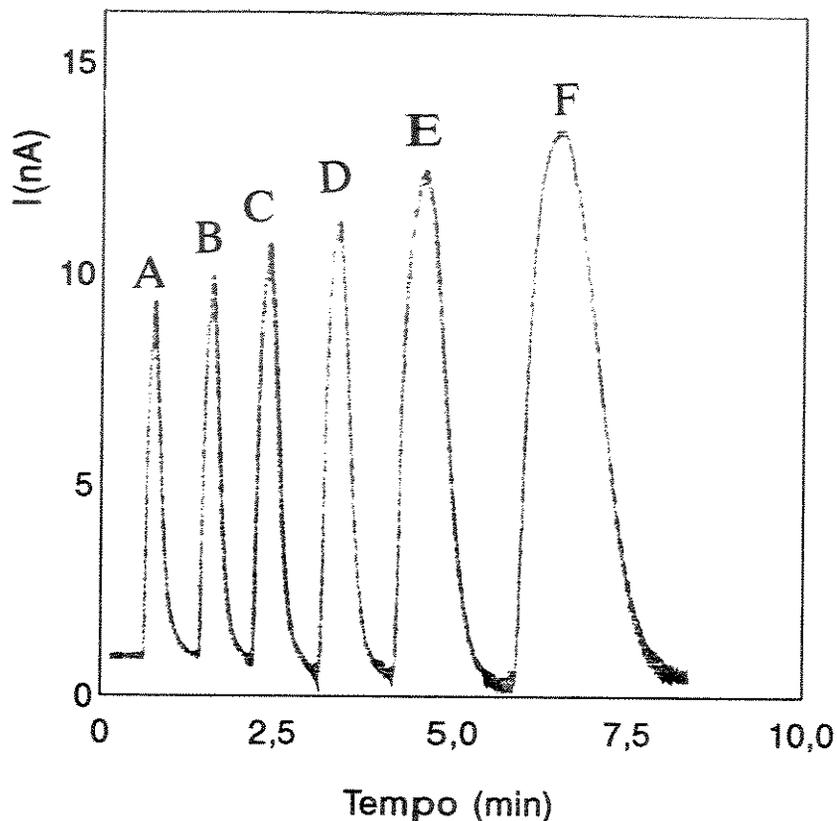


Fig. 22. Influência da velocidade de rotação da bomba peristáltica. A figura se refere ao sistema da Fig. 19.1, com solução-padrão 3×10^{-4} mol/l em glicose sendo injetada como amostra ($150 \mu\text{l}$); C_1 como solução-tampão (pH 6,8); C_2 como solução em KCl; comprimento do reator enzimático = 1,5 cm. A, B, C, D, E, F correspondem a 1,2; 1,0; 0,8; 0,6; 0,4 e 0,2 ml/min (150, 125, 100, 75, 50 e 25%).

2.1.3. Influência do pH

A oxidação de β -D-glicose na presença de glicose oxidase demonstrou ser extremamente dependente do pH. Para valor de pH = 6,8 foi notada alta sensibilidade. Valor maior do que este valor, demonstrou perda considerável no sinal analítico. Ainda, para valor de pH = 8,5, por exemplo, notou-se grande instabilidade dos sinais analíticos registrados. Após sucessivas injeções de solução 6×10^{-4} mol/l em glicose, desvio-padrão relativo maior do que 6% foi observado. Assim, solução-tampão em fosfato (pH 6,8) foi empregado na condução dos experimentos.

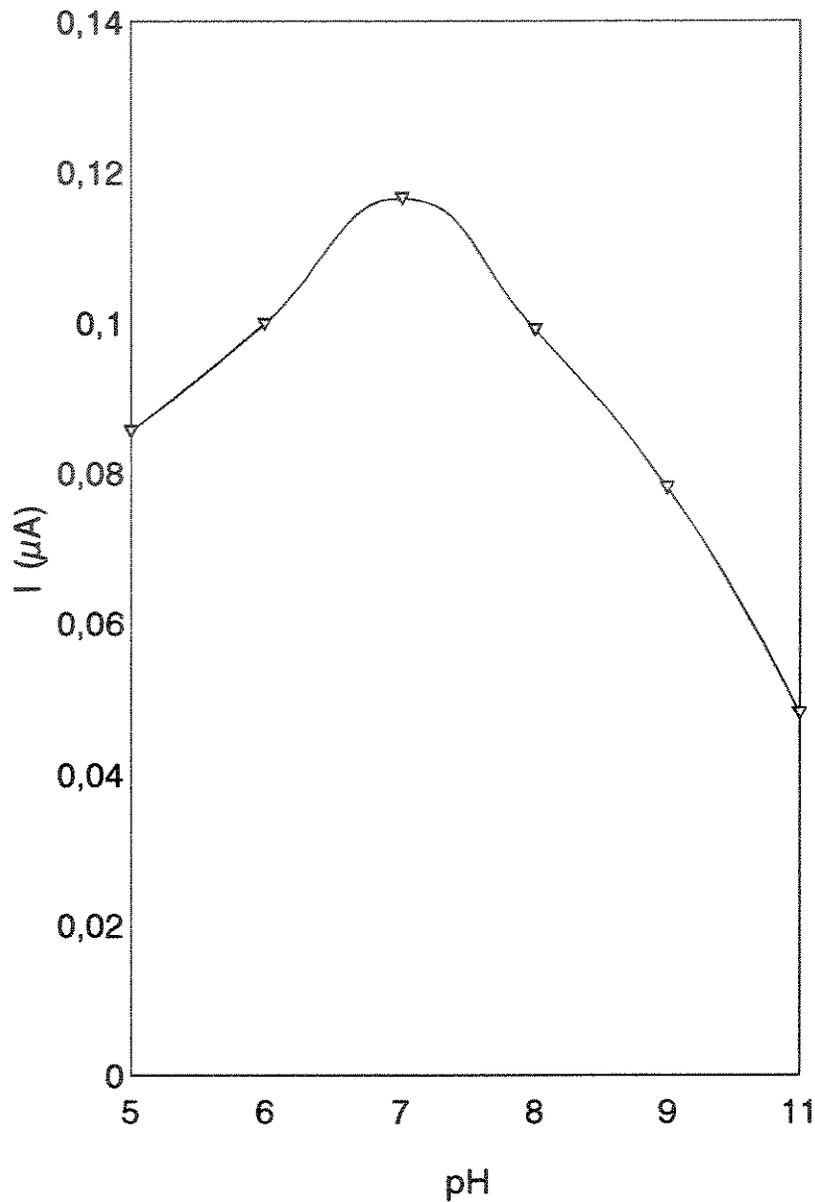


Fig. 23. Influência do pH na reação de glicose oxidase. A figura se refere ao sistema da Fig. 19.1; C₁ como solução-tampão (pH 6,8); C₂ como solução em KCl; comprimento do reator enzimático = 1,5 cm.

Solução 5×10^{-2} mol/l em KCl demonstrou ser satisfatória a manutenção da força iônica. Maiores concentrações não representaram melhoria em sinal analítico e tempo de resposta.

2.1.4. Verificação de espécies interferentes

Considerando-se a composição média do caldo de cana-de-açúcar (Delgado, 1975; Rodella, 1979), nota-se que o único interferente em potencial é a frutose, e esta espécie foi tolerada até a razão de 2000:1 (interferente:analito).

Com relação aos testes paralelos, pode-se afirmar que existe uma grande possibilidade da monitorização de açúcares redutores totais em fermentação etanólica. Glicerol e os ácidos orgânicos (acético e succínico) foram tolerados até a razão de 100 e 50:1 (interferente:analito) respectivamente.

2.2. Determinação de glicose e sacarose

Empregando-se os valores ótimos das variáveis estudadas (Tab. 10), uma série de 5 soluções-padrão com concentrações entre $2 - 6 \times 10^{-4}$ mol/l em glicose e $9,4 - 1,5 \times 10^{-2}$ mol/l em sacarose foram injetadas em duplicata

no sistema FIA da Fig. 19.2. Tabela 11 resume as características do método (equação, coeficiente de regressão, intervalo linear e desvio-padrão relativo). Os intervalos lineares foram apropriados às determinações das espécies em amostras de caldo de cana-de-açúcar.

O sistema da Fig. 19.2, é muito estável e adequado para determinação de glicose em caldo de cana-de-açúcar e similares (Fig. 24). Após definição dos principais parâmetros envolvidos na determinação amperométrica de glicose, o sistema FIA da Fig. 19.2 foi empregado para determinação de sacarose após hidrólise ácida, baseando-se na quantificação de β -D-glicose em presença de glicose oxidase.

Tab. 10. Otimização das variáveis. Valores obtidos empregando-se o sistema da Fig. 19.1.

Tipo	Variável	Intervalo	Valor ótimo
Física	temperatura, °C	25 - 40	30
FIA	vazão, ml/min	0,2 - 1,2	0,8
	reator, cm	1 - 3	1,5
	bobina, cm	50 - 400	50
Química	volume, μ l	50 - 200	150
	[C], mol/l		0,05
	pH	5 - 11	6,8
	[KCl], mol/l	0,01 - 0,5	0,05

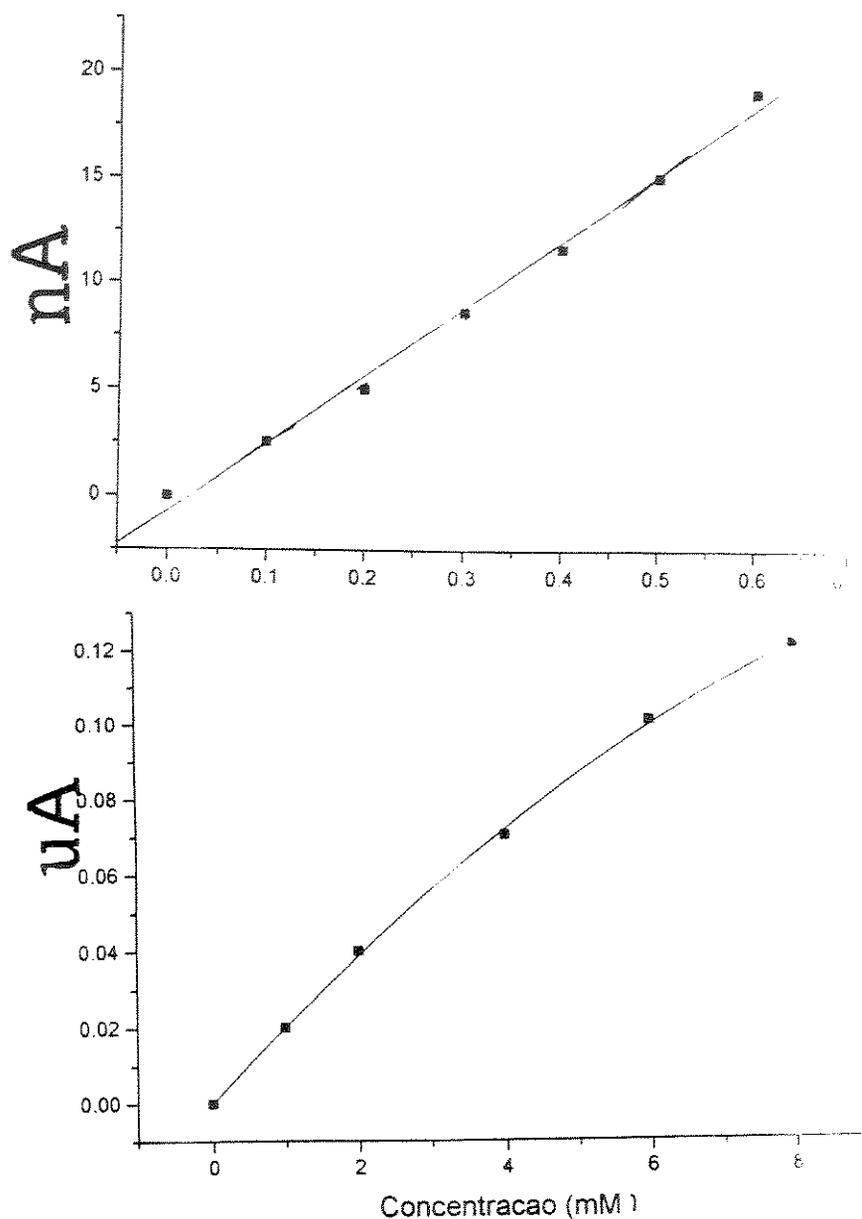


Fig. 24. Curva analítica para determinação amperométrica de glicose (A) e sacarose (B). As figuras se referem ao sistema da Fig. 19.2. C (0,8 ml/min) solução carregadora (solução-tampão fosfato 0,05 mol/l + KCl 0,05 mol/l, pH 6,8); comprimento do reator enzimático = 1,5 cm; temperatura 25° C.

Tab. 11. Características analíticas do método proposto. Experimento realizado com sistema FIA da Fig. 19.2.

Equação	r	Intervalo linear (mM)	d.p.r.(%)
$- 0,68 + 31,6[\text{glicose}]$	0,9992	0,0 - 0,6	1,2
$0,0002 + 0,02[\text{sac}] - 0,0007[\text{sac}]^2$	0,9998	0,0 - 8,0	1,5

A precisão foi calculada ($N = 11$), empregando-se solução-padrão de 0,4 mmol/l em glicose e 7,5 mmol/l em sacarose. Nesta condição, tanto para glicose quanto para sacarose foi verificada frequência de 50 amostras por hora.

Tab. 12. Comparação dos resultados. Concentração (%) de glicose e sacarose em caldo de cana-de-açúcar pelo sistema FIA da Fig. 19.2 e pelo método cromatográfico (DIONEX). Desvio-padrão relativos ao sistema FIA e DIONEX por volta de 1%.

Amostras	Glicose		Sacarose	
	FIA	DIONEX	FIA	DIONEX
1	0,86	0,85	16,9	17,2
2	0,42	0,45	17,0	17,4
3	0,71	0,69	16,9	16,9
4	0,82	0,80	16,8	17,0
5	0,53	0,55	17,2	16,9
6	0,63	0,65	16,9	16,8
7	0,38	0,35	17,7	17,8
8	0,61	0,57	16,8	16,7

A comparação entre os métodos mostra as seguintes correlações, $r = 0,9888$ com função $FIA = -0,004 + 1,01[DIONEX]$ (para glicose); $r = 0,8978$ com função $FIA = 6,12 + 0,64[DIONEX]$ (para sacarose), demonstrando a potencialidade de uma proposta alternativa para análises de rotina em indústrias sucro-alcooleiras.

CAPÍTULO 5

CONCLUSÃO GERAL

O presente trabalho demonstrou a viabilidade das incorporações dos eletrodos íon-seletivos e enzimas imobilizadas com os sistemas FIA, assim como da facilidade de operação e estabilidade, já que os métodos propostos não demonstraram variação da linha base após algumas horas de trabalho. Desta forma, estas metodologias podem ser empregadas em análise em larga escala, para determinação de glicerol, glicose e sacarose em amostras de interesse industrial, assim como outros tipos de matrizes. A utilização dos eletrodos tubulares, e o emprego dos reatores enzimáticos, em função de suas performances, demonstraram potencialidade para monitorização de processos industriais.

A determinação de glicerol baseada na reação de periodato, demonstrou-se extremamente satisfatória, pois além das características analíticas favoráveis desta reação, notou-se alto rendimento do eletrodo proposto (tempo de resposta, estabilidade, limite nernstiano e de detecção, etc.).

A estabilidade demonstrada pelos reatores enzimáticos, associada a alta seletividade, corroboram a potencialidade de métodos baseados em reações enzimáticas para monitoramento de processos. Detectores

espectrofluorimétricos ou amperométricos, também forneceram excelentes resultados, demonstrando que metodologias baseadas em reações enzimáticas permitem as mais diversas formas de detecção.

Com relação a precisão dos métodos, obtiveram-se estimativas a desvios-padrão relativos menores do que 1,5%. As exatidões para determinações de glicerol (sabões/lixívias), glicerol (vinhos) e glicose/sacarose (caldo de cana-de-açúcar) foram comprovadas por métodos convencionais.

O eletrodo tubular mostrou-se atraente pela simplicidade e resultados fornecidos, e deverá ser testado em outros tipos de análises. Como perspectiva futura, a análise de sacarose, glicose e frutose em misturas deverá ser realizada, prevendo-se a grande estabilidade dessa determinação na indústria sucro-alcooleira.

As determinações enzimáticas simultâneas podem ser realizadas, após verificação dos resultados apresentados pelas enzimas individualmente. Nestes casos, devem ser empregados os injetores usualmente utilizados em cromatografia líquida de alta eficiência, pois os injetores proporcionais frequentemente utilizados em sistemas FIA não foram projetados para suportar pressões elevadas. Como perspectiva futura, deverá ser realizada a monitorização de açúcares redutores totais, além do glicerol, em processos fermentativos, especialmente na fermentação etanólica.

As propostas simples em concepção e aplicação, associadas a

microcomputadores, incrementarão realizações e, sem dúvida, aumentarão a capacidade disponível em laboratórios de controle industrial.

CAPÍTULO 6

PARTE EXPERIMENTAL

1. MATERIAL

1.1. Instrumentos e Acessórios

As medidas potenciométricas foram feitas empregando-se um potenciômetro Micronal modelo B352 conectado a um registrador Radiometer modelo REC 61. Os eletrodos componentes foram:

a) eletrodo de trabalho - eletrodo seletivo a periodato preparado como apresentado no item 1.1. - cap. 2;

b) eletrodo de referência - eletrodo de Ag/AgCl, dupla junção, Radelkis.

As medidas fluorimétricas foram feitas empregando-se um espectrofluorímetro Kontron modelo SFM 25 equipado com uma célula de fluxo (Hellma 178.12 QS, $18\mu\text{l}$) conectado a um registrador Radiometer modelo REC 80.

As medidas amperométricas foram feitas empregando-se um potenciostato/galvanostato da EG&G Princeton Applied Research modelo 273A interfaciado com microcomputador digital DEC_{pc} SXLP. Os eletrodos componentes da célula amperométrica foram os seguintes:

- a) eletrodo de trabalho - microeletrodo de platina (0,5-mm diâmetro);
- b) eletrodo de referência - eletrodo de Ag/AgCl, dupla junção da Radelkis.
- c) eletrodo auxiliar - eletrodo de platina (4-mm diâmetro).

Os demais instrumentos e acessórios apresentados foram de uso comum:

- a) Injetor comutador automático Micronal modelo B292;
- b) Bomba peristáltica Ismatec modelo mp 13 GJ4, provida de tubos de "tygon" de diferentes diâmetro internos;
- c) Tubos de polietileno (ou "teflon") com diâmetro interno de 0,8-mm para a construção dos reatores, das linhas de transmissão e das alças de amostragem; saliente-se que não foram verificadas diferenças quanto da utilização dos tubos de polietileno ou "teflon".
- d) Balança analítica Mettler modelo PC 180;
- e) Banho termostatizado Fanem modelo 147;
- f) Vidraria de uso rotineiro em laboratórios de Química Analítica.

1.2. Reagentes

Os reagentes foram de grau analítico e a água era destilada-deionizada.

Para a preparação dos eletrodos foram empregados - resina epoxi a base de bisfenol (araldite, Ciba Geigy S.A.), grafite (granulometria 50μ , Merck), endurecedor HR (contém álcool isophoronediamina, Ciba-Geigy, S.A.); brometo de tetraoctilamônio, dibutilftalato, 2-nitrofeniloctiléter, clorofórmio; cloreto de polivinila (PVC); tetrahidrofurano.

Para imobilização enzimática, foram empregados - vidro de porosidade controlada (VPC 237Å; "mesh" 120/200; BDH Chemicals Ltda); 3-aminopropil-trietoxisilano; glutaraldeído; enzimas (glycerol dehidrogenase; EC 1.1.1.6., 250 U/ml; glucose oxidase; EC 1.1.1. ., 500 U/ml); cofator (β -NAD, nicotinamida adenina dinucleotídeo, Sigma).

Demais reagentes de uso rotineiro em laboratórios, tais como: ácido clorídrico, acético, nítrico, sulfúrico, hidróxido de sódio, hidróxido de potássio, acetato de amônio, tartarato duplo de sódio e potássio, fosfato di-básico de sódio, etc., foram também empregados.

1.3. Soluções

Todas as soluções foram preparadas com água destilada-deionizada e acondicionadas em frascos de vidro âmbar ou polietileno, conforme o caso.

a) as soluções-padrão de trabalho (10^{-6} a 10^{-1} mol/l) em periodato

foram preparadas a partir de solução estoque de periodato de sódio a 1 mol/l;

b) as soluções-padrão de trabalho (1000 a 5000 mg/l) em glicerol foram preparadas a partir de solução estoque de glicerol (10,0 g/l);

c) as soluções-padrão de trabalho (1 a 10 mg/l) em glicerol foram preparadas a partir de solução estoque de glicerol (100 mg/l);

d) as soluções-padrão de trabalho (0,2 a 0,6 mmol/l) em β -glicose foram preparadas a partir de solução estoque de β -glicose (1×10^{-2} mol/l);

e) as soluções-padrão de trabalho (2,0 a 8,0 mmol/l) em sacarose foram preparadas a partir de solução estoque de sacarose (1×10^{-1} mol/l);

Para estudo de interferência de íons metálicos (Tab. 5) foram utilizadas soluções estoque 10^{-1} mol/l dos respectivos sais.

Para estudo de interferência de glicose, frutose, glicerol, etanol e ácidos orgânicos (acético e succínico) foram empregadas soluções estoque destas espécies (1 a 20% m/v).

1.4. Amostras

Amostras de sabões e lixívia eram procedentes da Indústria Gessy-Lever (Valinhos, S.P.) e foram coletadas em frascos de 250 ml; antes de serem diluídas, estas soluções foram aquecidas (50 a 60° C) até

clarificação. Posteriormente, estas soluções foram diluídas (100 g para 500 ml de água destilada) e injetadas no sistema FIA. Quando necessário, outras diluições foram realizadas.

As amostras de vinho de mesa não sofreram diluição prévia, foram injetadas "in natura" no sistema FIA.

Amostras de caldo de cana-de-açúcar procedentes da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" da Universidade de São Paulo (Piracicaba, S.P.) foram diluídas 1000 vezes (5 ml do caldo em 100ml de água destilada; e 2 ml desta solução para 100 ml de água destilada). Para determinação de sacarose, realizou-se hidrólise ácida antes das diluições (HCl 0,75 mol/l a 35° C durante 30 minutos, após este tempo, neutralização com NaOH) conforme Zago et alii, 1989.

As amostras utilizadas para aferição do trabalho proposto foram analisadas por titulação iodométrica (glicerol/sabões) conforme Gessy-Lever, Valinhos, S.P.; cromatografia líquida de alta eficiência (glicerol/vinhos) conforme Cets Institut Químic de Sarrià, Barcelona; cromatografia/dionex (glicose e sacarose/caldo de cana-de-açúcar) conforme Departamento de Química da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz".

CAPÍTULO 7
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

A.O.C.S. Tentative Method Da 23-56 Replacing Da 23-48 Amended 1959.
Iodometric-Periodic Acid Method.

Appelqvist, R.; Hansen, E.H. *Anal. Chim. Acta*, 235(1990) 265

Barbour, R.F.; Devine, J. *Analyst*, 96(1971) 288

Bartlett, P.N.; Whitaker, R.G. *J. Electroanal. Chem.*, 224(1987) 27

Bartlett, P.N.; Whitaker, R.G. *J. Electroanal. Chem.*, 224(1987) 37

Berset, C. Enzimas Imobilizadas. In: Scriban, R. (ed.) *Biotecnologia*. 1ª ed.
São Paulo, Ed. Manole Ltda. 1984. 489 p.

Bassett, J.; Denney, R.C.; Jeffery, G.H.; Mendham, J. *Análise Inorgânica Quantitativa*. 4º ed. Rio de Janeiro, Ed. Guanabara, Rio de Janeiro. 1978
690 p.

Bobbitt, J.M. *Adv. Carbohydr. Chem.*, 11(1956)1

Cammann, K. *Fresenius Z. Anal. Chem.*, 329(1988) 691

Clark. L.C.; Lyons, C. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 102(1962) 29

Clarke, J.R.P. *Anal. Chim. Acta*, 238(1990) 3

Chi, Q.; Dong, S. *Anal. Chim. Acta*, 278(1993) 17

Chibata, I. *Immobilized enzymes. Research and Development*. New York. John Wiley & Sons 1978.

Cosofret, V.V. *Ion Selective Electrode Rev.*, 2(1980) 159

Cosofret, V.V. *Membrane electrodes in drug-substances analysis*, Oxford Pergamon Press 1982.

Delanoe, D.; Maillard, C.; Maisondieu, D. *Le vin - De l'analyse à l'elaboration*. Paris, Technique et Documentation (Lavoisier). 1987. 224p.

De Winter, M.; Grietens, D.; Rijckaert, M. *Trends Anal. Chem.*, 9(1990) 54

Dong, S.; Kuwana, T. *Electroanalysis*, 3(1991) 485

Eggstein, M.; Kuhlmann, E. Triglyceride und Glycerin. In: Bergmeyer, H.U. (ed.) *Methoden der enzymatischen Analyse*. Weinheim, Verlag Chemie 1974. 1871 - 1878.

Elmosalamy, M.A.F.; Moody, G.J.; Thomas, J.D.R.; Hassan, S.S.M. *Anal. Lett.*, 20(10) (1987) 1541

Ferreira, I.M.P.L.O.; Lima, J.L.F.C. *J. Flow Injection Anal.*, 10:1(1993) 17

Foreman, J.K.; Stockwell, P.B. *Automatic Chemical Analysis*. Chichester, Ellis Horwood Limited 1975.

Foulds, N.C.; Lowe, C.R. *Anal. Chem.*, 60(1988) 2473

Foulds, N.C.; Lowe, C.R. *J. Chem. Soc. Faraday Trans.*, 1:82(1986) 1259

Frenzel, W. *Fresenius Z. Anal. Chem.* 329(1988) 698

Gisin, M.; Thommen, C. *Anal. Chim. Acta*, 190(1986) 165

Goldman, R.; Silman, D.H.; Caplan, S.R.; Keden, O.; Katchalski, E. *Science*, 150(1975) 758

Gorton, L.; Csöregi, E.; Dominguez, E.; Emnéus, J.; Jönsson-Pettersson, G.; Marko-Varga, G.; Persson, B. *Anal. Chim. Acta*, 250(1991) 203

Grubhofer, W.; Schleith, L. *Z. Physiol. Chem.*, 297(1954) 108

Guilbault, G.G. *Handbook of enzymatic methods of analysis*. New York, Marcel Dekker Inc. 1984. 709p.

Guilbault, G.G.; Oliveira Neto, G. Immobilised Enzyme Electrodes. In: Woodward, J. (ed.) *Immobilised cells and enzymes a practical approach*. 1^a ed., England, IRL Press Limited 1985. 177p.

Hartofylax, V.H.; Efstathiou, C.E.; Hadjiioannou, T.P. *Microchem. J.*, 33(1986) 9

Hartofylax, V.H.; Efstathiou, C.E.; Hadjiioannou, T.P. *Anal. Chim. Acta*, 224:2(1989) 159

Hassan, S.S.M.; Elsaied, M.M. **Analyst**, 112:4(1987) 545

IUPAC - Analytical Chemistry Division on Analytical Nomenclature. Recommendation for Nomenclature of Ion-selective Electrodes, **Pure Appl. Chem.**, 48(1976) 129

IUPAC - Analytical Chemistry Division on Analytical Nomenclature. Recommendations for Nomenclature of Ion-Selective Electrodes, **Pure Appl. Chem.**, 53(1981) 1907

Jackson, E.L. Periodic acid oxidation. In: Adams, R.; Bachmann, W.E.; Fieser, L.F.; Johnson, J.R.; Snyder, H.R. (ed.) **Organic reactions**. 4^a ed., New York, John Wiley 1947. 241p.

Jain, A.K.; Jahan, M.; Tyagi, V. **Analyst**, 114:9(1989) 1155

Janda, P.; Weber, J. **J. Electroanal. Chem.**, 300(1991) 119

Jansen, E.F.; Olson, A.C. **Arch. Biochem. Biophys.** 129(1969) 221

Kennedy, J.F.; White, C.A. Principles of immobilization of enzymes. In: Wiseman, A. (ed.). **Handbook of Enzyme Biotechnology**. 2^a ed. New York, Ellis Horwood Limited. 1985. 457 p.

Kiba, N.; Goto, K.; Furusawa, M. **Anal. Chim. Acta**, 185(1986) 287

Kudoh, M.; Kataoka, M.; Kambara, T. **Talanta**, 27(1980) 495

Lima, J.L.F.C.; Machado, A.A.S.C. **Rev. Port. Quim.**, 20(1978) 70

Luque de Castro, M.D.; Tena, M.T. *Talanta*, 40:1(1993) 21

Magalhães, J.M.C.S.; Machado, A.A.S.C. *Port. Electrochimica Acta*, 9(1991) 431

Manecke, G.; Gurgel, G.; *Naturwissenschaften*. 54(1967) 647

Marko-Varga, G.; Dominguez, E. *Trends Anal. Chem.*, 10(1991) 290

Mascini, M.; Paleschi, G. *Anal. Chim. Acta*, 145 (1983) 213

Masoom, M.; Townshend, A.; *Anal. Chim. Acta*, 166(1984) 111

Masoom, M.; Townshend, A. *Anal. Chim. Acta*, 171(1985) 185

Mattos, I.L.; Zagatto, E.A.G.; Jacintho, A.O. *Anal. Chim. Acta*, 214 (1988) 247

Matsumoto, K.; Hamada, O.; Ukeda, H.; Osajima, Y. *Anal. Chem.*, 58(1986) 2732

Matsumoto, K.; Kamikado, H.; Matsubara, H.; Osajima, Y. *Anal. Chem.*, 60(1988) 147

Matsukura, R.; Aleixo, L.M.; Godinho, O.E.S.; Oliveira Neto, G. *Anal. Chim. Acta*, 280(1993) 49

Mitz, M.A.; Summaria, L.J. *Nature*, 189(1961) 576

Montenegro, M.C.B.S.M.; Lima, J.L.F.C. Relatório Técnico - Ação Integrada Luso-Brasileira (1993)

Moody, G.J.; Sanghera, G.S.; Thomas, J.D.R. *Analyst*, 111(1986) 605

Morishita, F.; Nishikawa, Y.; Kojima, T. *Anal. Sci.*, 2:5(1986) 411

Mottola, H.A. *Analyst*, 112(1987) 719

Nagy, G.; Von-Storp, L.H.; Guilbault, G.G. *Anal. Chim. Acta*, 66(1973) 443

Nanijo, M.; Guilbault, G.G. *Anal. Chim. Acta*, 73(1974) 367

Narasimhan, K.; Wingard, L.B. *Anal. Chem.*, 58(1986) 2984

Nelson, J.M.; Griffin, E.C. *J. Am. Chem. Soc.*, 38(1916) 1109

Ogbomo, I.; Kittsteiner-Eberle, R.; Englbrecht, U.; Prinzing, U.; Danzer, J.; Schmidt, H.L. *Anal. Chim. Acta*, 249:1(1991) 137

Ozawa, H. *Journal of Biochemistry*, 62(4) (1967) 419

Pan, J.; Hao, F. *Fenxi Huaxue*, 10(1982) 469

Prinzing, U.; Ogbomo, I.; Lehn, C.; Schmidt, H.L. *Sens. Actuators B*, B₁:1-6(1990) 542

Rodella, A.A. **Determinação de açúcares por entalpimetria de injeção direta.** Dissertação de mestrado. Campinas, 1979. 102p..

Ruzicka, J.; Hansen, E.H. Flow injection analysis. Part I. A new concept of fast continuous flow analysis. *Anal. Chim. Acta*, 78(1975) 145

Ruzicka, J.; Hansen, E.H. *Anal. Chim. Acta*, 179(1986)1

Ruzicka, J.; Hansen, E.H. **Flow injection analysis**. 2º ed. New York. Interscience. 1988. 498 p.

Schuhmann, W.; Kittsteiner-Eberle, R. *Biosens. Bioelectron.*, 6(3) (1991) 263

Shinohara, H.; Chiba, T.; Aizawa, M. *Sensors Actuators*, 13(1987) 79

Silva, V.L. **Construção e avaliação de eletrodo enzimático para determinação de uréia utilizando canavalia marítima**. Tese de Doutorado. Campinas, 1991. 133 p.

Stewart, K.K.; Beecher, G.H.; Hare, P.E. *Anal. Biochem.*, 10(1976) 167

Stockwell, P.B. *J. Autom. Chem.*, 12:3(1990) 95

Stulik, K. *Analyst*, 114(1989) 1519

Tena, M.T.; Luque de Castro, M.D. *Ind. Farm.*, 2(1992) 125

Trojanowicz, M.; Matuszewski, W.; Podsiadla, M. **Biosensors & Bioelectronics**, 5 (1990) 149

Trojanowicz, M. **Electrochemical detectors in flow measurements**. Euroanalysis (Paris), 1991

Umana, M.; Waller, J. *Anal. Chem.*, 58(1986) 2979

Updike, S.J.; Hicks, G.P. *Nature*, 214(1967) 986

Valcárcel, M.; Luque de Castro, M.D. **Flow injection analysis - principles and applications**. Chichester. Ellis Horwood Limited. 1987. 400 p.

Vieth, W.R.; Gilbert, S.G.; Wang, S.S; Saini, R. **Brevet 3.758.396** (1973)

Wieland, O. Glycerin, UV-Methode. In: Bergmeyer, H.U. (ed.) **Methoden der enzymatischen Analyse**. Weinheim, Verlag Chemie 1974. 1448 - 1453.

Yao, T. *Anal. Chim. Acta*, 153(1983) 175

Yao, T.; Sato, M.; Kobayashi, Y.; Wasa, T. *Anal. Chim. Acta*, 165(1984) 291

Yokoyama, K.; Tamiya, E.; Karube, I. *Electroanalysis*, 3(1991) 469

Yu, R.Q. *Ion Selective Rev.*, 8(1986)153

Zagatto, E.A.G.; Mattos, I.L.; Jacintho, A.O.; *Anal. Chim. Acta*, 204(1988) 259

Zago, E.; Amorin, H.V.; Basso, L.C.; Gutierrez, L.E.; Oliveira, A.J. **Métodos analíticos para o controle da produção de álcool**. Piracicaba, Fermentec/Cebtec. 1979. 145p.