

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE QUÍMICA

**CONSTRUÇÃO, AVALIAÇÃO E APLICAÇÃO DE BIOSSENSOR PARA
FRUTOSE UTILIZANDO A ENZIMA D-FRUTOSE DEHIDROGENASE**

ALUNO: Carlos Alexandre Borges Garcia

ORIENTADOR: Prof. Dr. Graciliano de Oliveira Neto

Co- ORIENTADOR: Prof. Dr. Lauro Tatsuo Kubota

Tese apresentada à comissão de Pós-
Graduação do Instituto de Química como
parte dos requisitos para a obtenção do
título de Doutor em Ciências

CAMPINAS - SP

Março de 1997



NIDADE	BC
CHAMADA:	T/UNICAMP
G165	
Ex.	
ENVIO DE	31/99
REC.	28/97
C	☐
D	☒
REÇO	R\$ 11,00
ATA	25/07/97
* CPD	

CM-00 099250-E

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE QUÍMICA
UNICAMP**

G165Cc

Garcia, Carlos Alexandre Borges

Construção, avaliação e aplicação de biossensor para frutose utilizando a enzima D-frutose dehidrogenase / Carlos Alexandre Borges Garcia. -- Campinas, [SP: s.n.], 1997.

Orientador: Graciliano de Oliveira Neto.

Co-Orientador: Lauro Tatsuo Kubota.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Química.

1. *Biossensor amperométrico. 2. Eletroquímica.
3. *Sensor amperométrico. I. . Oliveira Neto, Graciliano. II. Kubota, Lauro Tatsuo. III. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Química. IV. Título.

Curriculum Vitae.

IDENTIFICAÇÃO.

1. NOME: **Carlos Alexandre Borges Garcia.**
2. DATA DE NASCIMENTO: 19 de Dezembro de 1967.
3. NATURALIDADE: Nossa Senhora das Dores - SE.
4. NACIONALIDADE: Brasileira.
5. FILIAÇÃO: Gernímio dos Santos Garcia e Aristéa Borges Garcia.
6. ESTADO CIVIL: Casado.
7. CÉDULA DE IDENTIDADE: 785.365 - SSP/SE.
8. CPF: 449.820.545/68.

FORMAÇÃO BÁSICA.

1. Primeiro grau: de 1975 a 1982. Grupo escolar municipal Arnaldo Rolemberg Garcez e Escola de 1º Grau Prof. Fernando Azevedo, Nossa Senhora das Dores - SE.
2. Segundo grau: de 1983 a 1985. Colégio Salesiano Nossa Senhora Auxiliadora e Colégio de Aplicação da Universidade Federal de Sergipe, Aracaju - SE.
3. Curso superior: em química industrial de 1986 a 1989. Universidade Federal de Sergipe - UFS, Aracaju - SE.

Pós-Graduação:

1. **Mestrado** em Química Analítica (Métodos alternativos para a decomposição de amostras na dosagem de cobre em alimentos), iniciado em março de 1990 e concluído em outubro de 1992. Universidade Federal da Bahia - UFBA, Salvador - BA.

TRABALHOS APRESENTADOS EM CONGRESSOS.

1. "Utilização do poli/etileno-co-acetato de vinila/ para construção de eletrodo seletivo.", apresentado na 17ª reunião anual da SBQ, realizada no período de 24 a 27 de maio de 1994, em Caxambu - MG.
2. "Utilização do poli/etileno-co-acetato de vinila/ para construção de eletrodo seletivo. parte II", apresentado na 18ª reunião anual da SBQ, realizada no período de 30 de maio a 02 de junho de 1995, em Caxambu - MG.
3. "Ion implantation into eva polymer and perspective applications in electronic devices" apresentado no XVI CBRAVIC, congresso brasileiro de aplicações de vácuo na indústria e na ciência, realizado no período de 25 à 28 de julho de 1995, na Universidade de Brasília - UnB - Brasília - DF.
4. Implantação iônica em poli/etileno-co-acetato de vinila/ (eva) e sua aplicação na construção de eletrodos íon-seletivos para potássio", apresentado no VII Encontro Nacional de Química Analítica, realizado no período de 03 a 06 de setembro de 1995, em Belo Horizonte - MG.
5. "Construção e avaliação de um biossensor para frutose utilizando a enzima d-frutose dehidrogenase imobilizada em eletrodo de pasta de carbono", apresentado no VII Encontro Nacional de Química Analítica, realizado no período de 03 a 06 de setembro de 1995, em Belo Horizonte - MG.

6. "Otimização das condições para a obtenção do filme de polipirrol utilizando planejamento fatorial", apresentado na 19ª Reunião Anual da SBQ, realizada no período de 27 a 30 de maio de 1996, em Poços de Caldas - MG.
7. "Construção de biossensor amperométrico para salicilato usando salicilato hidroxilase imobilizada em filme de polipirrol", apresentado na 19ª Reunião Anual da SBQ, realizada no período de 27 a 30 de maio de 1996, em Poços de Caldas - MG.
8. "Determinação de ácido acetilsalicílico em comprimidos, utilizando análise por injeção em batelada com detecção potenciométrica", apresentado na 19ª reunião anual da SBQ, realizada no período de 27 a 30 de maio de 1996, em Poços de Caldas - MG.
9. "Construção de um biossensor para frutose utilizando a enzima d-frutose dehidrogenase imobilizada diretamente em filme de polipirrol depositado em eletrodo de platina", apresentado no XXXVI Congresso Brasileiro de Química, realizado no período de 1 a 5 de Setembro de 1996, em São Paulo - SP.
10. "Construção de eletrodo tubular íon-seletivo à potássio com ionóforo nonactina em matrizes poliméricas aplicado a sistema por injeção em fluxo", apresentado no XXXVI Congresso Brasileiro de Química, realizado no período de 1 a 5 de Setembro de 1996, em São Paulo - SP.
11. "Biossensor para frutose utilizando d-frutose dehidrogenase imobilizada em filme de polipirrol", apresentado no X SIBEE Simpósio Brasileiro de Eletroquímica e Eletroanalítica, realizado no período de 27 a 30 de outubro de 1996, em São Carlos - SP.
12. "Determinação potenciométrica de potássio em amostras reais com sistema por injeção em fluxo", apresentado no X SIBEE Simpósio Brasileiro de Eletroquímica e Eletroanalítica, realizado no período de 27 a 30 de outubro de 1996, em São Carlos - SP.

PUBLICAÇÕES EM REVISTAS INTERNACIONAIS.

1. "A new amperometric biosensor for fructose using carbon paste electrode modified with silica gel coated with meldola's blue and fructose 5-dehydrogenase", Carlos A. B. Garcia, Graciliano de Oliveira Neto, Lauro T. Kubota and Luciane A. Grandin; .; *J of Electroanal. Chem.*, 1996, **418**, 147-151.
2. "New anion selective electrodes based on ethylene-co-vinyl-acetate without a plasticizing membrane, responsive to salicylate, nitrate, perchlorate and periodate"; Carlos A. B. Garcia, Graciliano de Oliveira Neto and Fernando Galembeck; *Anal. Chim. Acta*; Aceito para publicação.

.....*Carlos Alexandre Borges Garcia*.....
Carlos Alexandre Borges Garcia.

“Se você construiu castelos no ar, seu trabalho não está necessariamente perdido; ainda é tempo de colocar seus alicerces.”

(Carlos Góes)

Aos Mestres,

“Uns são homens; alguns são professores; poucos são mestres.

Aos primeiros, escuta-se; aos segundos, respeita-se; aos últimos segue-se.

Meu agradecimento sincero aos professores amigos, aos somente professores, àqueles que com seus problemas e dores humanas não foram nem amigos nem professores, mas que passaram por minha vida”

À vocês meu afeto, carinho, respeito e muito obrigado.

DEDICATÓRIA

À Helenice, pelo amor que sempre nos uniu.

AGRADECIMENTOS

À Deus pelos momentos difíceis superados e pelas alegrias concebidas durante a realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Graciliano de Oliveira Neto pela orientação, grande amizade e oportunidade de realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Lauro Tatsuo Kubota pela valiosa co-orientação e amizade.

Aos Profs. Drs. Luiz Manoel Aleixo e Oswaldo Espírito Santo Godinho pelo apoio e amizade.

Aos amigos do laboratório de química analítica: Beth, João (Beto), Júlio, Pilar e Silvia, pelo incentivo apoio e cordialidade.

À Luciane, técnica do laboratório de química analítica, pela amizade e valiosa colaboração.

Aos meus pais e irmãos, por tudo que já fizeram por mim.

Aos funcionários das oficinas do Instituto de Química, em especial ao Mário, pelo apoio técnico necessário à conclusão deste trabalho.

À Capes, pela bolsa de estudo sem a qual não me teria sido possível realizar este trabalho.

ÍNDICE

DEDICATÓRIA	IV
AGRADECIMENTOS	V
ÍNDICE DE FIGURAS	IX
ÍNDICE DE TABELAS	XII
RESUMO	XIII
ABSTRACT	XIV
NOMENCLATURA	XV
CAPÍTULO I	1
INTRODUÇÃO	2
1. ENZIMAS	2
1.1. Estrutura enzimática	3
1.2. Enzima como reagente analítico	4
1.3. Classificação enzimática	4
1.4. Definição de atividade enzimática	5
2. CINÉTICA ENZIMÁTICA	6
2.1. Cinética enzimática de sistema homogêneo	6
2.1.1. Modelo básico	6
2.1.1.1. Significado de K_m e V_{max}	9
2.1.1.2. Número de Mudança "Turnover"	10
2.1.1.3. Gráficos lineares obtidos a partir da equação de Michaelis-Menten.	10
2.1.2. - Modelo mais realístico	13
2.2. Fatores que afetam a cinética enzimática	14
2.2.1. Efeito da concentração do substrato	15
2.2.2. Efeito da concentração da enzima	15
2.2.3. Efeito de ativadores	16
2.2.4. Efeito de inibidores	17
2.2.5. Efeito da temperatura	18
2.2.6. Efeito do pH	19
2.2.7. Efeito da força iônica	20
3. IMOBILIZAÇÃO ENZIMÁTICA	20
3.1. Características	21
3.1.1. pH	22
3.1.2. Constante de Michaelis-Menten	22
3.1.3. Reutilização	22
3.1.4. Estabilidade	22
3.1.5. Interferência	23
4. PRINCÍPIOS DE IMOBILIZAÇÃO ENZIMÁTICA	23
4.1. Microencapsulação	23
4.2. Imobilização por adsorção	24
4.2.1. Eletrodo a base de pasta de carbono	25
4.3. Imobilização por ligação covalente em matrizes insolúveis em água	25

4.4. Imobilização por ligação covalente cruzada por reagente bifuncional.....	26
4.5. Imobilização por oclusão	27
4.5.1. Oclusão em matrizes insolúveis em água.....	29
5. BIOSSENSORES	30
5.1. Características dos biossensores.....	32
5.1.1. Estabilidade.....	32
5.1.1.1. Tipo de imobilização	32
5.1.1.2. Quantidade e pureza da enzima	33
5.1.1.3. Condições ótimas.....	33
5.1.1.4. Estabilidade do sensor base.....	33
5.1.2. Tempo de resposta	34
5.1.2.1. Velocidade de agitação da solução	34
5.1.2.3. Concentração da enzima	35
5.1.2.4. pH ótimo	35
5.1.2.5. Temperatura	35
5.1.3. Sensibilidade	35
6. FRUTOSE.....	36
7. MÉTODOS PARA DETERMINAÇÃO DE FRUTOSE.....	39
8. D-FRUTOSE 5-DEHIDROGENASE	42
9. JUSTIFICATIVA	44
10. OBJETIVO.....	45
CAPÍTULO II.....	46
PARTE EXPERIMENTAL.....	47
1. REAGENTES E APARELHAGEM	47
1.1. Reagentes	47
1.2. Aparelhagem	47
2. BIOSSENSOR PARA FRUTOSE COM ENZIMA IMOBILIZADA EM ELETRODO DE PASTA DE CARBONO.....	48
2.1. Preparação da sílica titânio/fosfato.....	48
2.1.1. Preparação da pasta de carbono.....	49
2.1.2. Construção do biossensor para frutose a partir da sílica modificada	49
3. BIOSSENSOR PARA FRUTOSE COM ENZIMA IMOBILIZADA EM FILME DE POLIPIRROL SOBRE ELETRODO DE PLATINA	50
3.1. Limpeza do eletrodo base de platina.....	50
3.2. Eletropolimerização do filme de polipirrol.....	51
3.3. Imobilização da enzima.....	52
4. BIOSSENSOR PARA FRUTOSE COM ENZIMA IMOBILIZADA EM GLUTARALDEÍDO, SOBRE ELETRODO DE PLATINA MODIFICADO COM FILME DE POLIPIRROL.....	52
4.1. Limpeza do eletrodo base	52
4.2. Eletropolimerização do filme de polipirrol.....	52
4.3. Imobilização da enzima.....	53
5. MEDIDAS ELETROQUÍMICAS.....	53
6. PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS.....	54
7. MÉTODO PADRÃO UTILIZADO PARA DETERMINAÇÃO DE FRUTOSE	54
8. CÁLCULO DO K_m DA ENZIMA FDH	55

CAPÍTULO III	57
RESULTADOS E DISCUSSÃO	58
1. ENZIMA IMOBILIZADA EM ELETRODO DE PASTA DE CARBONO MODIFICADO COM AZUL DE MELDOLA EM SÍLICA GEL RECOBERTA COM FOSFATO DE TITÂNIO	58
1.1. Propriedades redox da STF.....	59
1.2. Estudo da quantidade de enzima na pasta.....	60
1.3. Efeito da concentração do eletrólito.....	61
1.4. Estabilidade do sensor	62
1.5. Propriedades eletroquímicas do biossensor.....	63
1.6. Efeito do pH.....	64
1.7. Tempo de resposta do biossensor.....	65
1.8. Efeito do potencial aplicado.....	66
1.9. Limitação difusional.....	67
1.10. Estudo de possíveis interferentes.....	68
1.11. Curva analítica.....	69
1.12. Estabilidade da pasta e do biossensor	70
1.13. Análise de amostras reais	72
2. ENZIMA IMOBILIZADA EM POLIPIRROL SOBRE ELETRODO DE PLATINA	72
2.1. Características do filme de polipirrol	72
2.2. Estabilidade do sensor	74
2.3. Efeito do pH.....	74
2.4. Influência do potencial aplicado	75
2.5. Tempo de resposta do biossensor.....	76
2.6. Limitação difusional	77
2.7. Estudo de possíveis interferentes.....	78
2.8. Curva analítica.....	79
2.9. Estabilidade do biossensor	80
2.10. Análise de amostras reais	81
3. ENZIMA IMOBILIZADA EM GLUTARALDEÍDO, SOBRE ELETRODO DE PLATINA MODIFICADO COM FILME DE POLIPIRROL	82
3.1. Propriedades eletroquímicas do biossensor.....	82
3.2. Efeito do pH.....	83
3.3. Influência do potencial aplicado	84
3.4. Tempo de resposta do biossensor.....	85
3.5. Limitação difusional.....	86
3.6. Estudo de possíveis interferentes.....	87
3.7. Curva analítica.....	88
3.8. Estabilidade do biossensor	89
3.9. Análise de amostras reais	90
CAPÍTULO IV.....	92
CONCLUSÕES	93
PROPOSTAS PARA TRABALHOS FUTUROS.....	95
BIBLIOGRAFIA	97

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 - Dimensões relativas de uma molécula de enzima de tamanho médio (PM=100000, diâmetro de 7 nm) e de uma molécula de substrato típico. A molécula de água é mostrada para comparação.....	3
Figura 2 - Concentração em função do tempo para o consumo de substrato, formação do produto e estabelecimento do estado estacionário do complexo enzima-substrato, no modelo de Michaelis-Menten (Garrett, R. H. e Grisham, C. M., 1995).....	8
Figura 3 - Efeito da concentração do substrato na velocidade inicial da reação enzimática (Garrett, R. H. e Grisham, C. M., 1995).....	9
Figura 4 - Gráfico de Lineweaver-Burk.....	11
Figura 5 - Gráfico de Eadie-Hofstee.....	12
Figura 6 - Gráfico de Hanes-Woolf.....	13
Figura 7 - Efeito da concentração da enzima na velocidade inicial de uma reação enzimática.....	16
Figura 8 - Variação da velocidade inicial de uma reação enzimática com o aumento da concentração de um ativador genérico.....	17
Figura 9 - Efeito da temperatura sobre velocidade de reação.....	19
Figura 10 - Curva da velocidade relativa em função do pH.....	20
Figura 11 - Sequência de reações para a formação eletroquímica do PPy. Modificada de Schuhmann, 1995.....	28
Figura 12 - Diagrama de um dispositivo biossensor (Scouten <i>et al.</i> , 1995).....	31
Figura 13 - Esquema da aparelhagem utilizada nas medidas eletroquímicas; A-Potenciostato, B-Cela eletroquímica de três eletrodos e C-Sistema de aquisição de dados.....	48
Figura 14 - Esquema do eletrodo de pasta de carbono.....	50
Figura 15 - Voltamograma cíclico mostrando a limpeza do eletrodo base de platina. Solução tampão McIlvaine pH 4,5; velocidade de varredura de 20 mVs ⁻¹	51
Figura 16 - Esquema da cela eletroquímica utilizada nas medidas eletroquímicas. A-entrada de N ₂ , B-saida de gás, C-eletrodo de referência, D-eletrodo de trabalho, E-contrá eletrodo e F-entrada da amostra.....	54
Figura 17 - Cálculo experimental da K _m da FDH.....	56
Figura 18 - Esquema do mecanismo de reação em um eletrodo modificado de pasta de carbono; M-mediador; A-analito; red-forma reduzida; ox-forma oxidada (Kalcher, 1995).....	58

Figura 19 - Voltamograma cíclico obtido com eletrodo de pasta de carbono a 20 mV s ⁻¹ , em solução tampão McIlvaine a pH 4,5: (A) STF; (B) STFM e (C) STFMEz (d-frutose 5-dehidrogenase).	59
Figura 20 - Resposta do biossensor em função da porcentagem de enzima, obtida em tampão McIlvaine pH 4,5 a um potencial aplicado de 20 mV vs ECS e concentração de frutose de 0,5 mmol L ⁻¹ .	61
Figura 21 - Voltamogramas cíclicos obtidos em diferentes concentrações de eletrólito suporte McIlvaine. (A) 0,1 mmol L ⁻¹ de Na ₂ HPO ₄ e 0,05 mmol L ⁻¹ de ácido cítrico); (B) 0,2 mmol L ⁻¹ de Na ₂ HPO ₄ e 0,1 mmol L ⁻¹ de ácido cítrico; e (C) 0,6 mmol L ⁻¹ de Na ₂ HPO ₄ e 0,3 mmol L ⁻¹ de ácido cítrico. Velocidade de varredura de 20 mVs ⁻¹ , pH 4,5.	62
Figura 22 - Voltamograma cíclico obtido com o biossensor: (A) na ausência e (B) na presença de 10 mmol L ⁻¹ de frutose. Velocidade de varredura 20 mV s ⁻¹ , em solução tampão McIlvaine pH 4,5.	64
Figura 23 - Influência do pH na resposta do biossensor, obtida a um potencial aplicado de 20 mV vs ECS e concentração de frutose de 0,5 mmol L ⁻¹ .	65
Figura 24 - Dependência da resposta do biossensor em função do tempo após adição do substrato. Potencial aplicado 20 mV vs ECS, concentração de frutose de 0,5 mmol L ⁻¹ , em 5,0 ml de solução tampão McIlvaine pH 4,5.	66
Figura 25 - Dependência da resposta do biossensor para frutose em relação ao potencial do eletrodo, obtido em tampão McIlvaine pH 4,5.	67
Figura 26 - Efeito da velocidade de varredura, V, na resposta voltamétrica, em solução tampão McIlvaine a pH 4,5 e potencial aplicado de 20 mV vs ECS.	68
Figura 27 - Dependência da resposta do biossensor com a concentração de frutose em tampão McIlvaine pH 4,5. O potencial de operação foi 20 mV vs ECS.	70
Figura 28 - Variação da resposta máxima do biossensor com o tempo. Solução tampão McIlvaine, pH 4,5; concentração de frutose de 0,5 mmol L ⁻¹ , e potencial aplicado de 20mV.	71
Figura 29 - Voltamogramas cíclicos obtidos com (A) eletrodo de Pt limpo, (B) eletrodo de Pt com filme de PPy dopado com ferricianeto de sódio, (C) eletrodo de Pt com filme de Ppy dopado com HCF e enzima, sem adição de substrato e (D) eletrodo de Pt com filme de Ppy e enzima, com adição de substrato, 10 mmolL ⁻¹ . Tampão McIlvaine pH 4,5; 20 mVs ⁻¹ .	73
Figura 30 - Influência do pH na resposta do biossensor, obtida a um potencial aplicado de 250 mV vs ECS e concentração de frutose de 0,5 mmol L ⁻¹ .	75
Figura 31 - Dependência da resposta do biossensor para frutose em relação ao potencial aplicado, obtido em tampão McIlvaine pH 4,5.	76
Figura 32 - Dependência da resposta do biossensor com o tempo após adição do substrato. O potencial aplicado foi 250 mV vs ECS e concentração de frutose de 0,5 mmol L ⁻¹ , em 5,0 ml de solução tampão McIlvaine pH 4,5 e 20 mVs ⁻¹ .	77

Figura 33 - Efeito da velocidade de varredura, V, em função da densidade de corrente de pico catódico, na resposta da voltametria cíclica, em solução tampão McIlvaine a pH 4,5 e potencial aplicado de 250 mV vs ECS.....	78
Figura 34 - Dependência da resposta do biossensor com a concentração de frutose em tampão McIlvaine pH 4,5. O potencial de operação foi 250 mV vs ECS e 20 mVs ⁻¹	80
Figura 35 - Variação da resposta relativa do biossensor com o tempo. Solução tampão McIlvaine, pH 4,5; e potencial aplicado de 250mV vs ECS.....	81
Figura 36 - Voltamogramas cíclicos obtidos com (A) eletrodo de Pt limpo, (B) eletrodo de Pt com filme de Ppy dopado com ferricianeto de sódio, (C) eletrodo de Pt com filme de Ppy e glutaraldeído, biossensor, sem adição de substrato e (D) biossensor com adição de substrato, 10 mmolL ⁻¹ . Tampão McIlvaine pH 4,5; 20 mVs ⁻¹	83
Figura 37 - Influência do pH na resposta do biossensor, obtida a um potencial aplicado de 230 mV vs ECS e concentração de frutose de 0,5 mmol L ⁻¹	84
Figura 38 - Dependência da resposta do biossensor para frutose em relação ao potencial do eletrodo, obtido em tampão McIlvaine pH 4,5 e 20 mVs ⁻¹	85
Figura 39 - Dependência da resposta do biossensor com o tempo após adição do substrato. O potencial aplicado foi 230 mV vs ECS e concentração de frutose de 0,5 mmol L ⁻¹ , em 5,0 ml de solução tampão McIlvaine pH 4,5 e 20 mVs ⁻¹ vs ECS.....	86
Figura 40 - Efeito da velocidade de varredura, V, em função da densidade de corrente de pico catódico, na resposta da voltametria cíclica, em solução tampão McIlvaine a pH 4,5 e potencial aplicado de 230 mV vs ECS.....	87
Figura 41 - Dependência da resposta do biossensor com a concentração de frutose em tampão McIlvaine pH 4,5. O potencial de operação foi 230 mV vs ECS e 20 mVs ⁻¹	89
Figura 42 - Variação da resposta relativa do biossensor com o tempo. Solução tampão McIlvaine, pH 4,5; e potencial aplicado de 230 mV vs ECS.....	90

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 - Classificação internacional das enzimas, baseada nas reações por elas catalisadas.....	5
Tabela 2 - Efeito de vários tipos de inibidores na equação de velocidade de Michaelis-Menten e no K_m e V_{max} aparente.....	18
Tabela 3 - Fatores que afetam a estabilidade de um biossensor.....	32
Tabela 4 - Fatores que afetam o tempo de resposta de um biossensor.....	34
Tabela 5 - Dependência da corrente de pico para o mediador imobilizado em função do número de ciclos voltamétricos, eletrodo de pasta de carbono.....	63
Tabela 6 - Influência de possíveis compostos interferentes na determinação de frutose usando o biossensor baseado em azul de Meldola e FDH adsorvido em sílica gel modificada com fosfato de titânio.....	69
Tabela 7 - Comparação entre o biossensor com sílica modificada e o método padrão para frutose.....	72
Tabela 8 - Dependência da corrente de pico em função do número de ciclos voltamétricos, eletrodo de Pt.....	74
Tabela 9 - Influência de compostos interferentes na determinação de frutose usando o biossensor baseado em hexacianoferrato e FDH imobilizado diretamente no filme de polipirrol.....	79
Tabela 10 - Comparação entre o biossensor Ppy e o método padrão.....	82
Tabela 11- Influência de possíveis interferentes na determinação de frutose usando o biossensor com filme de PPy dopado com hexacianoferrato e FDH imobilizada em glutaraldeído.....	88
Tabela 12 - Comparação entre o biossensor PPy/glutaraldeído e o método padrão.....	90
Tabela 13 - Comparação entre os diversos tipos de imobilização estudados.....	93

RESUMO

Nos últimos anos vários sensores para mono e dissacarídeos têm sido construídos, porém, existem poucos trabalhos sobre sensores para frutose, apesar desta ser amplamente distribuída em frutas e vegetais e geralmente usada em produtos dietéticos. Com isso, objetivou-se construir, avaliar e aplicar um biossensor para frutose, utilizando a enzima d-frutose 5-dehidrogenase (E. C. 1.1.99.11), imobilizada em eletrodos de pasta de carbono e em filme de polipirrol, sem a necessidade de tratamento elaborado das amostras reais.

Neste trabalho foram construídos três biossensores para frutose: o primeiro utilizando-se a técnica de imobilização por adsorção, preparando-se uma pasta contendo grafite, sílica gel, enzima e azul de Meldola como mediador de elétrons. O biossensor foi utilizado por aproximadamente 300 análises ou três semanas de uso diário. O segundo biossensor foi construído utilizando-se a técnica de imobilização enzimática por oclusão, imobilizando-se a enzima em filme de polipirrol, suportado em eletrodo de platina, contendo ferricianeto de sódio como mediador de elétrons. Com este biossensor realizou-se cerca de 100 análises, num período de uma semana de uso diário. O último, foi construído utilizando o método de imobilização com ligação covalente cruzada, sendo a enzima imobilizada em glutaraldeído depositado sobre filme de polipirrol, suportado em eletrodo de platina; este biossensor foi utilizado por aproximadamente 200 análises, ou duas semanas de uso diário.

Os biossensores obtidos foram utilizados em análise de amostras reais, com erros relativos inferiores a 4%, quando comparados com o método padrão, e também realizados estudos das suas propriedades eletroquímicas e seus parâmetros como: pH, força iônica, interferentes, entre outros.

ABSTRACT

During the last years many sensors, for mono and disacharides, have been built, however, there are few papers concerning fructose sensors, although it is widely distributed in fruits, vegetables and generally used in dietetic products. With this fact in mind, it was decided to construct, evaluate and apply a fructose biosensor using the d-fructose 5-dehydrogenase enzyme (E. C. 1.1.99.11), immobilized in paste carbon electrodes and in polypyrrole film, without any pre-treatment of real samples.

In this work, three biosensors for fructose were prepared: for the first one it was used the adsorption immobilization technique, preparing a past with graphite, silica gel, enzyme and Meldola's blue as electron mediator. The biosensor was used for, approximately 300 analyses, or three weeks daily used.

For the second biosensor it was employed the occlusion enzymatic immobilization technique, being the enzyme immobilized in a polypyrrole film, over a platinum electrode containing sodium ferricianyte as mediator. With this sensor, about 100 analyses were performed during a period of one week, daily used.

The last biosensor was constructed using the crosslinked covalent bond method, being the enzyme immobilized in glutaraldehyde rely upon a polypyrrole film over a platinum electrode. This biosensor was used for approximately 200 analyses or two weeks daily used.

Also, the analytical parameters, such as pH, ionic strengh, interferences, of all sensors were studied as well.

All the biosensors were utilized to perform analyses of real samples with relative errors below 4%, comparing to the standard method.

NOMENCLATURA

ECS	Eletrodo de calomelano saturado.
EPC	Eletrodo de pasta de carbono
FDH	d-Fructose-5-dehidrogenase
I_{pa}	Corrente de pico anódico
I_{pc}	Corrente de pico catódico
j	Densidade de corrente, $A\text{cm}^{-2}$
STF	Sílica titânio/fosfato.
STFM	Sílica titânio/fosfato/meldola.
STFMEz	Sílica titânio/fosfato/meldola/enzima.
V	Velocidade de varredura, mVs^{-1}
PPy	Polipirrol

CAPÍTULO I

INTRODUÇÃO

1. ENZIMAS

Enzimas são, em sua maioria, proteínas de elevado peso molecular, com propriedades catalíticas específicas, presentes em todos os seres vivos.

A existência das enzimas é conhecida há aproximadamente 160 anos, sendo os primeiros estudos realizados pelo químico Sueco J. J. Berzelius em 1835, que introduziu a teoria geral de catálise química. Em 1926, Summer isolou a primeira enzima, Urease (ureia amidohidrolase, EC 3.5.1.5), recebendo por esta descoberta o prêmio Nobel em 1947.

Com a identificação da natureza protéica das enzimas (Summer, 1926; Northrop, 1930), estabeleceu-se na comunidade científica a idéia de que apenas as enzimas possuíam atividade catalítica em sistemas biológicos. A divisão do trabalho celular entre moléculas informacionais (ácidos nucleicos) e moléculas catalíticas (proteínas), foi um dogma da bioquímica bem firmado até o início dos anos 80, quando foi descoberto que alguns RNAs, além das atividades de transferência e estocagem informacional, também catalisavam diversas reações, de forma específica (Cech e Zaug, 1981; Guerrier-Takada *et al.*, 1983).

Em 1981, Thomas Cech *et al.* da Universidade do Colorado em Boulder, descobriram o primeiro RNA com atividade catalítica. Em 1983, o grupo de Sidney Altman da Universidade de Yale, em Connecticut, demonstrou que a ribonuclease P de *Escherichia coli*, a sub-unidade de RNA desempenhava a função catalítica ainda que sem a sub-unidade protéica ou qualquer outro tipo de proteína (Guerrier-Takada *et al.*, 1983; Guerrier-Takada e Altman, 1982).

Desde 1986 novas ribozimas vêm sendo descobertas nos mais diversos organismos vivos, desde vírus a vertebrados (Wu e Lai, 1989). A descoberta das

ribozimas resultou em um novo direcionamento das teorias sobre origem da vida (Ferreira e Coutinho, 1993). Pela descoberta do RNA catalítico, Thomas Cech e Sidney Altman receberam o Prêmio Nobel de química em 1989 (Soares e Lins, 1995).

Atualmente são conhecidas mais de 2000 enzimas. Várias centenas são isoladas, muitas em forma pura ou cristalina. Mais de 400 são disponíveis comercialmente e algumas destas enzimas são oriundas de mais de dez fontes diferentes.

1.1. Estrutura enzimática

Enzimas são diferenciadas umas das outras por uma área geométrica chamada sítio ativo, Figura 1, (Skoog *et al.*, 1994) no qual poderá ser encaixado apenas um, de um limitado número de compostos chamados substratos.

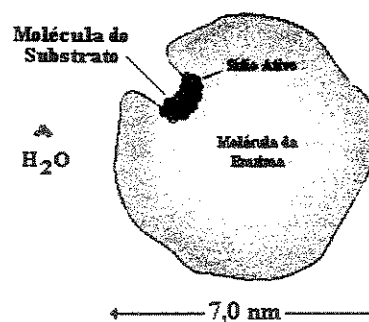
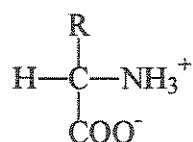


Figura 1 - Dimensões relativas de uma molécula de enzima de tamanho médio (PM=100000, diâmetro de 7 nm) e de uma molécula de substrato típico. A molécula de água é mostrada para comparação.

A estrutura protéica da enzima é composta de uma sequência de aminoácidos que tem a estrutura conhecida como betaínica (ou Zwitterion), em que o nitrogênio se encontra positivado:



1.2. Enzima como reagente analítico

Reações utilizando catálise enzimática, com propósito analítico, têm sido usadas há vários anos na determinação de substratos, ativadores e inibidores. Em 1845, a peroxidase foi utilizada para análise de peróxido (Osann, 1845). No começo de 1940, foram descritos alguns procedimentos baseados em medidas fotométricas dos cofatores NAD e NADP (Warburg, 1948). O desenvolvimento de técnicas de imobilização enzimática associada com métodos de análises eletroquímicos, luminescentes e termométricos, entre outros, tem aumentado a aceitação destes procedimentos enzimáticos em áreas como a da química clínica.

1.3. Classificação enzimática

Uma nomenclatura sistemática para a classificação das enzimas de acordo com o tipo de reação que elas catalisam, foi primeiramente estabelecida pela “Enzyme Commission of the International Union of Biochemistry” em 1961 e foi atualizada em 1975 (Florkin e Stotz, 1973).

Este sistema coloca todas as enzimas em seis grandes classes, cada uma com sub-classes, segundo o tipo de reação catalisada, conforme mostra a Tabela 1.

Tabela 1 - Classificação internacional das enzimas, baseada nas reações por elas catalisadas.

Nº	Classe	Tipo de reação catalisada
1	Oxiredutase	Transferência de elétrons
2	Transferase	Reações de transferência de grupos
3	Hidrolase	Reações de hidrólise
4	Liases	Adição de grupos a duplas ligações ou o inverso
5	Isomerase	Transferência de grupos dentro da molécula produzindo formas isoméricas
6	Ligases	Formação de ligações C-C, C-S, C-O e C-N por reações de condensação acopladas a clivagem de ATP

1.4. Definição de atividade enzimática

A quantidade de enzima não pode ser expressa em termos clássicos (miligrama por decilitro), porque apenas uma pequena quantidade de enzima, cataliticamente ativa, está presente em uma dada massa da substância.

Segundo Guibault (1984), uma unidade (U) de uma enzima qualquer é definida como a quantidade que catalisa a transformação de 1 micromol de substrato por minuto. É recomendado que a temperatura seja fixada em 25 °C, sempre que possível. Outras condições, incluindo pH e concentração de substrato, devem ser as ótimas consideradas para a enzima.

A concentração de uma enzima em solução deve ser expressa como unidades por mililitro (U/mL) ou unidades internacionais por litro (UI/L).

A atividade específica de uma enzima é expressa como unidade de enzima por miligrama de proteína (U/mg de proteína). A atividade molecular é definida como unidades por micromol de enzima na atividade do substrato ótima, isto é, número de moléculas de substrato transformada por minuto por moléculas de

enzima. O centro de atividade catalítica é definido como o número de moléculas de substrato transformada por minuto por centro catalítico da enzima.

Recentemente, a Enzyme Commission (Lehninger, 1993), propôs o katal (kat) como a unidade de atividade enzimática. O katal refere-se a conversão de 1 mol de substrato por segundo e será igual a $6 \times 10^7 \mu\text{mol/min}$ de substrato, ou $6 \times 10^7 \text{ U}$. Uma unidade é igual a 16,67 nkatal.

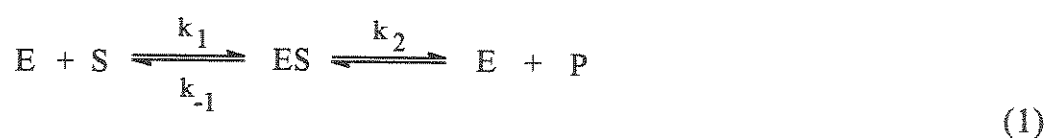
2. CINÉTICA ENZIMÁTICA

Devido a sua especificidade e seletividade, as enzimas têm grande potencial de utilização em química analítica. Por muitos anos, métodos cinéticos enzimáticos têm sido usados para a determinação de substrato, enzima, ativadores e inibidores. Conhecimentos de cinética enzimática são importantes para a compreensão de aspectos analíticos do comportamento enzimático. É também uma poderosa ferramenta para o conhecimento das propriedades e mecanismo da ação das enzimas.

2.1. Cinética enzimática de sistema homogêneo

2.1.1. Modelo básico

De acordo com o mecanismo da equação básica para a cinética enzimática (Michaelis e Menten, 1913), tem-se:



De acordo com esta equação, o substrato S combina-se com a enzima E para formar um complexo enzima-substrato ES, que dissocia-se em produto P e libera a enzima, k_1 , k_{-1} e k_2 são constantes de velocidade.

A Figura 2, mostra a trajetória das concentrações dos constituintes envolvidos para o caso $k_1 = k_{-1} = k_2$, com a concentração total da enzima menor em comparação com a concentração do substrato. Após um período inicial, as concentrações de E e ES variam ligeiramente com o tempo até o fim da reação.

Usando a hipótese do estado estacionário que $dE/dt = 0$ e $d(ES)/dt = 0$, junto as equações cinéticas:

$$\frac{dS}{dt} = k_{-1}[ES] - k_1[E][S] \quad (2)$$

$$\frac{dE}{dt} = (k_{-1} + k_2)[ES] - k_1[E][S] \quad (3)$$

$$\frac{d[ES]}{dt} = k_1[E][S] - (k_{-1} + k_2)[ES] \quad (4)$$

$$\frac{dP}{dt} = k_2[ES] \quad (5)$$

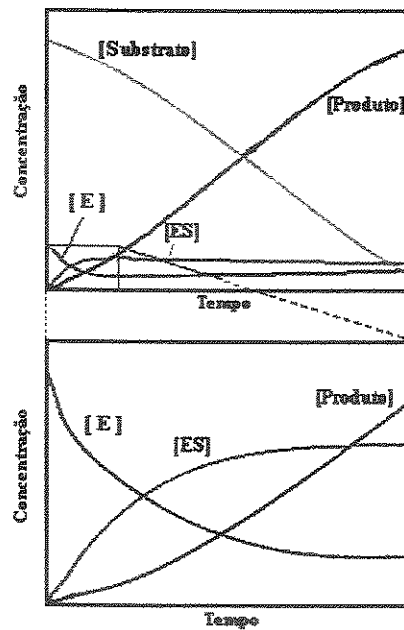


Figura 2 - Concentração em função do tempo para o consumo de substrato, formação do produto e estabelecimento do estado estacionário do complexo enzima-substrato, no modelo de Michaelis-Menten (Garrett, R. H. e Grisham, C. M., 1995).

A concentração total da enzima, E_t , é a soma das formas livre e combinada:

$$[E_t] = [E] + [ES] \quad (6)$$

a equação seguinte pode ser obtida:

$$v = \frac{k_2[E_t][S]}{(k_{-1} + k_2)/(k_1) + [S]} \quad (7)$$

Esta equação é reduzida à equação de Michaelis-Menten:

$$v = \frac{V_{\max}[S]}{K_m + [S]} \quad (8)$$

onde $V_{\max} = k_2[E_t]$, $K_m = (k_{-1} + k_2)/k_1$, e $[S]$ é a concentração inicial do substrato. $V_{\max}$ é conhecida como a velocidade máxima e K_m como a constante de Michaelis-Menten.

O valor das constantes cinética K_m e V_{max} pode ser obtida pelo gráfico de v versus $[S]$, como mostrado na Figura 3. Da equação de Michaelis-Menten, é visto que K_m é igual ao valor de $[S]$ quando v é igual a $V_{max}/2$.

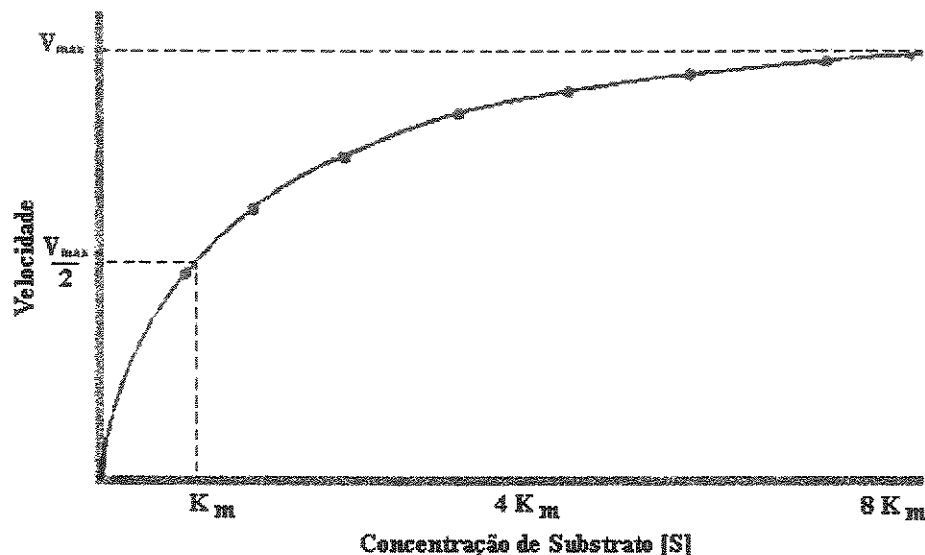


Figura 3 - Efeito da concentração do substrato na velocidade inicial da reação enzimática (Garrett, R. H. e Grisham, C. M., 1995).

2.1.1.1. Significado de K_m e V_{max}

Quando a velocidade da reação enzimática atinge o V_{max} toda a enzima encontra-se sob a forma complexa ES, Figura 3.

Quando a velocidade da reação atingir a metade da velocidade máxima, $V=V_{max}/2$, K_m será igual a $[S]$.

Se $k_2 \gg k_1$, $K_m = k_2/k_1$, que é a hipótese de Michaelis-Menten, segundo o qual $[E] + [S] = [ES]$, estão em equilíbrio e a formação do produto apresenta uma ligeira perda. Assim o valor da K_m pode ser considerado inversamente proporcional à afinidade da enzima ao substrato e vice-versa.

Quando a enzima é imobilizada, geralmente se observa um aumento no valor de K_m , provavelmente devido à carga no substrato e/ou suporte, efeito de difusão, mudança na configuração terciária, etc.

A constante de Michaelis-Menten sendo uma constante de proporção do complexo enzima-substrato é um bom parâmetro para medida quantitativa de uma reação enzimática.

2.1.1.2. Número de Mudança “Turnover”

O número turnover de uma enzima, k_{cat} , é definido como o número de moléculas de substrato convertidas em produto por molécula de enzima por unidade de tempo, quando a enzima é saturada com substrato. O número “turnover” também refere-se à atividade molecular da enzima, como é mostrado por Garrett e Grisham, 1995. Para o modelo básico da equação de Michaelis-Menten, onde existe apenas o complexo ES, V_{max} representa o número turnover, já que é conhecida a concentração da enzima na mistura reacional $[E_T]$. Na concentração de saturação $[S]$, $v = V_{max} = k_2[E_T]$. Assim,

$$k_2 = \frac{V_{max}}{[E_T]} = k_{cat} \quad (9)$$

O termo k_{cat} , representa a eficiência cinética da enzima.

2.1.1.3. Gráficos lineares obtidos a partir da equação de Michaelis-Menten.

Outras representações da equação de Michaelis-Menten são mais utilizadas para a obtenção dos valores de K_m e V_{max} , a partir da representação dos dados experimentais. Alguns destes métodos serão mostrados a seguir:

• *Gráfico de Lineweaver-Burk*

Fazendo o inverso de ambos os lados da equação de Michaelis-Menten, tem-se:

$$\frac{1}{v} = \frac{K_m}{V_{\max}} \left(\frac{1}{[S]} \right) + \frac{1}{V_{\max}} \quad (10)$$

comparando-se com a equação da reta $y = mx + b$, onde $y = 1/v$; m , a inclinação é $K_m/V_{\max}$; $x = 1/[S]$; e $b = 1/V_{\max}$. Plotando-se $1/v$ versus $1/[S]$, é obtida uma reta cuja interseção com o eixo x é $-1/K_m$, e com o eixo y é $1/V_{\max}$ e cuja inclinação é $K_m/V_{\max}$ como mostrada na Figura 4.

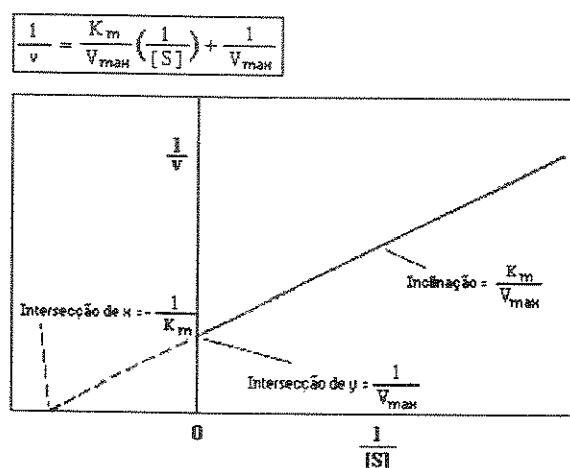


Figura 4 - Gráfico de Lineweaver-Burk

• *Gráfico de Eadie-Hofstee*

Multiplicando-se ambos os lados da equação de Michaelis-Menten por $(K_m + [S])$, obtemos:

$$vK_m + v[S] = V_{\max}[S] \quad (11)$$

ou

$$v[S] = -vK_m + V_{\max}[S] \quad (12)$$

deste modo

$$v = -K_m \left(\frac{v}{[S]} \right) + V_{\max} \quad (13)$$

Plotando-se v versus $v/[S]$ como sugerido por Eadie e Hofstee produz-se uma reta com inclinação $= -K_m$, interseção de $y = V_{\max}$ e de $x = V_{\max}/K_m$, Figura 5.

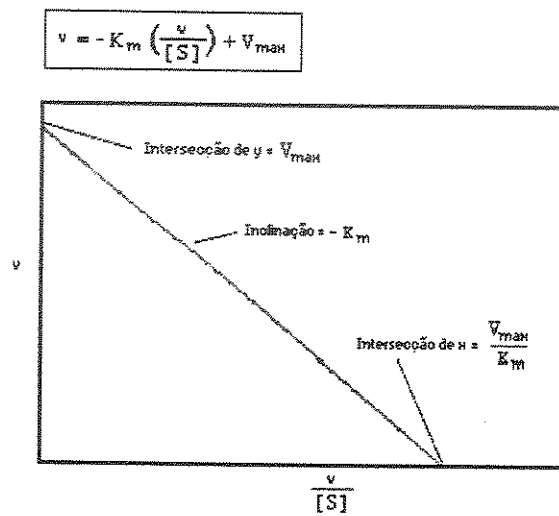


Figura 5- Gráfico de Eadie-Hofstee

• Gráfico de Hanes-Woolf

Multiplicando-se ambos os lados da equação de Lineweaver-Burk por $[S]$, temos:

$$\frac{[S]}{v} = [S] \left(\frac{K_m}{V_{\max}} \right) \left(\frac{1}{[S]} \right) + \frac{[S]}{V_{\max}} = \frac{K_m}{V_{\max}} + \frac{[S]}{V_{\max}} \quad (14)$$

e

$$\frac{[S]}{v} = \left(\frac{1}{V_{\max}} \right) [S] + \frac{K_m}{V_{\max}} \quad (14)$$

Plotando-se $[S]/v$ versus $[S]$ obtemos uma linha reta onde a inclinação é $1/V_{\max}$ a interseção em $y = K_m/V_{\max}$, e a de $x = -K_m$, como mostrado na Figura 6.

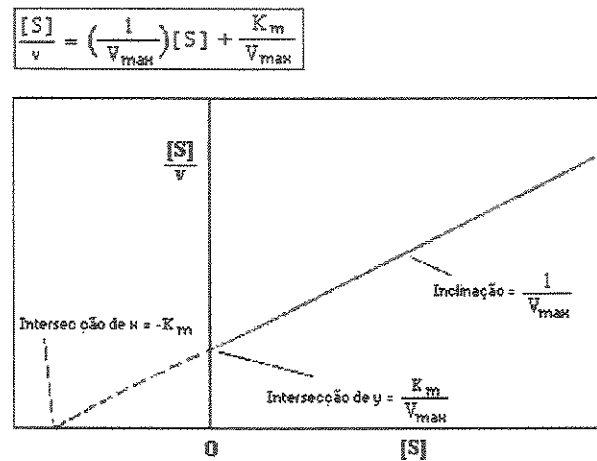
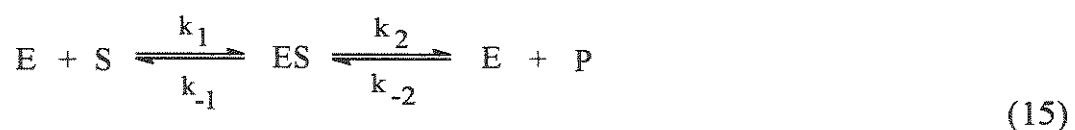


Figura 6 - Gráfico de Hanes-Woolf

2.1.2. - Modelo mais realístico

Um modelo mecanístico mais completo deve incluir a reação de retorno com k_2 , mostrado abaixo:



Assumindo, outra vez, que $[E_t]$ é menor em comparação com $[S]$ e assumindo o estado estacionário $\frac{d[ES]}{dt} = \frac{dE}{dt} = 0$, uma nova equação cinética pode ser resolvida, dando:

$$v = \frac{(k_1 k_2 [S] - k_{-1} k_{-2} [P])[E_t]}{(k_{-1} + k_2) + k_1 [S] + k_{-2} [P]} \quad (16)$$

onde,

$$V_f = K_2[E_t] \quad (17)$$

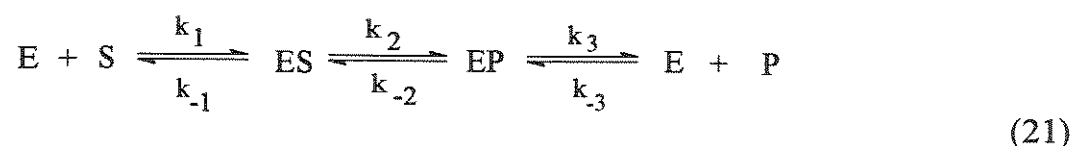
$$V_b = k_{-1}[E_t] \quad (18)$$

$$K_s = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1} \quad (19)$$

$$K_p = \frac{k_{-1} + k_2}{k_{-2}} \quad (20)$$

V_f e V_b são definidos como as velocidades máximas para as reações direta e inversa, respectivamente, e K_s e K_p são definidas como as constantes de Michaelis para o substrato e produto, respectivamente. Nota-se que, se $P = 0$, a Equação 16 reduz-se à equação básica de Michaelis-Menten.

Uma descrição mais completa do mecanismo deve admitir a formação de mais de dois complexos entre o substrato e o produto. O mecanismo:



pode ser resolvido com o uso das equações da velocidade e aproximações do estado estacionário, dando equação com a mesma forma da Equação 16. Neste caso, novas constantes cinéticas são definidas.

2.2. Fatores que afetam a cinética enzimática

Existem fatores que afetam a cinética das reações enzimáticas, podendo aumentar ou diminuir a velocidade reacional, pela modificação na estrutura dos sítios ativos das diferentes enzimas e, conseqüentemente, alterando a atividade catalítica. Os principais fatores são: concentração do substrato, concentração da enzima, ativadores, inibidores, temperatura, pH e força iônica (Guilbault, 1984).

2.2.1. Efeito da concentração do substrato

Para concentrações de substrato baixa, $[S] \leq 0,1K_m$, a equação de Michaelis-Menten reduz-se a

$$v = \left(\frac{V_{\max}}{K_m} \right) [S] \quad (22)$$

a velocidade inicial da reação (v) é diretamente proporcional à concentração do substrato, aplicando-se a cinética de reações de primeira ordem.

Quando a concentração do substrato é elevada, $[S] \geq 10K_m$, a enzima é considerada saturada com seu substrato e a reação é de ordem zero.

$$V = V_{\max} \quad (23)$$

Na região $0,1 K_m \leq [S] \leq 10K_m$ a equação completa é necessária e a reação é de ordem mista.

2.2.2. Efeito da concentração da enzima

Como previsto pela equação de Michaelis-Menten (eq. 8), a velocidade inicial de uma reação enzimática é proporcional à concentração inicial da enzima $[E]_0$. Esta dependência é mostrada na Figura 7.

$$V_0 = \frac{K_3[E]_0[S]_0}{K_m + [S]_0} \quad (24)$$

Teoricamente um aumento na velocidade reacional pode ser observado por um aumento na concentração de enzima, até um limite onde esta linearidade é interrompida.

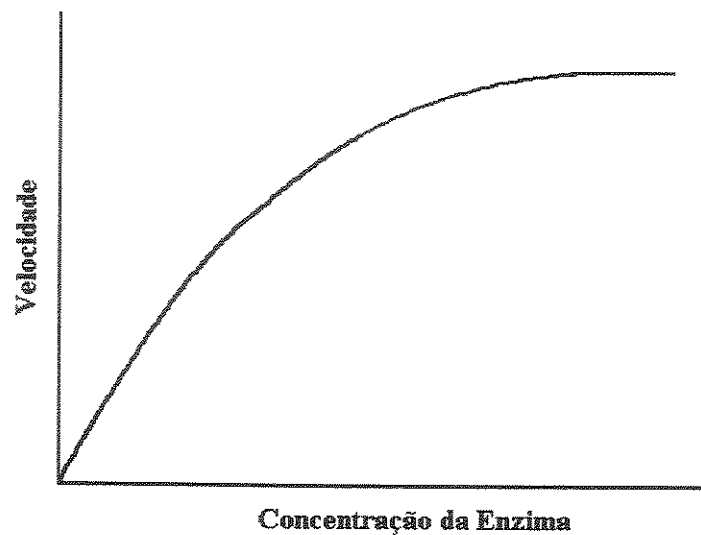


Figura 7 - Efeito da concentração da enzima na velocidade inicial de uma reação enzimática.

2.2.3. Efeito de ativadores

Ativadores ou cofatores enzimáticos são substâncias necessárias à enzima para torná-la ativa ou aumentar seu poder catalítico. O efeito da concentração do ativador na velocidade inicial de uma reação enzimática é semelhante ao da concentração do substrato. Em baixas concentrações do ativador existe uma dependência da velocidade de primeira ordem. Em concentrações elevadas, a enzima é ativada ao máximo e a velocidade passa a não depender mais da concentração do ativador, Figura 8.

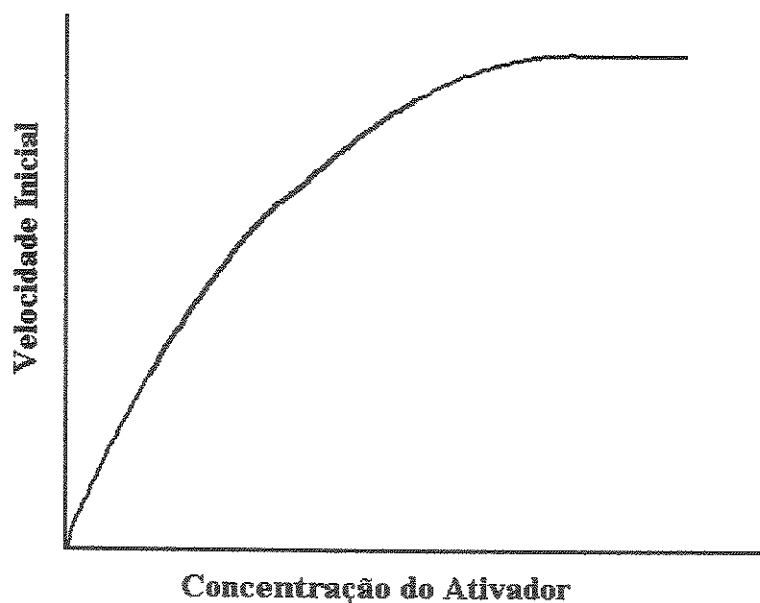


Figura 8 - Variação da velocidade inicial de uma reação enzimática com o aumento da concentração de um ativador genérico.

Alguns ativadores são íons metálicos simples como Mn^{2+} , Cu^{2+} , Ca^{2+} ou podem ser substâncias orgânicas complexas como derivados vitamínicos (Baum e Czok, 1959).

2.2.4. Efeito de inibidores

Estudos de inibição geralmente indicam algo em relação à especificidade de uma enzima, a arquitetura física e química do sítio ativo e o mecanismo cinético da reação (Boyer, 1970).

O inibidor é um composto que causa uma redução na velocidade de uma reação catalítica, reagindo com a própria enzima ou com o substrato.

As enzimas são muito sensíveis a traços de metais e a inibição de reações enzimáticas tem sido usada para a determinação do agente inibidor, geralmente um

metal. Este agente pode ou não causar um envenenamento irreversível da enzima tornando-a inativa cataliticamente (Orgen e Johansson, 1979).

A Tabela 2, mostra o efeito de vários tipos de inibidores (Garrett e Grisham, 1995).

Tabela 2 - Efeito de vários tipos de inibidores na equação de velocidade de Michaelis-Menten e no K_m e V_{max} aparente.

Tipo de Inibição	Velocidade da Equação	K_m Aparente	V_{max} Aparente
Nenhum	$v = V_{max}[S]/(k_m + [S])$	K_m	V_{max}
Competitiva	$v = V_{max}[S]/([S] + K_m(1 + [I]/K_I))$	$K_m(1 + [I]/K_I)$	V_{max}
Não Competitiva	$v = (V_{max}[S]/(1 + [I]/K_I))/(K_m + [S])$	K_m	$V_{max}/(1 + [I]/K_I)$
Mista	$v = V_{max}[S]/((1 + [I]/K_I)K_m + (1 + [I]/K'_I)[S])$	$K_m(1 + [I]/K_I)/(1 + [I]/K'_I)$	$V_{max}/(1 + [I]/K'_I)$

2.2.5. Efeito da temperatura

As reações enzimáticas consistem de três etapas: a formação do complexo enzima-substrato, conversão deste em um complexo enzima-produto e finalmente a sua dissociação em produto e enzima livre. O efeito total da temperatura nesta reação será resultado dos efeitos separados destas três etapas individualmente.

Com o aquecimento, a energia livre de Gibbs (dG) e a entropia associada, contribuirão para os processos termodinâmicos observados:

$$dG = dH - TdS \quad (25)$$

Para cada enzima existe uma temperatura ótima para um determinado conjunto experimental. Geralmente, a velocidade de reação aumenta à medida que se eleva a temperatura. Este aumento leva a um aumento da agitação molecular e da frequência de colisão entre as moléculas da enzima e do substrato, aumentando também a desnaturação proteica pela modificação da estrutura espacial da enzima, Figura 9.

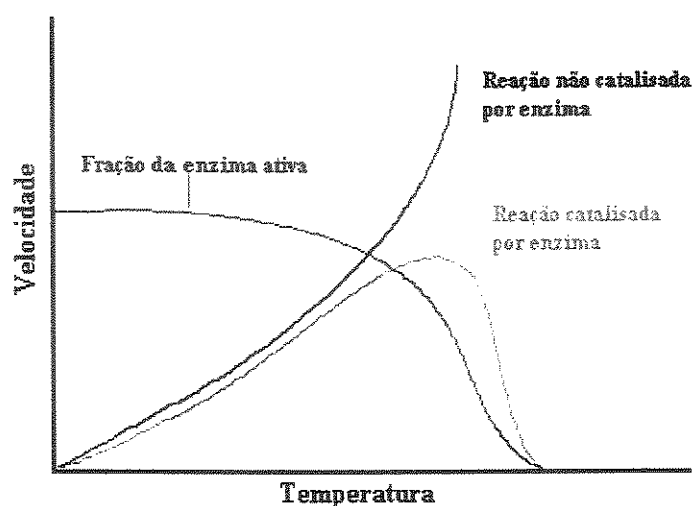


Figura 9 - Efeito da temperatura sobre velocidade de reação.

Para evitar grandes perdas de atividade, as enzimas são acondicionadas sob refrigeração, entre 2 e 5 °C. A temperatura recomendada para se desenvolver reações enzimáticas é assunto de grandes controvérsias, segundo a IUPAC-IUB (Florkin e Stotz, 1973) é de 25 °C, porém a maioria dos trabalhos envolvendo cinética enzimática sugerem a utilização da temperatura de 36 °C, que é a temperatura interna do corpo humano (Guilbault, 1984), embora possa otimizar-se a mesma de acordo com as condições experimentais de análise.

2.2.6. Efeito do pH

As enzimas apresentam um pH ótimo no qual possuem atividade máxima, sendo determinado experimentalmente nas condições de trabalho, conforme ilustra a Figura 10. As curvas de variação de atividade enzimática em diferentes valores de pH refletem o estado de ionização dos importantes grupos doadores ou receptores de prótons no sítio catalítico e seus respectivos estados de ionização adequados. O pH ótimo de uma enzima não é necessariamente idêntico ao pH do meio em que normalmente se encontram; este pode estar um pouco acima ou abaixo daquele valor. A velocidade catalítica das enzimas pode, portanto, ser regulada por variações do pH do meio em que se encontram.

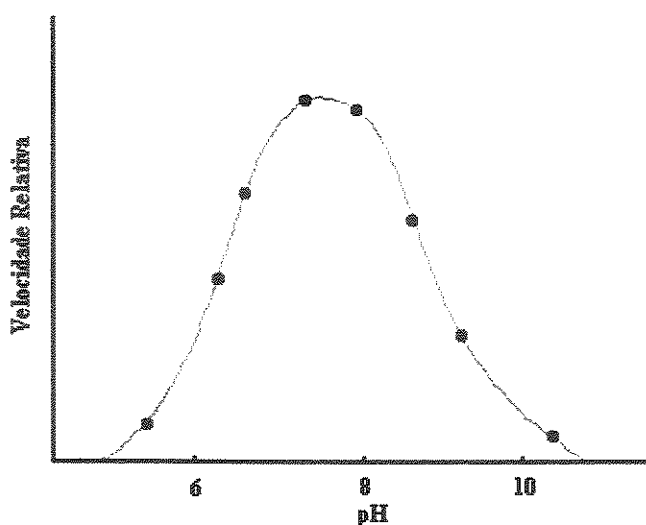


Figura 10 - Curva da velocidade relativa em função do pH

2.2.7. Efeito da força iônica

A força iônica afeta o equilíbrio do sistema influenciando na reação enzimática. A atividade de um sistema enzimático depende não só do valor de pH, mas também do tipo de solução tampão utilizada, que pode afetar a atividade ou estabilidade de uma enzima, devido a presença de cargas, ativação aniônica (formação de cargas), termodinâmica da reação, efeito de complexação, entre outros fatores.

Para obter-se valores reprodutíveis, deve-se eliminar cuidadosamente íons interferentes e controlar a força iônica para se assegurar a concentração efetiva dos reagentes.

3. IMOBILIZAÇÃO ENZIMÁTICA

Hoje as enzimas têm importante papel industrial devido a extraordinária especificidade, poder catalítico e a vantagem de operar a baixa temperatura. Entretanto, o uso das enzimas em processos industriais é restrito. Primeiro, por seu

caráter protéico, uma vez que as enzimas podem manter sua atividade ótima em uma faixa limitada de condições, e segundo, pelo fato das enzimas apresentarem catálise homogênea, sendo geralmente diluídas em soluções aquosas e desprezadas após o uso, por perderem a atividade ou por não serem recuperadas (Zentgraf, 1991).

O processo de imobilização oferece uma possível solução para esse problema. Pela associação da enzima a um suporte sólido insolúvel, com dimensões que permitam que a reação enzima-substrato ocorra, num sistema de catálise heterogênea, torna-se possível sua utilização inúmeras vezes em batelada ou processo contínuo.

A primeira comunicação sobre imobilização enzimática ocorreu em 1916 (Nelson e Griffin, 1916), quando estes autores adsorveram a invertase em carvão e mostraram que a enzima mantinha atividade, podendo ser utilizada várias vezes.

Quimotripsina, papaina e tripsina foram comercialmente imobilizadas em polímeros. Desde então, as pesquisas sobre imobilização foram intensificadas, assim como a utilização de enzimas aplicadas à química analítica (Gray, 1977) Bowers, 1976); análise clínicas (Ruzicka, 1974) e a estudos de imobilização em colunas (Schifreen, 1977).

3.1. Características

A imobilização enzimática produz modificações em algumas das características físico-químicas da enzima. Algumas destas modificações são:

3.1.1. pH

O pH ótimo de atividade enzimática é afetado através da modificação no micro-ambiente, ligações de hidrogênio, interações eletrostática, etc, sofrendo alterações de cerca de duas unidades de pH, dependendo do caso.

3.1.2. Constante de Michaelis-Menten

Geralmente ocorre um aumento de K_m , devido ao fato da reação apresentar uma catálise heterogênea, dificultando o processo de difusão e apresentando também modificações da estrutura tridimensional. Quando imobilizadas, estas constantes são denominadas aparentes.

3.1.3. Reutilização

Através do processo de imobilização sofrido pelas enzimas estas podem ser reutilizadas.

3.1.4. Estabilidade

O processo de imobilização, modifica as propriedades físico-químicas das enzimas, aproximando-as do seu ambiente natural. Com este processo, as enzimas adquirem maior estabilidade, operam em faixas de pH mais amplas e toleram temperaturas maiores, propiciando seu uso em processos industriais.

3.1.5. Interferência

As enzimas imobilizadas sofrem menor ação de ativadores e inibidores que as enzimas solúveis.

4. PRINCÍPIOS DE IMOBILIZAÇÃO ENZIMÁTICA

A utilização de enzimas na química analítica apresenta algumas desvantagens, tais como: custo, instabilidade, pouca precisão e requer certos cuidados quanto à sua manipulação. Essas dificuldades podem ser superadas ou minimizadas através do desenvolvimento de técnicas de imobilização enzimática. Essas técnicas consistem basicamente no aprisionamento da enzima em uma matriz inerte, na qual a enzima mantém suas propriedades catalíticas por maior tempo podendo ser utilizada em um maior número de análises.

Como as enzimas, em sua maioria, são proteínas, esses processos de imobilização devem ser brandos, em faixas estreitas de pH e temperatura, de forma que a imobilização enzimática ocorra com sucesso.

Na literatura são mostradas algumas técnicas de imobilização de enzima, dentre as quais estão a imobilização por inclusão (Bauman *et al.*, 1965), adsorção (Silman e Katchalski, 1966), imobilização por ligação covalente (Vallee e Riordam, 1969) e por ligação cruzada (Jansen e Olson, 1969). Nesta parte do trabalho apresenta-se um resumo destas técnicas e seus derivados.

4.1. Microencapsulação

O processo de imobilização enzimática através de microcapsulamento foi primeiro introduzido por Chang em 1964 e consiste em aprisionar a enzima na

superfície de microcápsulas, limitadas por uma membrana polimérica semi-permeável.

As principais vantagens em utilizar este processo são: cinética em estado estacionário realizada rapidamente, ampla área superficial da membrana, remoção dos inibidores à medida que são produzidos, reação rápida desde que o processo difusional seja pequeno e aumento da seletividade, alcançado através de membranas permeáveis mais seletivas.

As principais desvantagens residem no fato de que o procedimento de polimerização interfacial pode causar a desativação da enzima e dificultar a imobilização das microcápsulas na base do sensor.

4.2. Imobilização por adsorção

A adsorção de enzimas em suportes insolúveis envolve ligações iônicas, polares e pontes de hidrogênio ou interações hidrofóbicas e π -eletrônicas. Alguns destes suportes adsorventes são: vidro (Hummel e Anderson, 1965), quartzo (Kobamoto *et al.*, 1966), carvão vegetal (Vorobeve e Pollorak, 1966) e sílica gel (Tverhinova *et al.*, 1971).

Os suportes adsorventes podem pertencer a duas categorias: porosos ou não porosos. Os suportes não porosos são aqueles em que as enzimas ficam fracamente ligadas e os porosos são os que tem seus poros preenchidos pelas enzimas.

Este método possui como principal característica a sua grande simplicidade. A ligação da enzima com o suporte é feita por simples exposição e as condições são brandas, mas, a enzima adsorvida é altamente dependente de fatores como pH, solventes, substrato e temperatura. Variações destes fatores podem causar uma dessorção progressiva da enzima.

4.2.1. Eletrodo a base de pasta de carbono

O carbono, em muitos casos, é um substrato ideal para construção de eletrodos. Dentre os seus atrativos podemos destacar: baixo custo, fácil manuseio, resposta voltamétrica estável, versatilidade, correntes residuais baixas e faixa de potencial anódico relativamente ampla em relação aos materiais clássicos, usados na construção dos diferentes tipos de sensores eletroquímicos (Gilmartin e Hart, 1995). O carbono é morfologicamente diverso, existindo em várias formas apropriadas para aplicações eletroquímicas, como fibras de carbono (Csöregi *et al.*, 1993), carbono vítreo (Ruiz *et al.*, 1993), pasta de grafite (Adams, 1958), compostos (Céspedes *et al.*, 1993) e filmes de carbono (Kinoshita, 1988).

Recentes descobertas envolvendo a composição do grafite em pó com outros materiais, como por exemplo a sílica gel modificada (Kubota *et al.*, 1995) tornou esse campo de pesquisa uma alternativa de grande importância para a preparação de eletrodos quimicamente modificados, bem como a construção de biossensores.

Atualmente, vários trabalhos sobre o assunto vêm sendo publicados na literatura (Hu e Turner, 1991; Amine *et al.*, 1993; Mannino e Cosio, 1994; Kalcher *et al.*, 1995; Gorton, 1995; Ramirez *et al.*, 1995; Garcia *et al.*, 1996), mostrando o grande interesse por essa nova área de pesquisa, bem como o grande campo de aplicação.

4.3. Imobilização por ligação covalente em matrizes insolúveis em água

A principal característica deste tipo de imobilização em suporte insolúvel é a formação de uma ligação covalente entre os grupos funcionais não ativos da enzima com grupos reativos (hidroxila, carbonila, amino, fenólico, etc.) ligados na superfície sólida do suporte insolúvel.

Devido ao fato da ligação covalente colocar as enzimas em um meio-ambiente mais natural, geralmente funcionam mais ativamente, tendo a estabilidade

aumentada e a vantagem de não ser afetada por pH, força iônica, substrato, solventes ou temperatura (Guilbault e Oliveira Neto, 1984).

A escolha do suporte está ligada às suas propriedades de solubilidade, estabilidade mecânica, grupos funcionais, área superficial e natureza hidrofóbica ou hidrofílica. Os suportes insolúveis mais utilizados incluem os polímeros (agar-agar, amido, celulose, colágeno, dextrana, sefarose, etc.) e materiais inorgânicos (óxidos metálicos e vidro com porosidade conhecida).

4.4. Imobilização por ligação covalente cruzada por reagente bifuncional

Reagentes bifuncionais têm sido usados para imobilizar enzimas ou proteínas por ligações cruzadas intermoleculares. O método está baseado na formação de partículas, devido à ligação covalente cruzada formada nas moléculas de enzimas entre si, por pontes intermoleculares e/ou moléculas do suporte inerte com reagentes bifuncionais. Desta forma, obtém-se uma estrutura de elevado peso molecular.

Os reagentes bifuncionais podem ser divididos em duas classes, homobifuncionais (glutaraldeído, ácido bisdiazobenzidino-2,2'-dissulfônico, etc.) e heterobifuncionais (3-metoxdifetil metano, tolueno-2-isocianato-4-isotiocianato, etc.).

A imobilização com glutaraldeído é um dos métodos mais utilizados, devido à sua simplicidade e ao fato das ligações químicas da enzima permitirem o controle das propriedades físicas do produto final. Também produz complexos de alta atividade e confere boa estabilidade frente às variações de pH, força iônica, solvente e temperatura. A principal desvantagem é que muitas enzimas são sensíveis ao acoplamento do reagente, levando à perda de atividade no processo.

4.5. Imobilização por oclusão

O processo de imobilização enzimática por oclusão é caracterizado pela incorporação de moléculas de enzimas dentro de uma rede tridimensional, de um polímero insolúvel na água ou aprisionadas dentro de microcápsulas, que são delimitadas por membranas semi-permeáveis, que possuem poros com dimensões do produto da reação (Silva, 1991). Esta técnica de imobilização impõe restrição mínima às enzimas imobilizadas e não envolve ligação covalente para suportar a enzima, o que a torna vantajosa para imobilização de qualquer tipo de enzima.

A pesquisa de novos materiais poliméricos condutores de corrente elétrica tem crescido muito na última década. Tal interesse deve-se às várias aplicações tecnológicas possíveis destes materiais, tais como: baterias plásticas recarregáveis, mostradores eletro-ópticos, blindagem contra radiações eletromagnéticas e, atualmente, suporte na construção de biossensores (Peres, 1989). Polímeros heterocíclicos como polipirrol são facilmente preparados através da oxidação eletroquímica do monômero, levando à obtenção de filmes condutores dopados concomitantemente com sua formação.

Polipirrol (PPy) é conhecido desde o começo do século como “pirrol negro”. Foi sintetizado eletroquimicamente pela primeira vez em forma de filme por Mac Neill *et al.*, em 1965, porém suas propriedades só foram estudadas mais extensivamente por Diaz *et al.* em 1979. A partir de então, vários trabalhos têm sido publicados explorando suas propriedades.

Segundo Diaz *et al.* 1979, a formação de polímeros condutores é geralmente alcançada por meio de uma polimerização eletroquimicamente induzida de um monômero em soluções livres de O₂ ou, ainda, em menor extensão, por polimerização química utilizando agentes oxidantes. A Figura 11 mostra um mecanismo de polimerização proposto para a preparação eletroquímica do polipirrol, onde temos: 1 - Oxidação do pirrol na superfície do eletrodo com a formação de pirrol com carga positiva; 2 - Formação do dímero pela combinação

de dois pirrol catiônico; 3 - Oxidação do dímero na superfície do eletrodo; 4 - Oxidação do dímero por um radical monomérico catiônico; 5 - Formação de altos oligômeros, pela combinação de radicais de oligômeros e monômeros catiônicos; 6 - Reação em cadeia, oxidação do polímero paralelamente com a incorporação de ânions do eletrólito para compensar as cargas positivas da cadeia polimérica.

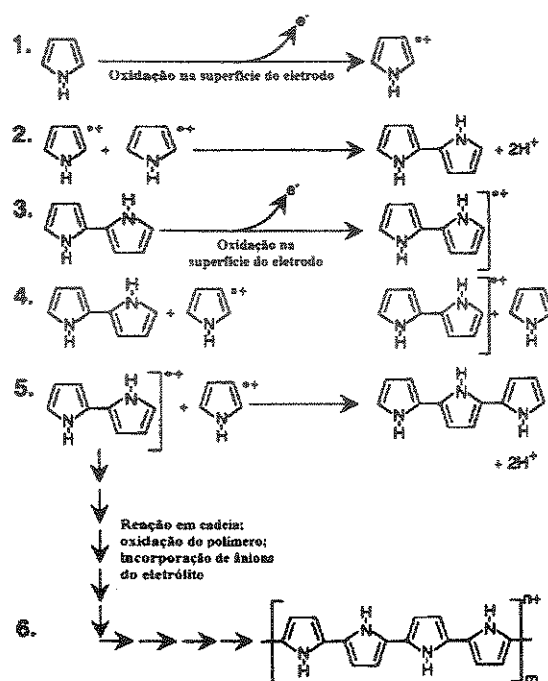


Figura 11 - Sequência de reações para a formação eletroquímica do PPy. Modificada de Schuhmann, 1995.

A utilização de filmes poliméricos na construção de biossensores tem aumentado o campo de aplicação destes sensores. A incorporação de um filme polimérico a um biossensor pode fazer com que seja possível sua utilização em condições que antes seria inviável.

Eletrodos enzimáticos são obtidos pela combinação da superfície do eletrodo, geralmente platina, ouro, grafite ou carbono vítreo, com uma enzima, mais frequentemente as oxidases ou dehidrogenases. Estas enzimas são imobilizadas covalentemente na superfície do eletrodo, ou com ligação cruzada dentro de uma rede polimérica de um polímero com propriedades redox, ou presas fisicamente através de uma membrana de diálise. Modificações na superfície do

grafite e, menos freqüentemente, na de carbono vítreo podem ser realizadas por meio de processos de oxidação para a formação de grupos funcionais apropriados para a ligação covalente na enzima. Entretanto, a funcionalização de superfícies de platina e ouro, por meio de silanização, é em geral problemática devido à facilidade para a hidrólise e formação de polímeros siloxanos não condutores, que bloqueiam a transferência de carga na superfície do eletrodo.

Filmes poliméricos condutores têm sido amplamente empregados na construção de eletrodos quimicamente modificados. Estes são usados no biossensor para mediar transferência eletrônica, evitar efeitos de envenenamento, aumentar a seletividade impedindo a difusão de alguns interferentes, imobilizar biocomponentes, aprisionar ou incorporar um mediador, estender a faixa linear do biossensor e fornecer-lhe biocompatibilidade (Peres *et al.*, 1989).

O aprisionamento de enzimas em uma matriz de PPy, durante a eletropolimerização, está atraindo um grande interesse como técnica de imobilização, devido à sua simplicidade e rapidez.

4.5.1. Oclusão em matrizes insolúveis em água

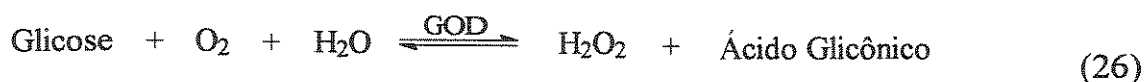
Neste caso, a enzima é dissolvida numa solução de monômero, polimerizada na presença de um agente catalisador, podendo também ser aprisionada em um colóide protetor como albumina, agarose ou dextrana, ou ainda dentro de fibras ocas. Deve-se evitar processos de polimerização exotérmicos para não desnaturar a enzima (Kobayashi e Laidler, 1973).

O polímero mais utilizado nesses processos é N, N' metilenobisacrilamida e é uma técnica rotineira nos laboratórios de bioquímica. Esta técnica apresenta a vantagem de não ser exotérmica (Moo-Young e Kobayashi, 1972). Pode-se citar ainda, como principal vantagem deste tipo de imobilização, o fato da enzima não envolver seus grupos ativos, com a totalidade da massa protéica sendo mantida dentro da rede do polímero.

5. BIOSSENSORES

Avanços em bio-eletroquímica têm permitido o uso de um grande número de procedimentos para a construção de dispositivos, nos quais comunicações eletrônicas entre o material do eletrodo e o biológico representam um importante papel (Khan, *et al.*, 1992; Lange e Chambers, 1985). Biomoléculas, especialmente enzimas capazes de catalisar reações redox (oxidoreductase), são atualmente muito usadas na fabricação de dispositivos bio-eletrônicos, tais como biossensores amperométricos (Begum *et al.*, 1993).

A idéia de utilizar uma enzima como um reagente aliada a um eletrodo foi introduzida em 1962 (Clark e Lyon, 1962), para a quantificação de glicose. A técnica é a mesma utilizada nos analisadores comerciais modernos, como o “Medidor de glicose ExacTech”, comercializado pela empresa americana MediScience Inc. Esses dispositivos baseiam-se na oxidação da glicose a ácido glicônico, envolvendo consumo de oxigênio e formação de peróxido de hidrogênio por ação da glicose oxidase (GOD), conforme a reação abaixo, Equação 26:



Embora seja possível medir a concentração de glicose, tanto pela quantificação do peróxido de hidrogênio produzido quanto pelo consumo do oxigênio (decréscimo na pressão parcial do gás), é esta última geralmente usada, através do eletrodo amperométrico de oxigênio.

Posteriormente estes dispositivos receberam a denominação de “Eletrodos Enzimáticos” (Updike e Hicks, 1971). Contudo, com o desenvolvimento intensivo na busca de novos sensores físico-químicos, em especial, utilizando-se de reações enzimáticas variadas, foi introduzido um termo mais genérico e abrangente, o de “Biossensor”.

Assim, biossensor é um dispositivo constituído de um elemento biológico, (como tecidos, células, organelas, enzimas/co-fatores, anticorpos, ácidos nucleicos entre outros) com alguma propriedade capaz de quantificar uma determinada espécie orgânica ou inorgânica, e um elemento transdutor capaz de converter a resposta química em um sinal apropriado, podendo ser potenciométrico, amperométrico, condutométrico, óptico, calorimétrico (entalpimétrico), entre outros (Silva, 1991).

Desenvolvidos em ambientes acadêmicos há cerca de trinta anos, os biossensores enzimáticos prestam-se atualmente a elevado número de determinações analíticas, em particular análise clínicas. A Figura 12 mostra o diagrama representativo de um dispositivo biossensor.

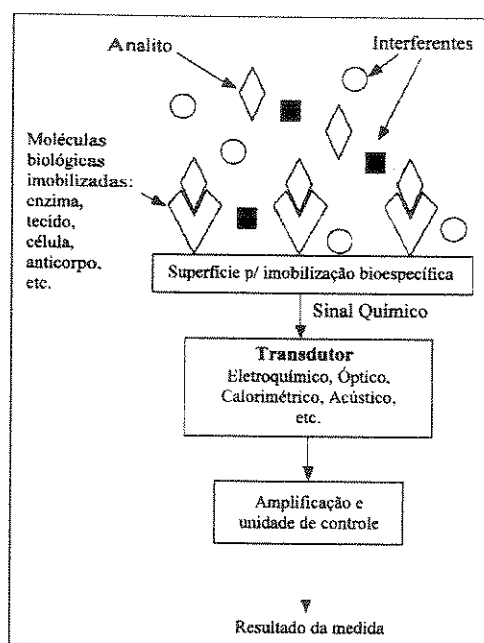


Figura 12 - Diagrama de um dispositivo biossensor (Scouten *et al.*, 1995).

O emprego industrial dos biossensores tende a crescer, em particular nas indústrias de alimentos e demais setores envolvidos, o que inclui a indústria farmacêutica (antibióticos) e o setor sucroalcooleiro.

5.1. Características dos biossensores

As características mais importantes num biossensor são: a estabilidade, o tempo de resposta e a sensibilidade (Guilbault, 1984).

5.1.1. Estabilidade

Alguns dos fatores que afetam a estabilidade de um biossensor estão listadas na Tabela 3.

Tabela 3 - Fatores que afetam a estabilidade de um biossensor.

Tipo de imobilização
Quantidade e pureza da enzima.
Condições ótimas.
<u>Estabilidade do sensor base.</u>

5.1.1.1. Tipo de imobilização

Geralmente, um eletrodo com enzima solúvel, é usado por cerca de uma semana com 25 a 50 determinações, sendo o eletrodo acondicionado sob refrigeração quando fora de uso.

Os eletrodos com enzimas imobilizadas fisicamente são estáveis por mais tempo, atingindo algumas vezes, três a quatro semanas ou cerca de 100 determinações, dependendo do grau de cuidado na preparação do polímero.

Os eletrodos com enzimas imobilizadas por métodos químicos apresentam-se mais estáveis com vida útil maior, devido às ligações mais efetivas entre as enzimas e os suportes diminuindo a lixiviação da camada enzimática.

5.1.1.2. Quantidade e pureza da enzima

A estabilidade aumenta com a espessura da camada enzimática, porém o tempo de resposta também aumenta. Há uma quantidade crítica de enzima necessária para cada biossensor. As vezes, é mais vantajoso aumentar a quantidade de enzima, principalmente quando esta não é purificada. Deve-se também ter em mente que quanto mais espessa a camada de enzima, mais difícil a difusão dos íons gerados no meio reacional até a membrana sensora.

5.1.1.3. Condições ótimas

As condições operacionais mais adequadas devem ser estudadas para otimizar-se a determinação analítica tais como pH, temperatura, tampão e força iônica da solução, concentração do substrato, entre outras.

5.1.1.4. Estabilidade do sensor base

A estabilidade do biossensor também depende do sensor base. Em muitos casos esse não é o fator mais importante quando o sensor tem uma estabilidade maior do que a enzima, porém isto deve ser considerado quando se usa eletrodos com tempo de vida curto, como por exemplo os de membrana líquida.

Um outro fato importante na estabilidade das enzimas está relacionado ao efeito Zúlu (Trevan, 1980), ou seja, durante o processo de imobilização uma grande quantidade de enzima é imobilizada, porém apenas uma fração da mesma é utilizada para a catálise da reação com o substrato. E, mesmo que uma parte dessa enzima seja perdida por desnaturação ou por variações no pH, sempre existirá uma fração de enzima pronta para reagir com o substrato, até se atingir um estágio onde toda a enzima seja inativada.

5.1.2. Tempo de resposta

Existem alguns fatores que afetam o tempo de resposta de um biossensor, conforme ilustra a Tabela 4.

Tabela 4 - Fatores que afetam o tempo de resposta de um biossensor.

Velocidade de agitação da solução

Concentração do substrato

Concentração da enzima

pH ótimo

Temperatura

O tempo de resposta do sensor envolve a difusão do substrato através da membrana enzimática e a difusão do produto formado até a superfície do sensor base, quando é então monitorado.

5.1.2.1. Velocidade de agitação da solução

Quanto maior a velocidade de agitação, mais rapidamente o substrato se difunde até a superfície da membrana, onde poderá reagir.

5.1.2.2. Concentração do substrato

A velocidade da reação aumenta com o aumento da concentração do substrato, diminuindo o tempo de resposta, de acordo com o previsto pelo modelo de Michaelis-Menten.

5.1.2.3. Concentração da enzima

Um aumento na quantidade de enzima pode levar a um aumento no tempo de resposta do sensor. Isto se dá devido ao aumento na espessura da membrana, dificultando a difusão do substrato na membrana. É aconselhável a utilização de enzimas com alta atividade, permitindo a obtenção de membranas com enzima imobilizada, as mais finas possíveis.

5.1.2.4. pH ótimo

Cada enzima tem um pH ótimo, no qual ela é mais ativa, e uma faixa de pH onde existe uma certa reatividade. O pH ótimo de uma enzima imobilizada pode não ser o mesmo de uma enzima solúvel. Recomenda-se, geralmente, ajustar o pH atendendo às necessidades de enzima e não às do eletrodo base.

5.1.2.5. Temperatura

Pode-se prever um duplo efeito com o aumento da temperatura: aumento na velocidade de reação enzimática resultando num tempo de resposta mais rápido e uma mudança no potencial de equilíbrio em virtude do coeficiente de temperatura na equação de Nernst e Van't Hoff.

5.1.3. Sensibilidade

A sensibilidade de um biossensor depende diretamente da sensibilidade do sensor base utilizado.

Assim, deve-se não só escolher as condições operacionais adequadas para uma determinação analítica mas, principalmente, o tipo de transdutor que melhor desempenho possa fornecer, de acordo com o nível de concentração do analito.

6. FRUTOSE

A frutose, ou levulose, é um dos carboidratos mais importantes, existente na natureza.

Os carboidratos ou hidratos de carbono, principais substâncias produzidas durante o processo de fotossíntese, são os primeiros compostos formados na incorporação de carbono inorgânico, hidrogênio e energia nos seres vivos (Bennet e Frieden, 1966). Constituem os compostos orgânicos mais antigos conhecidos pelo homem, sendo um dos compostos mais importantes no metabolismo vegetal e animal. Apresentam-se como compostos carbonílicos polihidroxilados e são classificados segundo o número de átomos de carbono por molécula. Assim, cita-se os monossacarídeos, dissacarídeos e polissacarídeos (White *et al.*, 1954).

Os monossacarídeos são os açúcares mais simples e geralmente são apresentados com fórmula $C_nH_{2n}O_n$, onde n varia de 3 até 8 na maioria dos casos. São classificados de acordo com o número de átomos de carbono na cadeia e segundo a função carbonílica. Prefixos tri, tetra, etc., designam o número de carbonos por molécula; e o sufixo ose é designação geral do carboidratos. Desta forma, são citadas as trioses, tetroses, pentoses, hexoses, etc. As pentoses são amplamente distribuídas em todos os organismos e estão presentes como intermediários nas vias metabólicas e, ainda, como parte de moléculas mais complexas, tais como ácidos nucleicos e coenzimas (White *et al.*, 1954). As hexoses, são muito comuns nos organismos, desempenhando papéis fisiológicos de importância fundamental. A (+) glicose, de fórmula molecular $C_6H_{12}O_6$, é o monossacarídeo mais representativo.

Os oligossacarídeos são compostos por sub-unidades de monossacarídeos, contendo de dois a dez resíduos de monossacarídeos, ligados uns aos outros por um átomo de oxigênio que faz parte da ligação glicosídica (hidroxila de um açúcar e o carbono 1). Dependendo da configuração do carbono 1, a ligação glicosídica é chamada alfa ou beta. Sacarose e lactose são os oligossacarídeos mais comuns. A primeira, principalmente constituída de glicose e frutose, ocorre nas plantas que fazem fotossíntese e é obtida comercialmente a partir da cana-de-açúcar ou da beterraba (Meade e Chen, 1977).

Todos os monossacarídeos e a maioria dos dissacarídeos são oxidáveis pelos reagentes de Tollens, Benedict e Fehling, sendo denominados "açúcares redutores" (Hart e Fisher, 1971; Hangos-Mahr e Pungor, 1982). Para ser analisada como tal, a sacarose necessita de hidrólise prévia, que resulta em quantidades equimolares de D(+)glicose (dextrose) e D(-)frutose (levulose). Como esta hidrólise resulta em mudança no sinal de rotação óptica para valor negativo, a reação é denominada inversão da sacarose e à mistura resultante dá-se o nome de "açúcar invertido" (Meade e Chen, 1977).

Os polissacarídeos são carboidratos que, após hidrólise, fornecem um grande número de unidades de monossacarídeos e dissacarídeos por molécula. Diferem dos oligossacarídeos quanto ao comprimento da cadeia e complexidade estrutural associada às freqüentes ramificações das sub-unidades. A característica estrutural dos polissacarídeos é a repetição da unidade monossacarídica.

Antes os hidratos de carbono eram considerados apenas como energéticos, constituindo a fonte de energia, em estado de prontidão, para o organismo.

Os hidratos de carbono podem ser divididos, quanto ao seu comportamento fisiológico, em (Campos, 1964):

- ☛ Hidratos de carbono energéticos - glicose, levulose, maltose e seus fornecedores: sacarose e amido.

☞ Hidratos de carbono de estrutura - lactose, galactose, manose, xilose, arabinose, celebinose.

A função energética é, sem dúvida, a principal. Outros nutrientes, como os lipídios e as proteínas, têm também função energética, sendo os primeiros o principal reservatório de energia para o organismo. Entretanto, os hidratos de carbono, sob a forma de glicose e glicogênio, encontram-se no organismo em estado que lhes permite utilização imediata.

Os hidratos de carbono ingeridos transformam-se, no tubo digestivo, nos monossacarídeos: glicose, levulose e galactose. Dentre estes, a galactose é absorvida mais rapidamente, seguida da glicose e da levulose. A glicose é o monossacarídeo mais simples e mais utilizado pelo organismo. Os outros monossacarídeos, de um modo geral, transformam-se em glicose para a sua utilização.

A levulose, também conhecida como Frutose devido à sua grande ocorrência nos frutos, é um dos constituintes da sacarose e de outros açúcares, entre os quais a insulina. Pode ser metabolizada a CO_2 e H_2O ou transformada em glicose, no plasma sanguíneo, e em glicogênio, no fígado. O glicogênio hepático transforma-se novamente em glicose. No músculo, não há transformação da frutose em glicogênio. O intestino delgado também é capaz de transformar a frutose em glicose e em glicogênio.

Admite-se que a utilização da frutose não depende da insulina; por isso, alguns autores aconselham este açúcar como fonte de energia para os diabéticos (Chaves, 1969). A curva de tolerância da frutose está condicionada à capacidade do fígado em utilizá-la na síntese do glicogênio. Em algumas doenças do fígado, diminui a tolerância à frutose.

Quando injetada por via endovenosa, a frutose pode ser melhor utilizada pelos diabéticos do que a glicose.

Os hidratos de carbono de estrutura desempenham importantíssimo papel na ossificação, participando do metabolismo do cálcio. A galactose é constituinte de glicolípídeos existentes em muitos tecidos animais e vegetais, principalmente o tecido nervoso. É raramente encontrada livre na natureza. Existe nas cascas das sementes das leguminosas. A lactose tem papel na formação dos glóbulos vermelhos - processo indireto - e na absorção do ferro, favorecendo a síntese de hemoglobina. A ribose faz parte do ácido ribonucleico e do desoxirribonucleico, os quais representam parte do peso do núcleo celular e entram na estrutura dos cromossomos, gens e nucléolos (Chaves, 1969).

7. MÉTODOS PARA DETERMINAÇÃO DE FRUTOSE

Os principais métodos para determinação quantitativa de açúcares são fundamentados predominantemente nas reações utilizadas na sua identificação qualitativa (Stanek *et al.*, 1963). Os métodos qualitativos clássicos utilizam-se das propriedades redutoras dos açúcares e determinam os produtos da reação volumétrica ou gravimetricamente. Estas reações são baseadas, por exemplo, no poder redutor do grupo carbonílico, na quebra de ligação entre grupos glicólicos vicinais e ainda, nas reações coloridas dos produtos de degradação dos açúcares por ácidos minerais fortes.

Oxidação pelo íon cúprico é a base da grande maioria dos métodos para determinação de açúcares redutores e provavelmente nenhum outro terá sido utilizado com tantas modificações (Stanek *et al.*, 1963). Os reagentes utilizados nessas propostas baseiam-se na formação de complexos de cobre divalente com ácidos orgânicos, principalmente tartárico e cítrico. O mais conhecido deles é a solução de Fehling, constituída por duas soluções, uma de sulfato de cobre e outra de tartarato duplo de sódio e potássio (Dunsmore *et al.*, 1980).

Os métodos baseados na oxidação pelos íons cobre podem ser divididos em dois grupos:

O primeiro, também conhecido como o método recomendado para quantificação de frutose, baseia-se na redução completa de um volume medido da solução de Fehling e do açúcar em investigação. O final da reação é monitorado por um componente adequado, como por exemplo, azul de metileno, o qual é descolorido por um excesso de açúcar após a redução completa dos íons Cu^{2+} (Lane e Eynon, 1923). O final da titulação também pode ser indicado potenciometricamente (Stanek *et al.*, 1963).

O segundo, baseia-se na determinação de óxido cuproso após sua filtração da mistura de reação, quando a redução está completa. Esta determinação pode ser efetuada por diferentes formas: gravimetricamente, eletroliticamente, pela dissolução em ácido nítrico com posterior quantificação colorimétrica do complexo formado pela adição de etilenodiamina ou pela determinação dos íons Fe^{2+} produzidos com permanganato (Bertrand, 1906; Stanek *et al.*, 1963).

Certos métodos prescindem da separação do precipitado formado e o óxido cuproso é dissolvido num excesso de solução de fosfomolibdato e medindo a intensidade da cor azul formada (Somogyi, 1945).

Um outro método utilizado baseia-se na redução do íon hexacianoferrato(III) a hexacianoferrato(II), onde é medido o decréscimo da coloração do íon hexacianoferrato(III), devido à formação do hexacianoferrato(II), que é incolor (Tanimoto e Burr, 1964).

A determinação espectrofotométrica de açúcares redutores empregando compostos nitro-aromáticos foi apresentada em 1981 (Soloniewicz e Teodorczyk, 1981). A frutose também é freqüentemente quantificada através de cromatografia líquida (Vidal-Valverde, *et al.*, 1985).

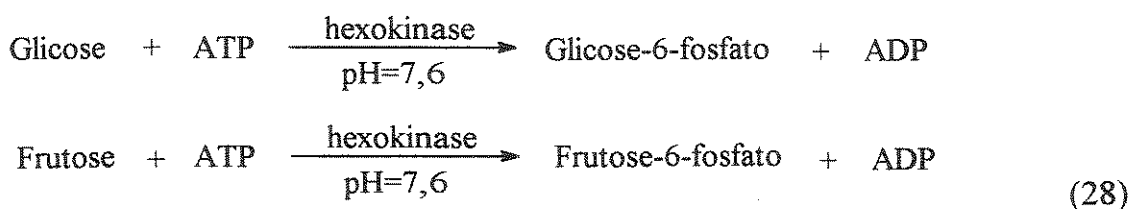
Outros métodos também utilizados em análise de açúcares são fundamentados, por exemplo, na rotação do plano da luz polarizada, na viscosidade, na pressão osmótica e no índice de refração. E os métodos enzimáticos, em função da alta seletividade entre outras características, têm sido muito utilizados especialmente em propostas automatizadas (Matsumoto *et al.*, 1986; Matsumoto *et al.*, 1988 e Ikeda *et al.*, 1990).

Dentre os métodos enzimáticos tradicionais para quantificação de açúcares, dentre eles a frutose, destaca-se o proposto por Bergmeyer, que faz uso das enzimas: β -frutosidase (invertase), fosfoglicose isomerase e glicose-6-fosfatodehidrogenase, além das co-enzimas ATP e NADP (Bergmeyer *et al.*, 1974). Todos os açúcares fermentáveis são convertidos à glicose-6-fosfato e a concentração deste composto é equivalente à quantidade de NADPH. O aumento na absorbância, devido ao NADPH formado, é medido em um espectrofotômetro a 340 nm. As reações são as seguintes:

- A enzima β -frutosidase inverte a sacarose produzindo glicose e frutose.



- A enzima hexokinase fosforilada converte glicose e frutose à glicose-6-fosfato (G-6-P) e frutose-6-fosfato (F-6-P).



- Fosfoglicose isomerase (P-G-I) converte Frutose-6-fosfato à Glicose-6-fosfato.



- Glicose-6-fosfatodehidrogenase (G-6-P-DH) desidrata a glicose-6-fosfato a gluconato-6-fosfato.

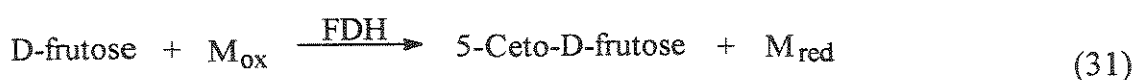


Apesar da medida espectrofotométrica ser relativamente fácil de ser feita, as reações para preparação das amostras são demoradas, tornando o método laborioso.

8. D-FRUTOSE 5-DEHIDROGENASE

A enzima d-frutose 5-dehidrogenase (FDH, EC 1.1.99.11) foi primeiramente descoberta em 1966 (Yamada *et al.*, 1966), a partir do *Gluconobacter cerius*. Eles confirmaram que a enzima catalisava a oxidação da D-frutose para 5-ceto-D-frutose. Ameyama *et al.*, 1981, relataram a purificação e as propriedades catalíticas e moleculares da FDH a partir do *Gluconobacter industrius*, e a possibilidade do uso desta enzima na quantificação de D-frutose.

A reação catalisada pela enzima é a seguinte:



onde M_{ox} e M_{red} são os aceptores de elétrons nas suas formas oxidada e reduzida, respectivamente. Estes aceptores podem ser: hexacianoferrato de potássio (III), metassulfato de fenazina ou 2,6-diclorofenol indofenol. NAD, NADH e o oxigênio são completamente inativos como aceptores de elétrons. A constante de Michaelis-Menten aparente, para esta enzima na determinação de D-frutose em pH 4,5, foi encontrada como sendo $10^{-2} \text{ molL}^{-1}$, com a enzima na forma purificada. Sua massa molecular foi calculado como sendo 140000 uma.

Em 1986, foi desenvolvido um sensor para análise em fluxo, em que D-frutose 5-dehidrogenase (FDH) foi imobilizada em filme de amino-celulose (Matsumoto *et al.*, 1986). O aceptor redox utilizado foi o hexacianoferrato (III); o aceptor na forma reduzida foi detectado eletroquimicamente através de uma cela de fluxo com eletrodo de platina. A FDH foi obtida a partir do *Gluconobacter industrius*. A faixa linear de utilização do biossensor foi de 2×10^{-5} a 2×10^{-3} molL⁻¹, com precisão de 1,8% para um total de 10 replicatas.

Em 1988, foi desenvolvido um sistema em fluxo para determinação de frutose, glicose e sacarose, utilizando uma configuração paralela de reatores com enzimas imobilizadas (Matsumoto *et al.*, 1988). O peróxido de hidrogênio produzido, pela glicose e sacarose, e o hexacianoferrato (II), pela frutose, foram monitorados amperometricamente. Interferência do ácido ascórbico foi eliminada com o uso de uma pré-coluna com ascorbato oxidase imobilizada em CNBr-Sefarose ativada. A faixa linear de utilização do biossensor foi de 2×10^{-5} a 1×10^{-3} molL⁻¹, com precisão de 1,8% para glicose e frutose, e 1,6% para sacarose, de um total de 10 replicatas.

Em 1990, a FDH foi imobilizada em um eletrodo de pasta de carbono (Ikeda *et al.*, 1990), recoberto com uma membrana de diálise, o mediador utilizado foi a p-benzoquinona. Estudos de pH foram efetuados, encontrando um pH ótimo para o biossensor em torno de 4,5; a faixa linear encontrada foi de 0,2 a 1,0 mmolL⁻¹, a repetibilidade das medidas foi de 5,1% (n=10), com tempo de resposta de 1 min. Testes de possíveis interferentes mostraram que apenas o ácido ascórbico é interferente em potencial, sendo sua eliminação feita com auxílio da enzima ascorbato oxidase. As determinações amperométricas foram executadas a um potencial de 500 mV vs. Ag/AgCl. Este biossensor foi utilizado para quantificação de frutose em amostras de frutas.

Em 1993, foi apresentado um biossensor para frutose onde a enzima FDH estava imobilizada em um filme de polipirrol utilizando uma mistura de tetratiafulvaleno (TTF) e tetracianoquinodimetano (TCNQ) como mediador. A

faixa linear deste biossensor foi de 0,2 a 10 mmolL⁻¹, com pH ótimo de 4,5; exibindo um coeficiente de variação de 4% (n=10). O tempo de resposta para este biossensor foi de aproximadamente 20 s. (Begum *et al.*, 1993).

9. JUSTIFICATIVA

A necessidade da determinação de açúcares em alimentos e fluidos biológicos tem crescido como resultado das exigências do controle de qualidade no processamento de alimentos e por razões médicas para controle de doenças cardiovasculares e diabéticas, respectivamente (Marble, 1971; Shaw, 1980). Isto tem levado ao desenvolvimento de vários métodos para a determinação de diferentes açúcares, tais como glicose e frutose.

Várias técnicas analíticas como a volumetria (Wang e Naser, 1994), polarimetria (Begum *et al.*, 1993), cromatografia gás-líquido (Meade e Chea, 1977; Maah e Sisler, 1975), colorimetria (Mateo *et al.*, 1987; Low e Spouns, 1988), análise enzimática (Abu-Lehia, 1987), espectrometria de ressonância nuclear magnética (Masoom e Townsend, 1985), fluorimetria (Csöregi, 1993), métodos de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) (Lowman e Maciel, 1979; Mopper *et al.*, 1980) e métodos eletroquímicos (Hughes *et al.*, 1981; Hughes e Johnson, 1983; Wang e Taha, 1990; Beh *et al.*, 1989; Amine *et al.*, 1993) foram desenvolvidos para a determinação de açúcar em alimentos e sangue, porém são trabalhosos ou envolvem tempo relativamente longos. Recentemente, um grande interesse tem sido mostrado para análise de açúcar usando métodos eletroquímicos, devido a possibilidade de análise *in vivo* com a utilização de implantes de eletrodos em diabéticos.

O desenvolvimento de vários biossensores em química clínica e indústria de sucos tem sido apresentado (Turner *et al.*, 1987; Lowe, 1985). Nos últimos anos, vários sensores para mono e dissacarídeos foram construídos, porém existem poucos trabalhos sobre sensores para frutose, apesar desta ter maior poder adoçante

que a glicose e a sacarose, ser amplamente distribuída em frutas e vegetais e ser geralmente usada em adoçantes dietéticos. Uma razão para o pequeno número de trabalhos está relacionada ao fato de que para a determinação de frutose há a necessidade de três tipos de enzimas (hexokinase, EC 2.7.1.1; fosfoglicose isomerase, EC 5.1.3.9 e glicose-6-fosfato dehidrogenase, EC 1.1.1.49) e duas coenzimas (ATP e NADP), o que aumenta o custo da análise e a torna laboriosa.

10. OBJETIVO

Conforme descrito acima, há uma carência de métodos analíticos confiáveis e simples para determinação de frutose. Por isso, dentro da linha de pesquisa de eletroanalítica do IQ/UNICAMP, resolveu-se construir, avaliar e aplicar um biossensor para frutose, utilizando a enzima d-frutose 5-dehidrogenase, imobilizada em eletrodos de pasta de carbono e de filme de polipirrol, sem a necessidade de tratamento elaborado das amostras reais.

CAPÍTULO II

PARTE EXPERIMENTAL

1. REAGENTES E APARELHAGEM

1.1. Reagentes

A enzima d-Fructose 5-dehidrogenase (E.C. 1.1.99.11) foi adquirida da Sigma Chemical Co., grafite em pó, 99,9% da Fluka; pirrol da Aldrich com 98% de pureza, D-frutose Sigma 99%; nujol, azul de meldola da Sigma.

Para a destilação do pirrol foi utilizado um sistema de destilação em refluxo.

O tampão utilizado para a eletropolimerização do pirrol foi o Piperazina-N-N'-bis-2 Etanosulfônico (PIPES, $C_8H_{18}N_2O_6S_2$) da Sigma, e para as medidas eletroquímicas o McIlvaine ($0,2 \text{ mmol L}^{-1}$ de Na_2HPO_4 e $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$ de ácido cítrico).

As amostras de geléia de fruta e adoçante dietético foram obtidas em supermercado local.

Os demais produtos químicos usados foram de grau analítico e suas soluções preparadas com água destilada e desionizada. Todas as análises foram realizadas à temperatura de 25°C .

1.2. Aparelhagem

Um potenciostato PGSTAT20 Eco Chemie, interfaceado a um microcomputador para aquisição dos dados, foi utilizado nas medidas eletroquímicas, como mostrado na Figura 13.

Um espectrofotômetro Pharmacia Biotech, modelo Ultrospec 2000, foi usado para as medidas espectrofotométricas.

Foram utilizados pH-metro Radelkis modelo OP-217 e eletrodo de vidro combinado com referência de Ag/AgCl Radelkis OP-0808, para o ajuste de pH das soluções.

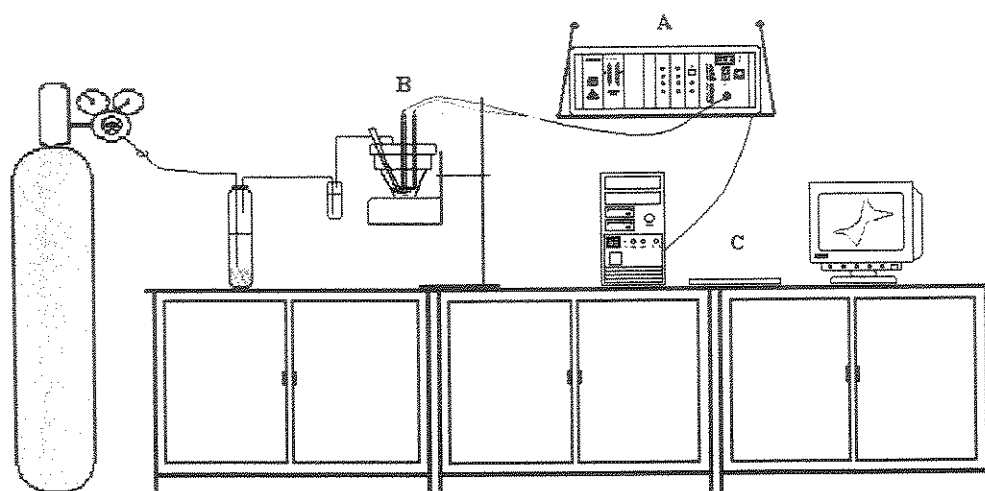


Figura 13 - Esquema da aparelhagem utilizada nas medidas eletroquímicas; A-Potenciostato, B-Cela eletroquímica de três eletrodos e C-Sistema de aquisição de dados.

Um aparelho de ultra-som, marca Throrion B7, foi utilizado para auxiliar a remoção de partículas das superfícies dos eletrodos.

2. BIOSSENSOR PARA FRUTOSE COM ENZIMA IMOBILIZADA EM ELETRODO DE PASTA DE CARBONO

2.1. Preparação da sílica titânio/fosfato

O procedimento para enxertar óxido de titânio (IV) e fosfato na superfície da sílica gel foi descrito por Kubota *et al.*, 1991. A imobilização do azul de meldola foi realizada por imersão de aproximadamente 2 g de sílica titânio/fosfato (STF) em 20 mL de uma solução aquosa de 0,5% (m/v) do corante. A mistura foi agitada por 10 minutos e o sólido foi filtrado, lavado e seco a vácuo em

temperatura ambiente. A quantidade do mediador imobilizado, foi determinado por análise elementar. Este material foi denominado de sílica titânio/fosfato/meldola (STFM).

2.1.1. Preparação da pasta de carbono

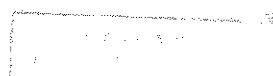
A pasta foi preparada pela homogeneização de 100 mg de grafite (Fluka), 100 mg de STFM, 20 mg de FDH (Sigma) e algumas gotas de óleo mineral (Nujol). Essa pasta foi acondicionada em recipiente escuro e conservada sob refrigeração (-15°C), quando não em uso, e passou-se a chamar, sílica titânio/fosfato/meldola/enzima (STFMEz).

2.1.2. Construção do biossensor para frutose a partir da sílica modificada

A técnica de imobilização empregada na construção desse biossensor foi a de adsorção, onde aproximadamente 5 mg da pasta STFMEz, foi colocada na cavidade de um eletrodo de platina previamente preparado.

O eletrodo consistiu de um tubo de vidro com 4 mm de diâmetro, tendo na parte inferior uma lâmina de platina, em forma de disco, soldada a este formando uma cavidade com 1 mm de profundidade.

O contato elétrico entre o disco e o terminal do eletrodo foi feito com um fio de níquel-crômio, como mostrado na Figura 14. Esta disposição permite uma melhor reprodutibilidade na quantidade de pasta usada, nos diferentes estudos.



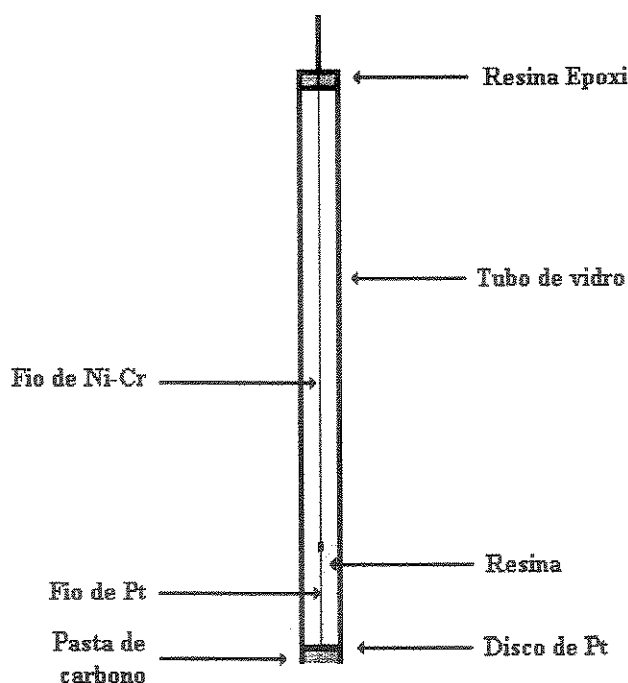


Figura 14 - Esquema do eletrodo de pasta de carbono.

O biossensor foi armazenado em tampão, pH 4,5 a 5 °C, quando não em uso.

3. BIOSSENSOR PARA FRUTOSE COM ENZIMA IMOBILIZADA EM FILME DE POLIPIRROL SOBRE ELETRODO DE PLATINA

3.1. Limpeza do eletrodo base de platina

A limpeza da superfície do eletrodo base foi feita em três etapas: a primeira foi um polimento manual, com movimentos circulares em uma superfície plana, recoberta por uma flanela embebida com suspensão de alumina 1,0 μ . Após esta etapa, seguiu-se o polimento com alumina 0,3 μ ; e por último o eletrodo base foi lavado diversas vezes com água desionizada.

O polimento é necessário para prevenir a formação de imperfeições na superfície do eletrodo. A verificação da limpeza da superfície do eletrodo foi

acompanhada através de voltametria cíclica, como pode ser observada na Figura 15.

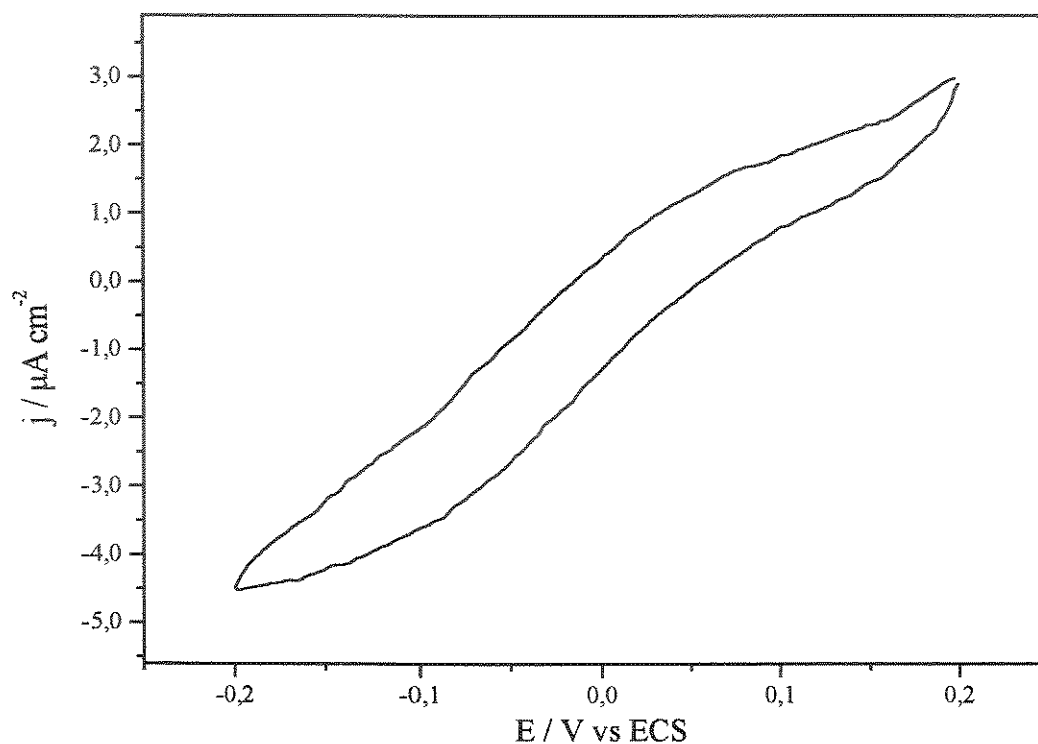


Figura 15 - Voltamograma cíclico mostrando a limpeza do eletrodo base de platina. Solução tampão McIlvaine pH 4,5; velocidade de varredura de 20 mVs^{-1} .

3.2. Eletropolimerização do filme de polipirrol

Após limpeza do eletrodo base, este foi colocado em uma cela eletroquímica contendo 5 mL de solução tampão PIPES $0,1 \text{ molL}^{-1}$ (pH 6,8), como tampão biocompatível; contendo: $0,1 \text{ mmolL}^{-1}$ de pirrol recém destilado; $0,1 \text{ mmolL}^{-1}$ de NaClO_4 ; $0,1 \text{ mmolL}^{-1}$ de $\text{Na}_4\text{Fe}[\text{CN}]_6$, como mediador de elétrons e $0,001 \text{ mg mL}^{-1}$ de dodecil sulfato de sódio. Esta solução foi desoxigenada por 10 minutos, e o sistema mantido em atmosfera de nitrogênio.

Aplicou-se um potencial de 720 mV vs ECS por 80 segundos, monitorando-se a corrente em função do tempo

3.3. Imobilização da enzima

A imobilização da enzima foi realizada por oclusão, após comprovação da incorporação do mediador, ferricianeto, no filme de polipirrol. Adicionaram-se 25 unidades da enzima FDH à mesma solução utilizada para formação do filme de polipirrol, em seguida aplicou-se potencial de 720 mV por mais 80 segundos, formando assim um o sistema filme/enzima-filme

Após formação da nova camada de filme, o mesmo foi lavado com água desionizada para retirada do excesso de dopante não adsorvido (hexaciano ferrato). A incorporação do mediador foi monitorada por voltametria cíclica, em solução tampão McIlvaine pH 4,5; em uma faixa de potencial entre -100 a 400 mV, com velocidade de varredura de 20 mVs⁻¹.

4. BIOSSENSOR PARA FRUTOSE COM ENZIMA IMOBILIZADA EM GLUTARALDEÍDO, SOBRE ELETRODO DE PLATINA MODIFICADO COM FILME DE POLIPIRROL

4.1. Limpeza do eletrodo base

A limpeza do eletrodo base foi realizada conforme descrito no item 3.1.

4.2. Eletropolimerização do filme de polipirrol

A eletropolimerização do filme de polipirrol foi realizada de forma semelhante à descrita no item 3.2.

Após formação do filme, o mesmo foi lavado com água desionizada, para retirada do excesso de dopante não adsorvido. A incorporação do mediador foi monitorada por voltametria cíclica, em solução tampão McIlvaine pH 4,5; em uma faixa de potencial entre -100 a 400 mV, com velocidade de varredura de 20 mVs⁻¹.

4.3. Imobilização da enzima

Após comprovada a incorporação do ferricianeto, a imobilização enzimática foi realizada sobre o filme de polipirrol, pela técnica da ligação covalente cruzada. Para isso, misturou-se 25 μL de glutaraldeído 5% v/v, 10 μL de solução de soro albumina 10% m/v, 5 μL da enzima (1 unidade/ μL) e 25 μL de tampão McIlvaine. A solução foi cuidadosamente homogeneizada e desta retirou-se uma alíquota de 50 μL e gotejou-se na superfície do eletrodo de platina modificado com filme de polipirrol. O biossensor foi deixado em repouso para evaporação do solvente e completar a reação entre o glutaraldeído e a enzima. Após secagem, o biossensor foi mergulhado em uma solução de glicina para retirada do excesso de glutaraldeído.

5. MEDIDAS ELETROQUÍMICAS

As medidas foram realizadas a 25 °C em célula eletroquímica de três eletrodos, Figura 16, com solução tampão McIlvaine, pH 4,5, sob agitação magnética. Todos os potenciais foram medidos contra um eletrodo de calomelano saturado, e como contra eletrodo foi utilizado um fio de platina em forma de espiral.

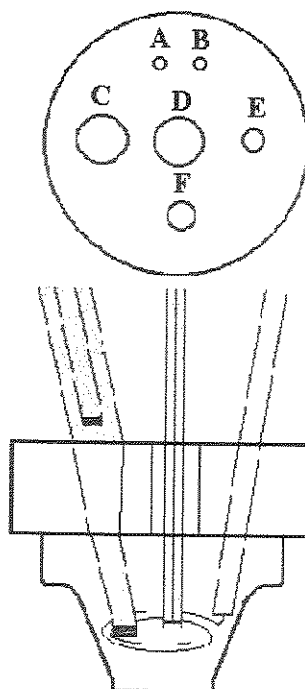


Figura 16 - Esquema da cela eletroquímica utilizada nas medidas eletroquímicas. A-entrada de N_2 , B-saída de gás, C-eletrodo de referência, D-eletrodo de trabalho, E-contrá eletrodo e F-entrada da amostra.

6. PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS

Todas as amostras utilizadas passaram apenas por um processo simples de diluição, levando-as até a faixa linear de utilização do biossensor, sem a necessidade de efetuar tratamentos elaborados das mesmas.

Todas as diluições foram feitas com solução tampão McIlvaine pH=4,5. As quantificações foram efetuadas em triplicatas.

7. MÉTODO PADRÃO UTILIZADO PARA DETERMINAÇÃO DE FRUTOSE

O método padrão usado para micro-determinação enzimática de frutose foi o método espectrofotométrico padrão (Wood *et al.*, 1962), que utiliza o ferricianeto como aceptor de elétrons, com algumas modificações.

Este método é baseado na velocidade de redução inicial. Quando o método é calibrado, usando as velocidades obtidas com os padrões, as velocidades com soluções desconhecidas fornecem a quantidade de substrato presente. Uma unidade de atividade enzimática é definida como a quantidade de enzima que catalisa a oxidação de 1 μmol de substrato por minuto, sob as condições de análise.

O procedimento experimental é descrito a seguir:

À mistura reacional contendo 0,5 mL do tampão McIlvaine, pH 4,5; 5 μL da enzima (1 unidade/ μL); solução padrão de frutose e triton X-100 (0,1 % em relação ao volume final), foi pré-incubada por 5 minutos a uma temperatura de 25 °C, após o que iniciou-se a reação com a adição de 0,1 mL de ferricianeto de potássio (0,1 molL^{-1} em água desionizada). A reação é interrompida com a adição de 0,5 mL do reagente sulfato férrico-Dupanol (5g $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot n\text{H}_2\text{O}$, 3g de lauril sulfato de sódio, 95 mL de ácido fosfórico 85%, completando a solução com água desionizada até um litro) a essa solução adicionou-se 3,5 mL de água. A concentração do complexo azul da Prússia é monitorada espectrofotometricamente 660 nm, após período de incubação de 20 minutos, a 25 °C.

8. CÁLCULO DO K_m DA ENZIMA FDH

Quando uma enzima é imobilizada observa-se um aumento no valor da constante de Michaelis-Menten. Este aumento é, provavelmente, devido à carga no substrato e no suporte, efeito de diluição e mudança na conformação terciária.

Para o biossensor com sílica gel, a constante de Michaelis-Menten foi calculada com o auxílio do gráfico de Lineweaver-Burk, Figura 17, onde foi plotado o inverso da concentração do substrato versus o inverso da velocidade inicial.

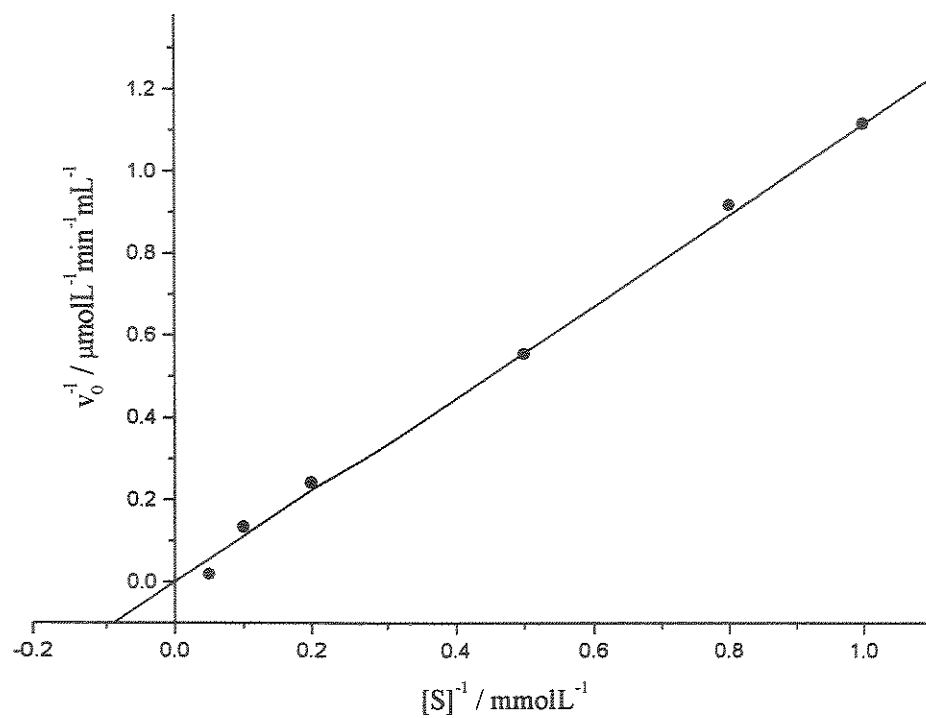


Figura 17 - Cálculo experimental da K_m da FDH

Os resultados obtidos para a enzima FDH são: $K_m = 12,0 \text{ mmolL}^{-1}$ e $V_{\max} = 105,9 \mu\text{molL}^{-1}\text{min}^{-1}\text{mL}^{-1}$.

CAPÍTULO III

RESULTADOS E DISCUSSÃO

1. ENZIMA IMOBILIZADA EM ELETRODO DE PASTA DE CARBONO MODIFICADO COM AZUL DE MELDOLA EM SÍLICA GEL RECOBERTA COM FOSFATO DE TITÂNIO

O mecanismo envolvido consiste na redução da enzima pelo substrato e a conseqüente oxidação da enzima pelo mediador de elétrons, azul de meldola, sendo que a oxidação deste é realizada eletroquimicamente, como esquematizado na Figura 18.

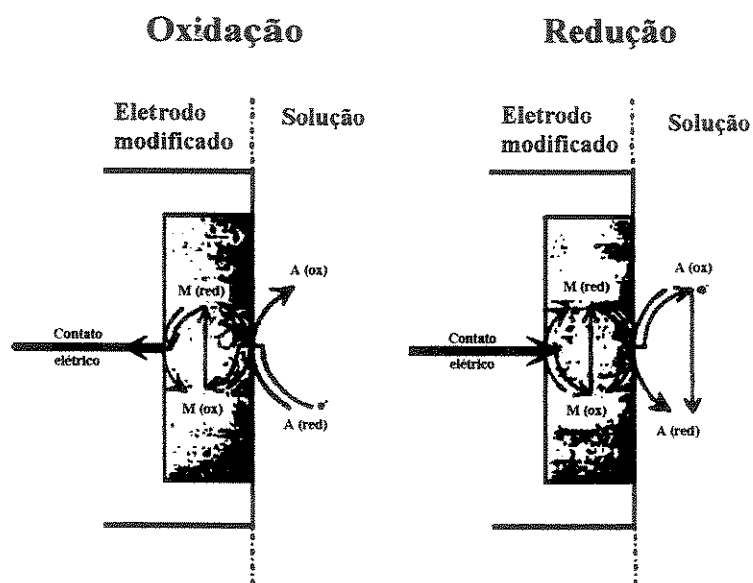


Figura 18 - Esquema do mecanismo de reação em um eletrodo modificado de pasta de carbono; M-mediador; A-analito; red-forma reduzida; ox-forma oxidada (Kalcher, 1995).

A transferência eletrônica direta entre enzima e o eletrodo não ocorre com eficiência, entretanto, o processo torna-se rápido e eficiente quando se emprega um mediador de elétrons (Gorton *et al.*, 1991).

1.1. Propriedades redox da STF

O primeiro passo na construção do biossensor foi a verificação do comportamento eletroquímico da pasta de carbono, preparada com STF, STFM e STFMEz, que foi realizado através da técnica de voltametria cíclica. As medidas eletroquímicas, nos diferentes tipos de pastas, foram realizadas em uma faixa de potencial de -200 a 200 mV, Figura 19.

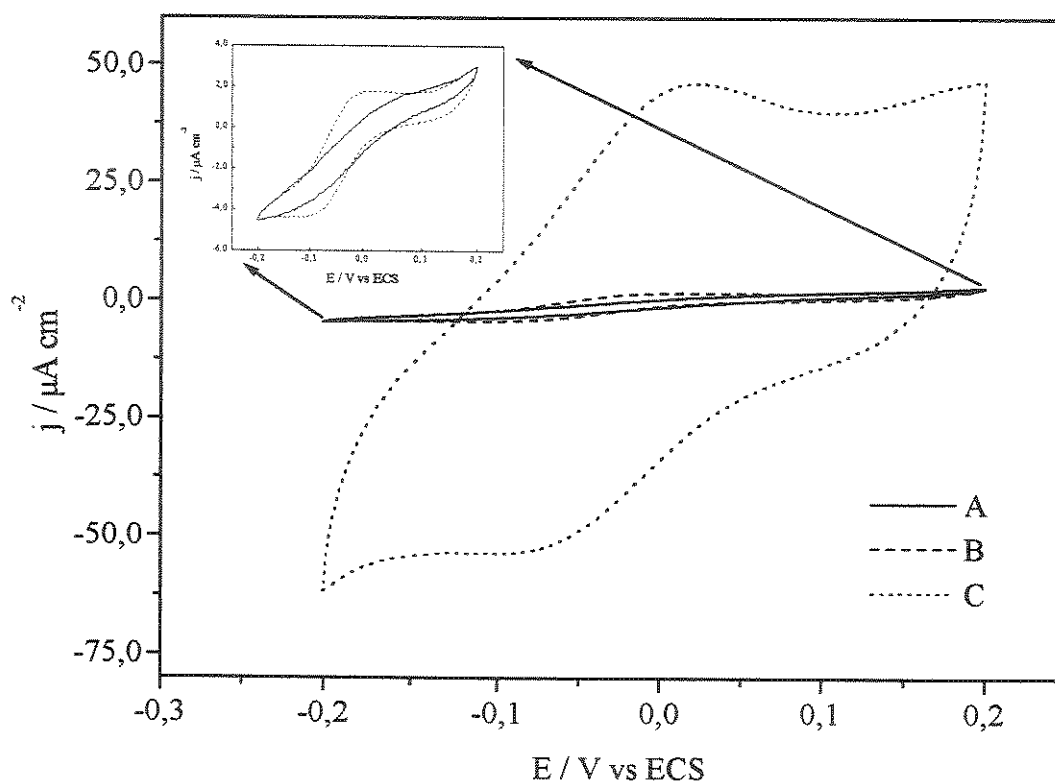


Figura 19 - Voltamograma cíclico obtido com eletrodo de pasta de carbono a 20 mV s^{-1} , em solução tampão McIlvaine a pH 4,5: (A) STF; (B) STFM e (C) STFMEz (d-frutose 5-dehidrogenase).

Neste gráfico, é mostrado o voltamograma cíclico (A), obtido quando a pasta foi preparada com apenas STF. Pode-se verificar que nesta faixa de potencial não apresenta nenhum pico de corrente, mostrando que as espécies eletroativas não estão presentes.

Quando a pasta de carbono contendo a STFM em sua composição, foi submetida às mesmas condições voltamétricas, aparecem dois picos de corrente, um anódico e um catódico, como pode ser visto no voltamograma (B). A presença destes picos foi atribuída a oxidação e redução do azul de meldola.

O mesmo comportamento foi observado quando a pasta de carbono é preparada com STFMEz, como pode ser observado no voltamograma (C).

O aumento considerável do valor de corrente de pico, observada em relação à STFM, indica que houve um aumento da resistência à difusão de elétrons, causada pela incorporação da enzima na pasta.

1.2. Estudo da quantidade de enzima na pasta

A melhor proporção de enzima na pasta de grafite foi obtida variando-se a massa de enzima adicionada à pasta. Com o biossensor pronto, foram tirados voltamogramas cíclicos e medida a corrente de pico máxima. Um gráfico % enzima vs I_{pa} máxima foi então construído com esses valores. Através da Figura 20, observa-se que a proporção de 10% da enzima na pasta de grafite, fornece a melhor resposta do biossensor.

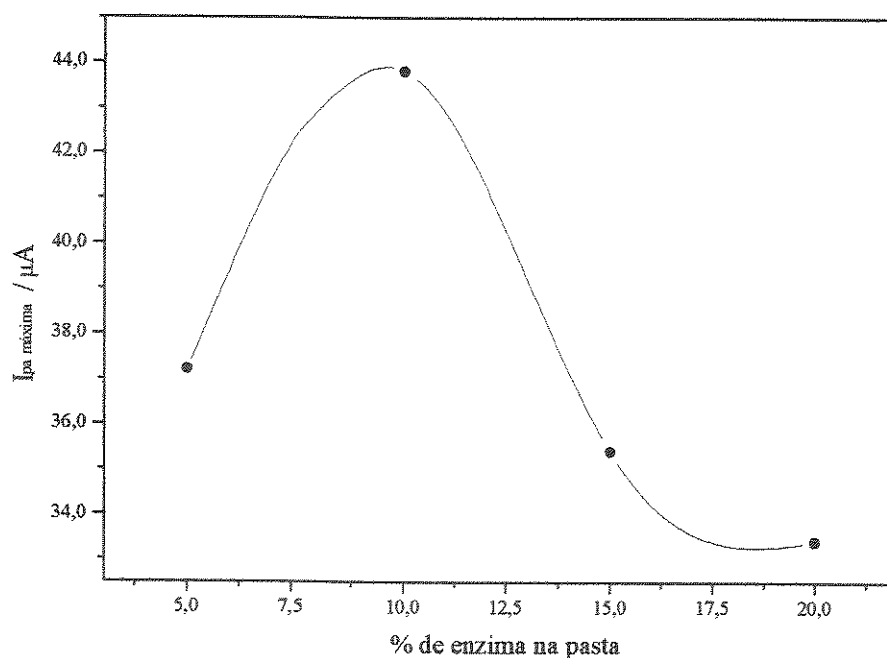


Figura 20 - Resposta do biossensor em função da porcentagem de enzima, obtida em tampão McIlvaine pH 4,5 a um potencial aplicado de 20 mV vs ECS e concentração de frutose de $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$.

Para quantidades inferiores a 10 % a corrente foi baixa, provavelmente, devido à quantidade de enzima não ser suficiente para reagir com todo substrato. Para quantidades superiores a este valor, a resistência à difusão dos elétrons torna-se muito alta dificultando a transferência de elétrons na pasta e, conseqüentemente, diminuindo a resposta do biossensor.

1.3. Efeito da concentração do eletrólito

A concentração do eletrólito de suporte também afeta significativamente o comportamento eletroquímico do sensor contendo STFM, imobilizado na sílica gel. Os voltamogramas mostrando a influência da concentração do eletrólito estão na Figura 21.

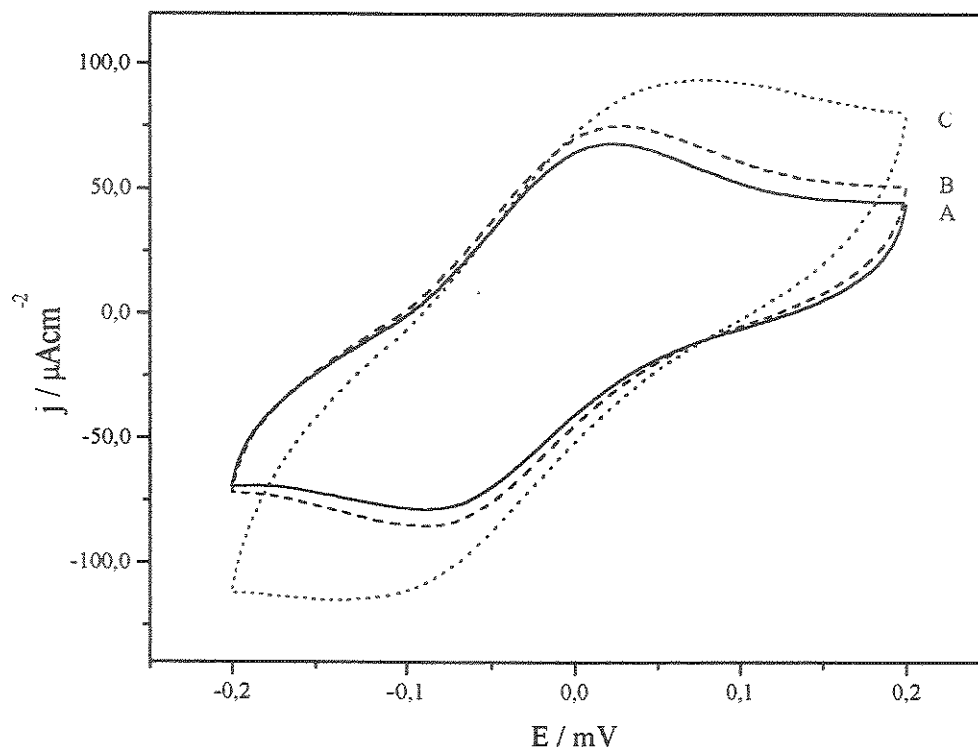


Figura 21 - Voltamogramas cíclicos obtidos em diferentes concentrações de eletrólito suporte McIlvaine. (A) $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$ de Na_2HPO_4 e $0,05 \text{ mmol L}^{-1}$ de ácido cítrico); (B) $0,2 \text{ mmol L}^{-1}$ de Na_2HPO_4 e $0,1 \text{ mmol L}^{-1}$ de ácido cítrico; e (C) $0,6 \text{ mmol L}^{-1}$ de Na_2HPO_4 e $0,3 \text{ mmol L}^{-1}$ de ácido cítrico. Velocidade de varredura de 20 mVs^{-1} , pH 4,5.

Observa-se aumento da corrente de pico como resultado do aumento da concentração do eletrólito, que pode ser atribuído ao aumento do agente de transporte de carga, promovendo uma compensação de carga do sistema.

1.4. Estabilidade do sensor

A estabilidade do sensor EPC (eletrodo de pasta de carbono) foi monitorada através de voltametria cíclica. Pelos valores de pico anódico e catódico, Tabela 5, pode-se afirmar que o sensor não sofre alterações nas propriedades eletroquímicas, durante as varreduras de potencial, de 200 ciclos consecutivos.

Tabela 5 - Dependência da corrente de pico para o mediador imobilizado em função do número de ciclos voltamétricos, eletrodo de pasta de carbono.

Número do ciclo*	I_{pa} (μA)	I_{pc} (μA)
1	7,6	-8,5
2	7,4	-8,4
10	7,4	-8,4
50	7,4	-8,3
100	7,3	-8,3
200	7,3	-8,3

*Tampão McIlvaine pH 4,5 e velocidade de varredura de 20 mVs⁻¹.

1.5. Propriedades eletroquímicas do biossensor

A atividade catalítica da enzima imobilizada, para oxidação da frutose, foi verificada pela corrente catalítica apresentada na resposta voltamétrica, quando o biossensor é colocado em um meio contendo frutose, como pode-se ver na Figura 22. Este comportamento evidencia que o biossensor eletrocatalisa a reação enzimática.

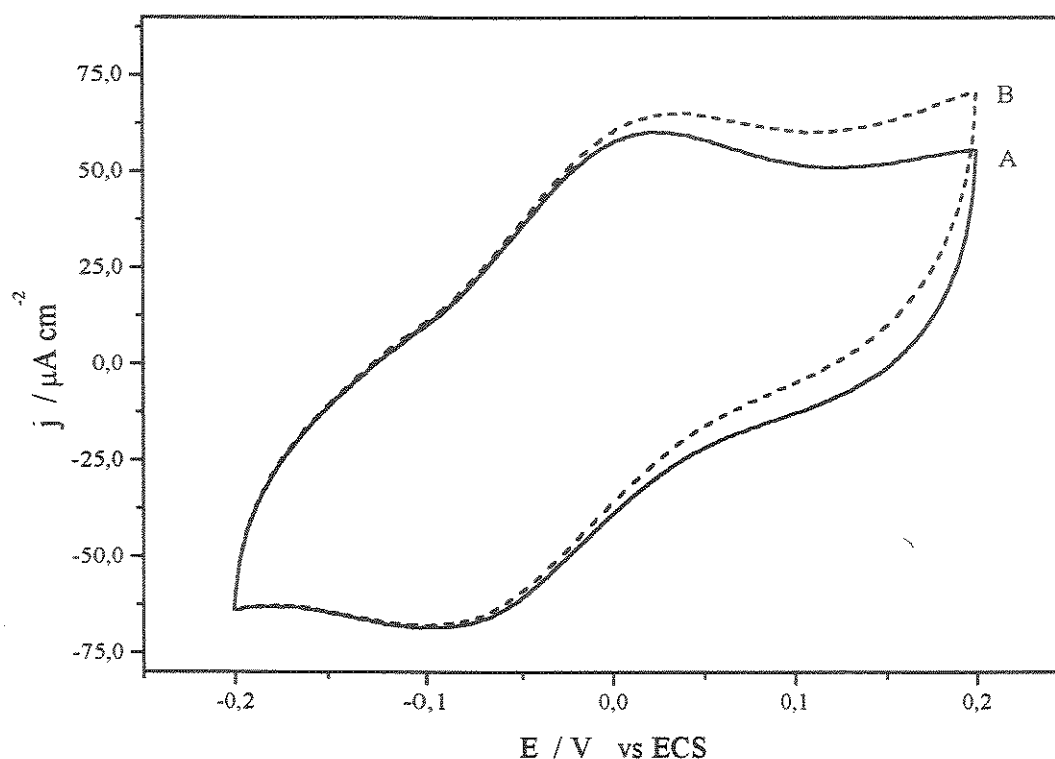


Figura 22 - Voltamograma cíclico obtido com o biossensor: (A) na ausência e (B) na presença de 10 mmol L^{-1} de frutose. Velocidade de varredura de 20 mV s^{-1} , em solução tampão McIlvaine pH 4,5.

1.6. Efeito do pH

A influência da concentração hidrogeniônica do meio foi igualmente estudada por voltametria cíclica, usando-se o mesmo biossensor em diferentes condições de pH. Como pode-se observar na Figura 23, o biossensor para frutose mostra uma melhor resposta máxima em pH 4,5; valor semelhante ao encontrado para atividade máxima da FDH solúvel (Yamada *et al.*, 1966).

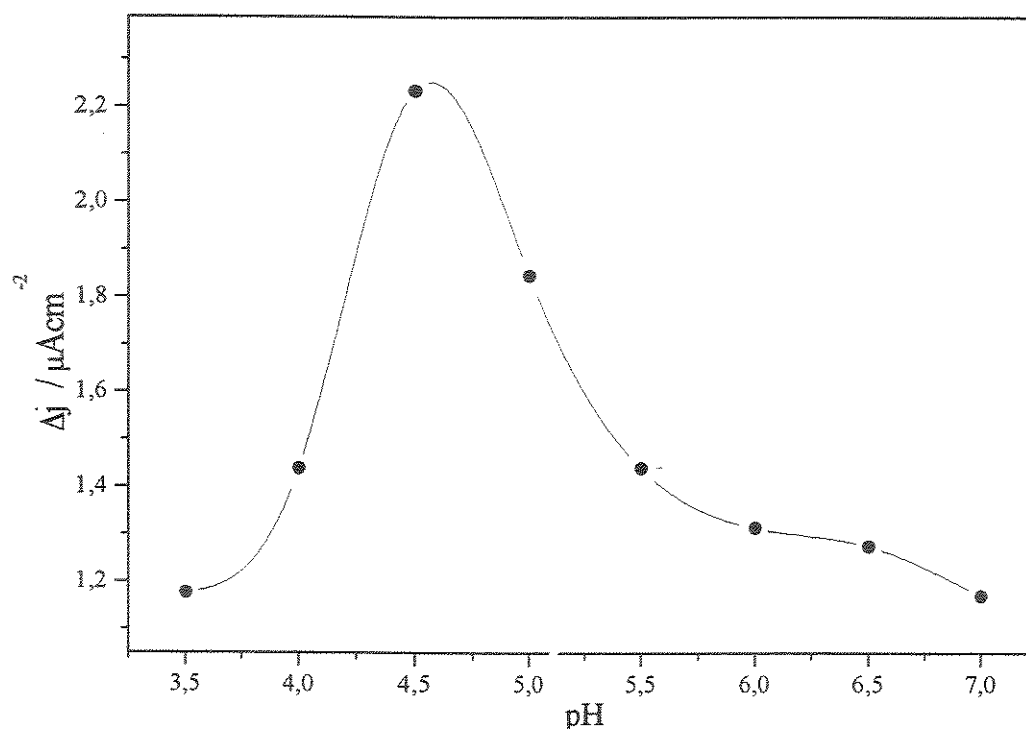


Figura 23 - Influência do pH na resposta do biossensor, obtida a um potencial aplicado de 20 mV vs ECS e concentração de frutose de 0,5 mmol L⁻¹.

Para valores de pH inferiores a 3,0 há desnaturação da enzima e para valores superiores a 7,0, o biossensor torna-se inativo, provavelmente, devido ao meio alcalino que afeta a atividade da enzima.

1.7. Tempo de resposta do biossensor

Como pode ser observado na Figura 24, o tempo de resposta foi de aproximadamente 6 segundos, ou seja, o tempo para a corrente alcançar o máximo. Este tempo foi muito pequeno quando comparado com o de outros biossensores descritos na literatura (Bremle *et al.*, 1991), cerca de 40 segundos.

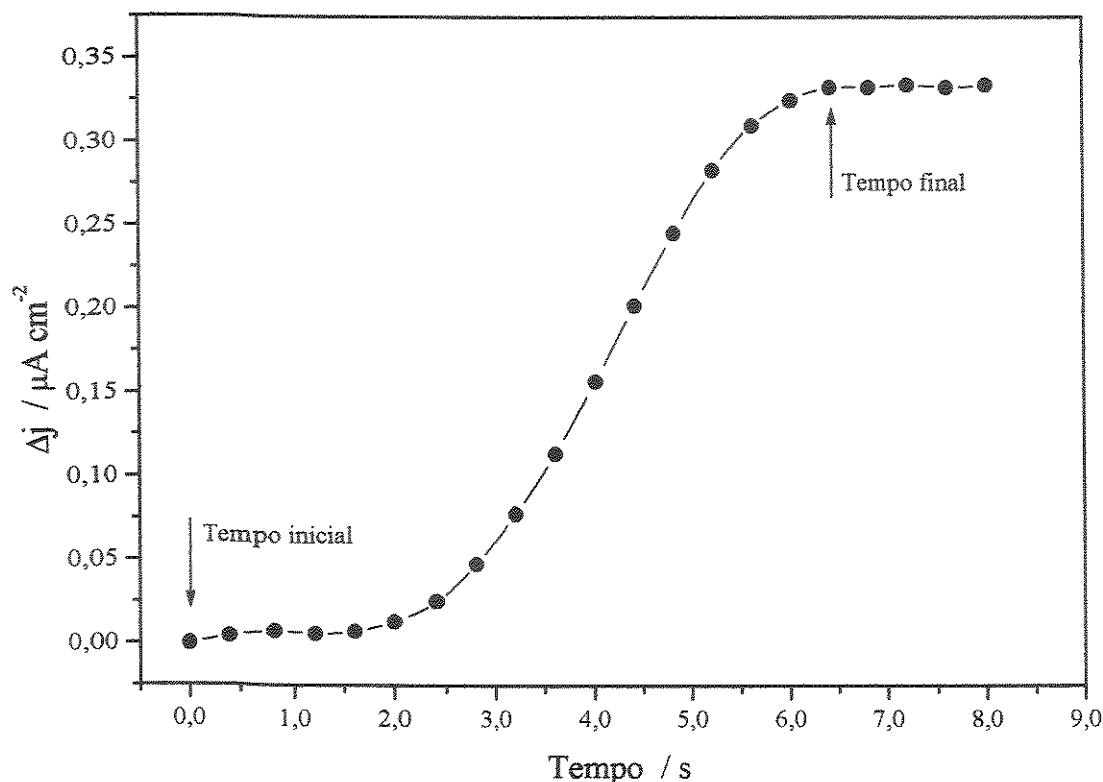


Figura 24 - Dependência da resposta do biossensor em função do tempo após adição do substrato. Potencial aplicado 20 mV vs ECS, concentração de frutose de 0,5 mmol L⁻¹, em 5,0 ml de solução tampão McIlvaine pH 4,5.

Considera-se o tempo inicial como sendo aquele onde a adição do substrato na cela eletroquímica é iniciada e tempo final como aquele onde a corrente faradáica do sistema se estabiliza.

1.8. Efeito do potencial aplicado

A Figura 25 mostra a influência do potencial aplicado na resposta do biossensor, observando-se que há um maior aumento da corrente em torno do potencial de pico, obtido através da voltametria cíclica da Figura 21, (20 mV vs ECS); porém, com o aumento do potencial, além do potencial de pico, seria esperado que a corrente continuasse aumentando, mas não é o que se observa. Isso

pode ser explicado por uma possível adsorção do produto da reação (5-ceto d-frutose) na superfície do eletrodo, já que esta possui uma carga negativa no pH utilizado. O potencial utilizado é suficientemente baixo para eliminar os problemas de interferentes tais como, ácido ascórbico, cisteína, etc (Fung e Mo, 1995) que normalmente estão presentes em amostras, principalmente biológicas.

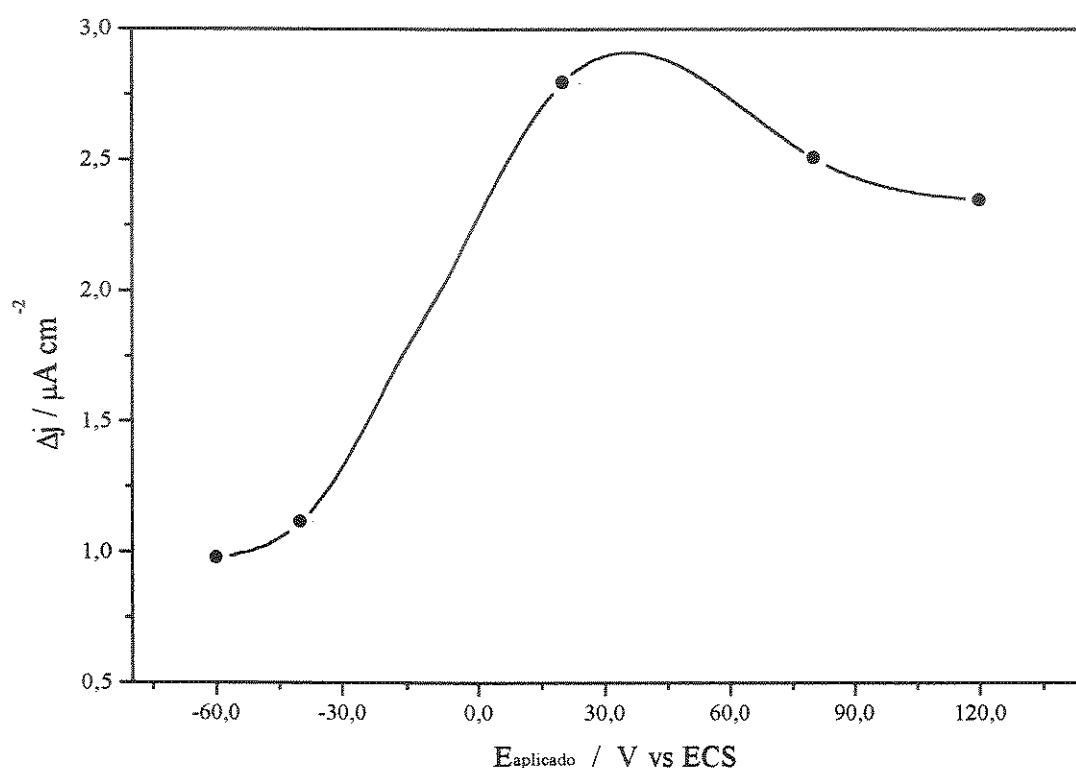


Figura 25 - Dependência da resposta do biossensor para frutose em relação ao potencial do eletrodo, obtido em tampão McIlvaine pH 4,5.

1.9. Limitação difusional

A Figura 26 mostra o efeito da velocidade de varredura, V , na resposta voltamétrica do azul de Meldola-EPC, com o sistema em repouso. Plotando-se a corrente de pico anódica (I_{pc}) vs velocidade de varredura (V), observa-se uma faixa linear, entre $20\text{-}100 \text{ mVs}^{-1}$ (características da adsorção do azul de Meldola nas partículas de sílica do eletrodo).

Uma possível explicação para isso, pode estar relacionada ao fato de que há uma resistência à difusão dos elétrons através da pasta de carbono.

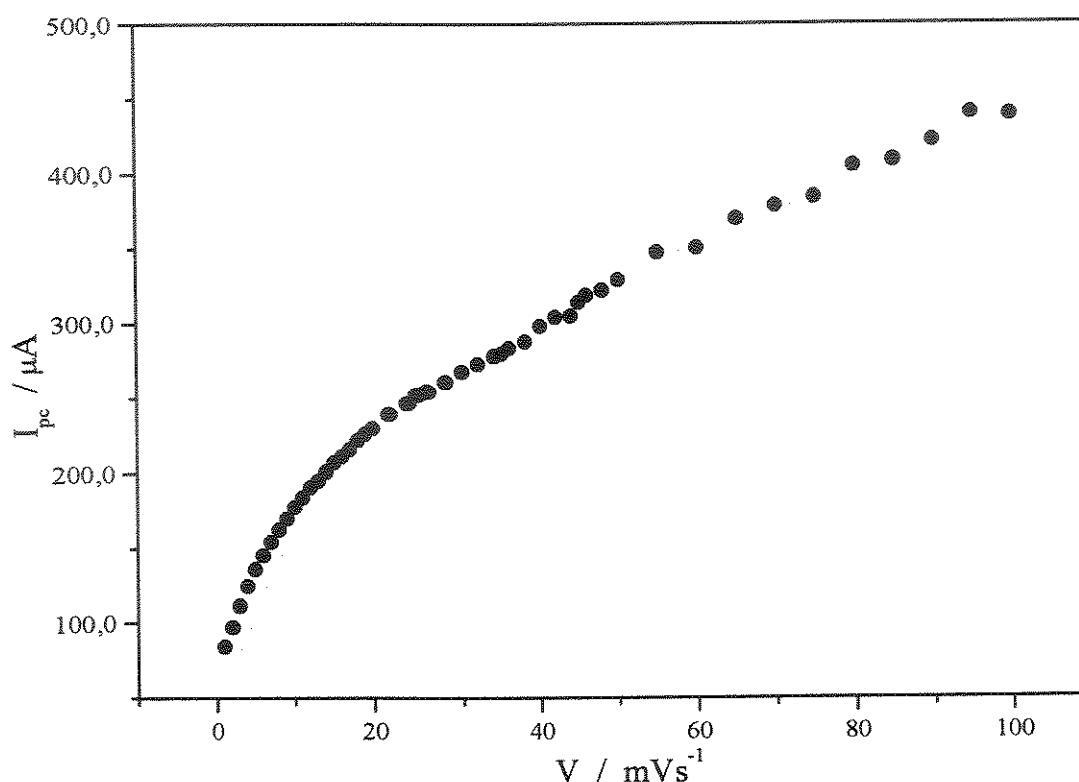


Figura 26 - Efeito da velocidade de varredura, V , na resposta voltamétrica, em solução tampão McIlvaine a pH 4,5 e potencial aplicado de 20 mV vs ECS.

1.10. Estudo de possíveis interferentes

O estudo de possíveis interferências, na proporção 1:1 interferentes/frutose, não mostrou nenhuma influência significativa, com exceção do ácido ascórbico, conforme ilustra a Tabela 6. Este comportamento indica que o biossensor pode ser usado para determinação de frutose em amostras reais, na ausência de grandes quantidades de ácido ascórbico. O resultado obtido por diferentes metodologias não difere mais que 5 %, quando o método da adição padrão é usado. A recuperação da frutose, usando o biossensor, foi sempre maior que 95 %, para ambas as amostras.

Tabela 6 - Influência de possíveis compostos interferentes na determinação de frutose usando o biossensor baseado em azul de Meldola e FDH adsorvido em sílica gel modificada com fosfato de titânio

Interferente	Quantidade de frutose encontrada ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Recuperação (%)*
Ácido ascórbico	180	91
Etanol	194	98
Galactose	191	96
Glicose	192	97
Ribose	193	97
Sacarose	189	95
Xilose	192	97

*A quantidade de frutose adicionada foi $198 \mu\text{mol L}^{-1}$. A quantidade de interferente foi de $200 \mu\text{mol L}^{-1}$.

A escolha dos açúcares e do ácido ascórbico está relacionada ao fato destes estarem, geralmente, presentes em amostras de alimentos, e a escolha do álcool pela sua importância na indústria sucroalcooleira.

1.11. Curva analítica

Na Figura 27 é mostrado o gráfico da corrente gerada vs concentração de frutose. Uma relação linear é observada para soluções mais diluídas, para as mais concentradas um desvio da linearidade é observada. Este comportamento deve-se provavelmente à saturação do centro ativo da enzima. A equação ajustada para a região linear ($1,0 \times 10^{-4}$ a $7,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$) pode ser representada por $\Delta j = 0,015 (\pm 0,006) + 0,62 (\pm 0,01) [\text{frutose}]$, com um coeficiente de correlação de 0,999. A repetibilidade da resposta do biossensor foi excelente, com um desvio padrão relativo de 0,68 % para uma solução $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$ de frutose, com n igual a 7.

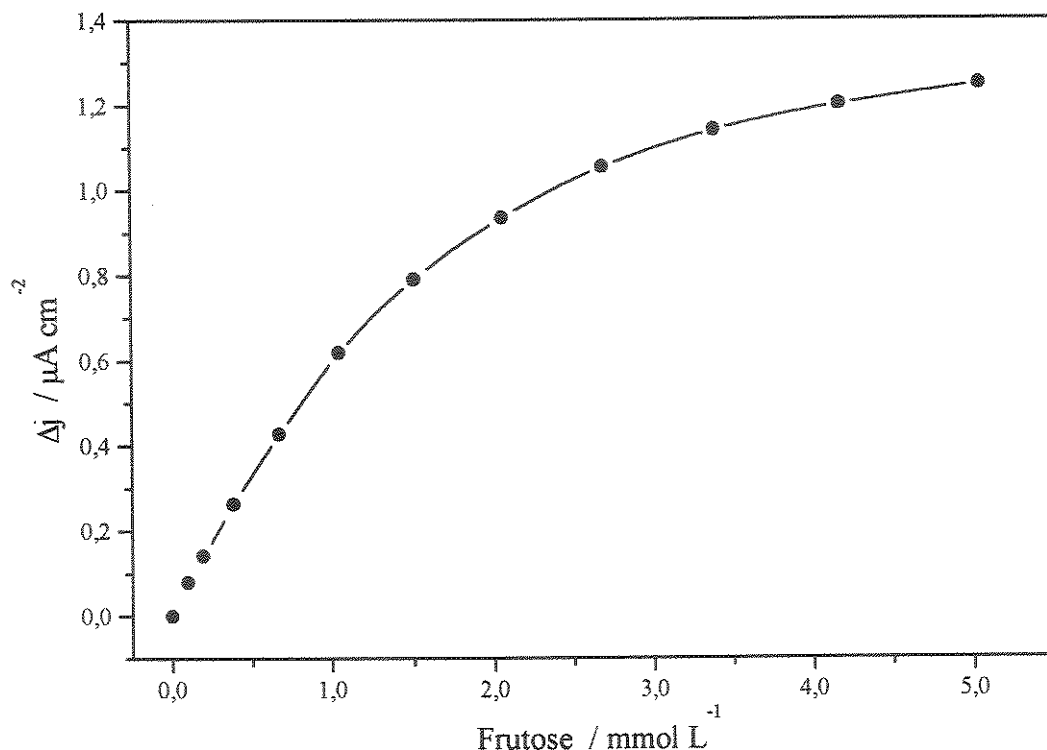


Figura 27 - Dependência da resposta do biossensor com a concentração de frutose em tampão McIlvaine pH 4,5. O potencial de operação foi 20 mV vs ECS.

Estes dados foram obtidos de experimentos amperométricos, realizados com diferentes concentrações de frutose.

Para obtenção da curva analítica do biossensor nas análises de amostras reais foi utilizada a faixa linear. Para a utilização de toda a faixa de calibração deve-se tomar o cuidado de efetuar uma correlação exponencial para a curva analítica.

1.12. Estabilidade da pasta e do biossensor

Um importante aspecto a ser considerado é a estabilidade do biossensor e de seus componentes. A pasta de carbono pode ser armazenada por cerca de três meses, mantendo a mesma atividade quando sob refrigeração a -15 °C. Isto é de

fundamental importância pois permite uma maior semelhança entre os biossensores construídos em dias diferentes.

A estabilidade do biossensor foi muito boa permitindo seu uso para aproximadamente 300 análises (média de 15 amostras/dia). A Figura 28 mostra a resposta relativa do biossensor com o tempo.

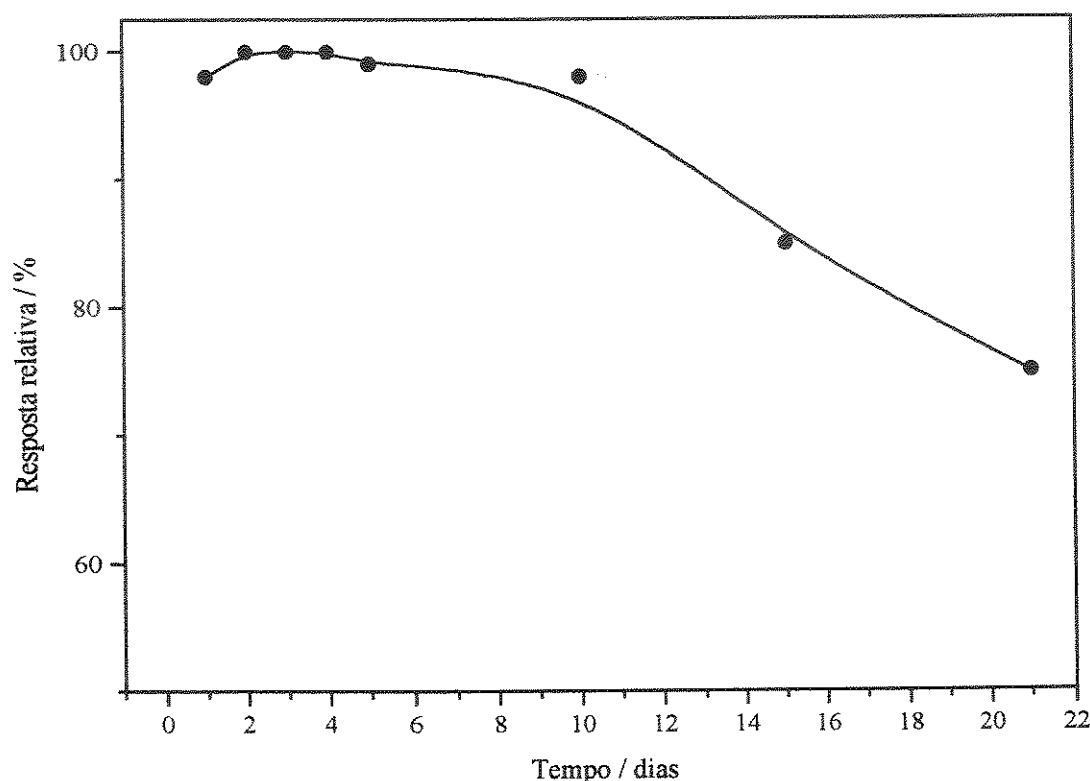


Figura 28 - Variação da resposta máxima do biossensor com o tempo. Solução tampão McIlvaine, pH 4,5; concentração de frutose de $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$, e potencial aplicado de 20mV.

Nota-se que, no primeiro dia de uso o biossensor ainda não atingiu o seu máximo de corrente, o que pode ser explicado pelo pouco tempo de condicionamento. A partir do segundo dia até o quinto o biossensor adquire resposta máxima; a partir do sexto dia começa a diminuir a sua resposta, o que pode ser explicado pela possível perda da atividade enzimática causada pela desnaturação da enzima.

1.13. Análise de amostras reais

A Tabela 7 mostra os resultados obtidos na análise de frutose em amostras reais. Os resultados são comparados com os valores nominais, mostrando uma boa concordância entre os resultados.

Tabela 7 - Comparação entre o biossensor com sílica modificada e o método padrão para frutose

Amostra	Biossensor*	Método padrão
Geléia I	96,9± (0,1)	97,5± (0,1)
Geléia II	96,7± (0,1)	97,4± (0,1)
Adoçante	97,7± (0,1)	98,1± (0,1)

*porcentagem em relação ao valor nominal contido na embalagem do produto, n=7.

2. ENZIMA IMOBILIZADA EM POLIPIRROL SOBRE ELETRODO DE PLATINA

2.1. Características do filme de polipirrol

O filme obtido mostrou uma coloração azul escura, lisa e brilhante. A incorporação do ferricianeto foi verificada por voltametria cíclica. A Figura 29 mostra voltamogramas cíclicos obtidos com (A) eletrodo de Pt limpo, (B) eletrodo de Pt com filme de Ppy dopado com ferricianeto, (C) eletrodo de Pt com filme de Ppy e enzima, sem adição de substrato e (D) eletrodo de Pt com filme de Ppy e enzima, com adição de substrato. Quando o ferricianeto é incorporado ao filme de Ppy aparece um par de picos redox e aumenta a corrente capacitiva. Este aumento pode ser atribuído à maior área superficial do eletrodo, indicando que o filme é polimerizado de diferentes formas, provavelmente o filme cresce deixando cavidades que permitem a difusão do eletrólito. Também observa-se maior

corrente ao ser incorporada a enzima no filme de PPy, provavelmente devido ao aumento da resistência causada pela incorporação da enzima.

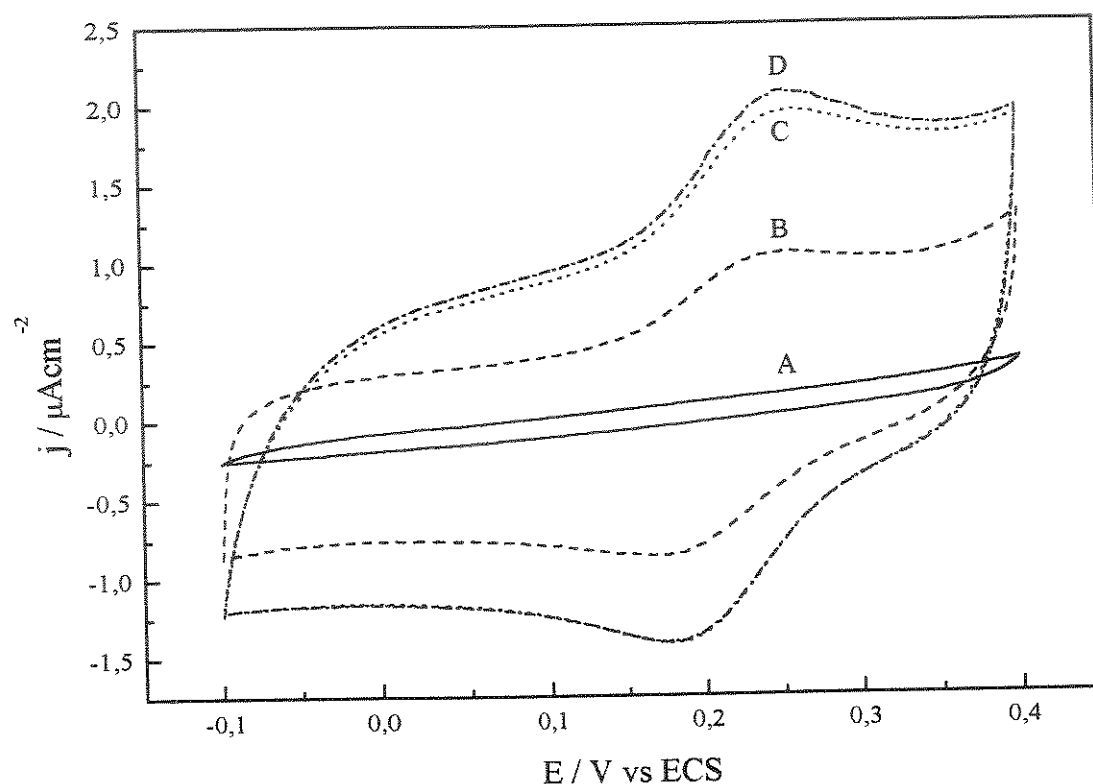


Figura 29 - Voltamogramas cíclicos obtidos com (A) eletrodo de Pt limpo, (B) eletrodo de Pt com filme de PPy dopado com ferricianeto de sódio, (C) eletrodo de Pt com filme de Ppy dopado com HCF e enzima, sem adição de substrato e (D) eletrodo de Pt com filme de Ppy e enzima, com adição de substrato, 10 mmolL^{-1} . Tampão McIlvaine pH 4,5; 20 mVs^{-1} .

Os picos redox observados no voltamograma com potencial médio de 217 mV vs ECS, são atribuídos ao par Fe(II)/Fe(III) do hexacianoferrato.

Nota-se ainda, pela diferença dos picos anódicos nos voltamogramas (C) e (D), que o biossensor responde à variação de concentração de frutose, evidenciando a catálise da reação enzimática.

2.2. Estabilidade do sensor

A estabilidade do sensor (eletrodo de Pt dopado com hexacianoferrato) foi monitorada através de voltametria cíclica. Pode-se notar pelos valores de pico anódico e catódico, Tabela 8, que o sensor não sofre alterações nas propriedades eletroquímicas, durante as varreduras de potencial por 200 ciclos consecutivos.

Tabela 8 - Dependência da corrente de pico em função do número de ciclos voltamétricos, eletrodo de Pt.

Número do ciclo*	I _{pa} (μA)	I _{pc} (μA)
1	16,6	-12,2
2	16,3	-12,0
10	16,3	-12,0
50	16,2	-11,9
100	16,1	-11,9
200	16,1	-11,9

*Tampão McIlvaine pH 4,5 e velocidade de varredura de 20 mVs⁻¹.

2.3. Efeito do pH

A influência do pH na resposta do biossensor é mostrada na Figura 30, onde observa-se que a melhor resposta ocorre em pH 4,5; pH ótimo para a atividade enzimática da enzima em solução. Para valores menores que 3,0 e maiores que 7,0 o biossensor torna-se inativo, provavelmente devido a desnaturação da enzima.

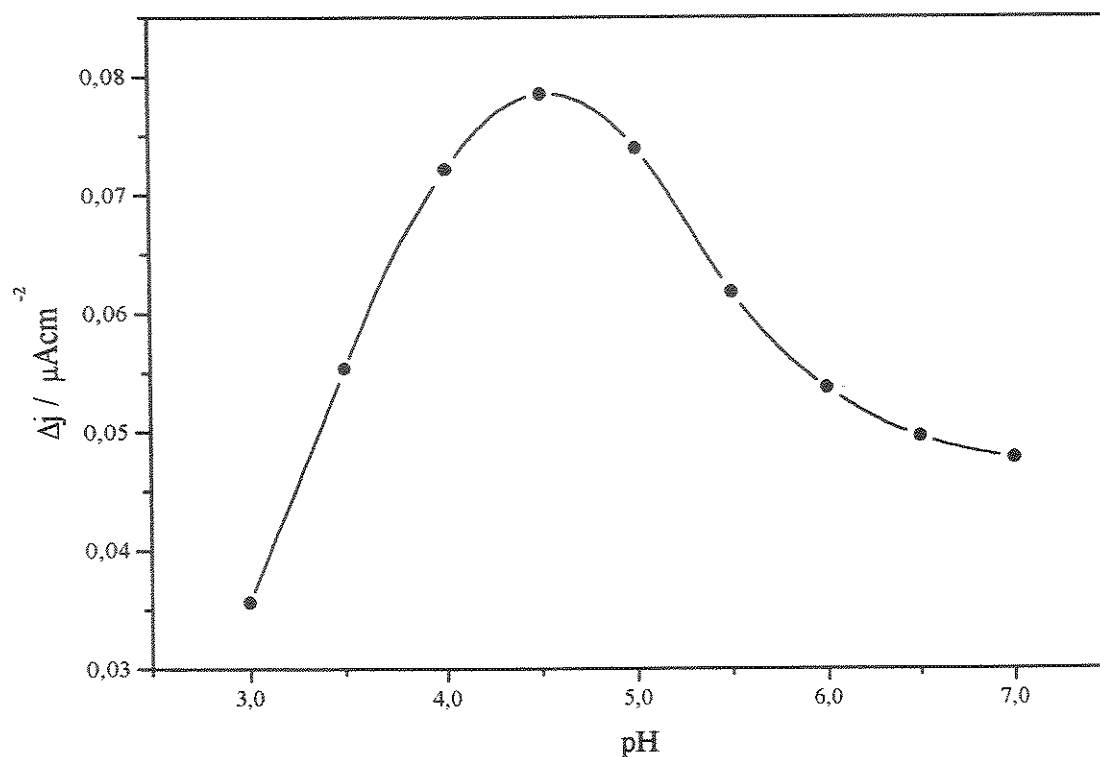


Figura 30 - Influência do pH na resposta do biossensor, obtida a um potencial aplicado de 250 mV vs ECS e concentração de frutose de $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$.

2.4. Influência do potencial aplicado

A Figura 31 mostra a influência do potencial aplicado. Observa-se que há um maior aumento da corrente em torno do potencial de pico, conforme mostrado na Figura 29 (250 mV vs ECS), indicando que o potencial aplicado afeta significativamente a sensibilidade da resposta do biossensor.

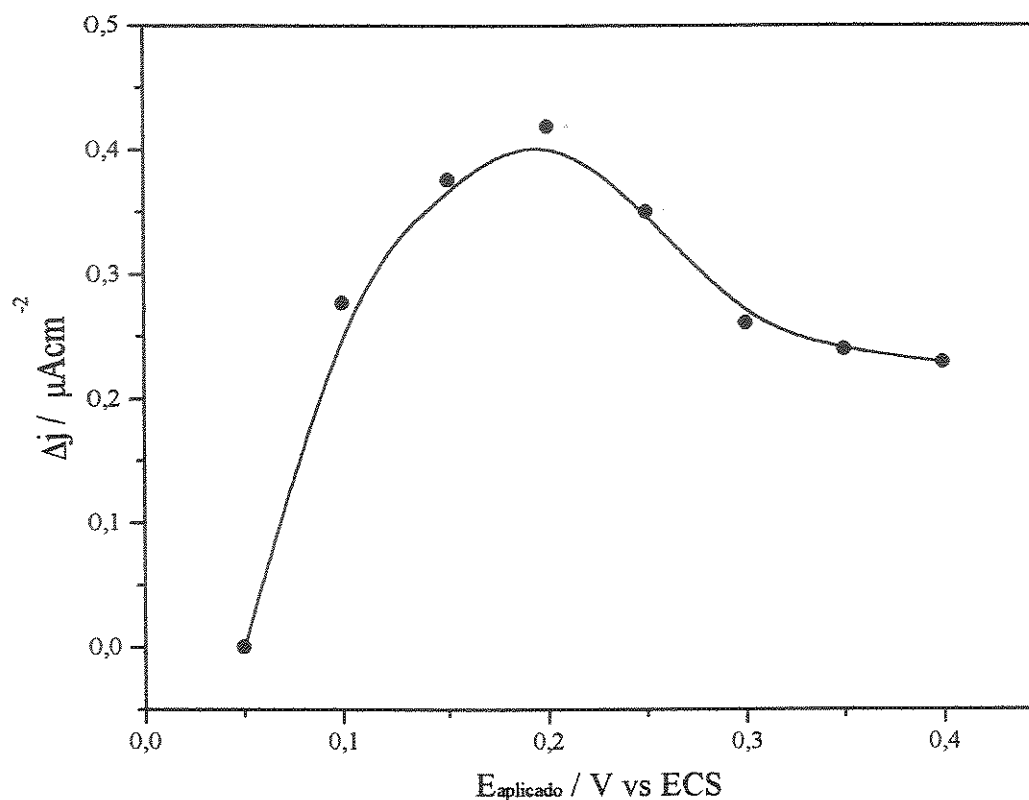


Figura 31 - Dependência da resposta do biossensor para frutose em relação ao potencial aplicado, obtido em tampão McIlvaine pH 4,5.

2.5. Tempo de resposta do biossensor

A Figura 32 mostra a dependência da corrente de pico anódico em relação ao tempo, após a adição do substrato. A corrente começa a surgir poucos segundos após a adição do substrato e alcança 95% do nível de corrente de estado estacionário em 8 segundos. Este tempo é bem inferior aos biossensores citados na literatura que estão entre 40 a 60 s (Matsumoto *et al.*, 1986 Matsumoto *et al.*, 1988).

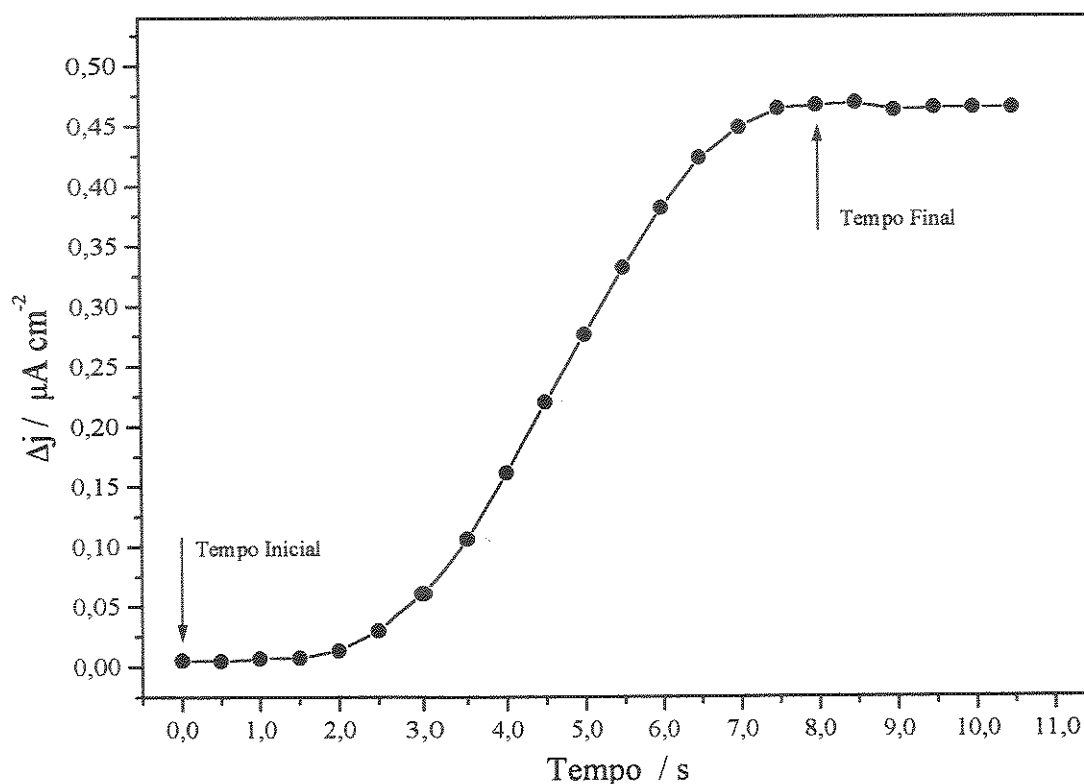


Figura 32 - Dependência da resposta do biossensor com o tempo após adição do substrato. O potencial aplicado foi 250 mV vs ECS e concentração de frutose de $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$, em 5,0 ml de solução tampão McIlvaine pH 4,5 e 20 mVs^{-1} .

2.6. Limitação difusional

A correlação linear entre a corrente de pico e a velocidade de varredura, observada na Figura 33, indica que o mediador está fortemente aderido à superfície do eletrodo, o que dificulta sua lixiviação e facilita a difusão dos elétrons. Esta característica é de fundamental importância na construção de um biossensor, uma vez que as espécies eletroativas estão fortemente aderidas à superfície do eletrodo, há maior permanência do mediador de elétrons no filme, dificultando assim sua lixiviação.

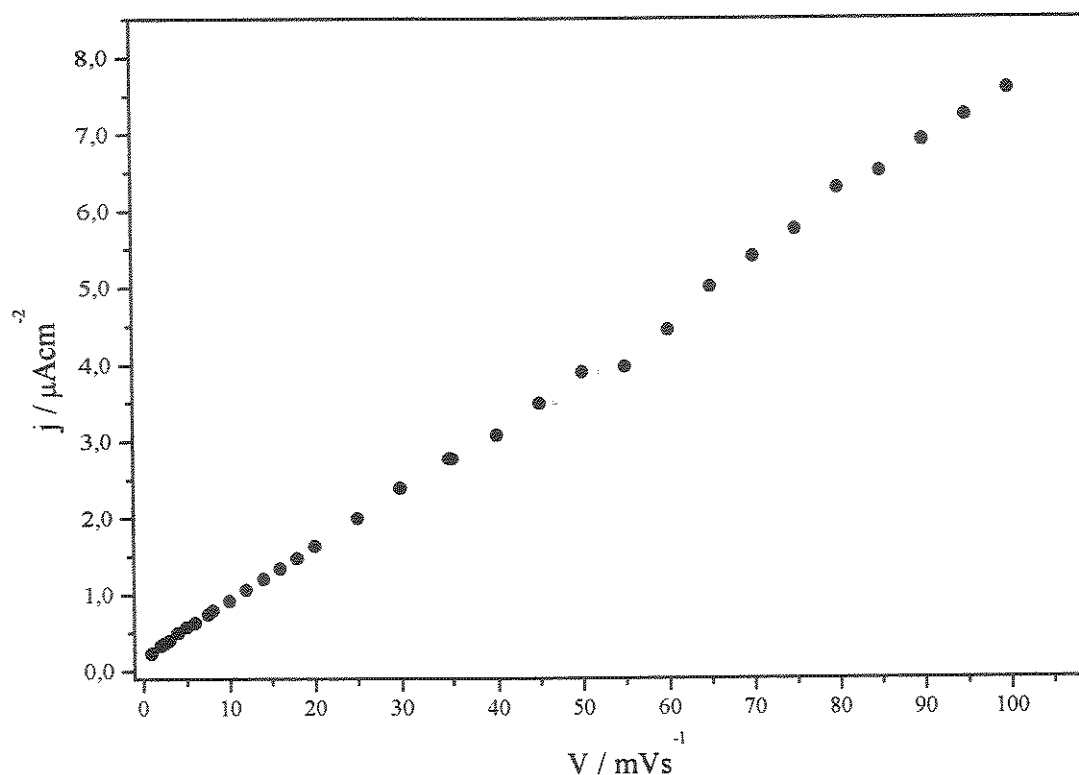


Figura 33 - Efeito da velocidade de varredura, V , em função da densidade de corrente de pico catódico, na resposta da voltametria cíclica, em solução tampão McIlvaine a pH 4,5 e potencial aplicado de 250 mV vs ECS.

2.7. Estudo de possíveis interferentes

O estudo da possível interferência foi realizado na presença de quantidades iguais de interferente e substrato. Nenhuma interferência significativa foi observada, como pode ser visto através da Tabela 9.

Tabela 9 - Influência de compostos interferentes na determinação de frutose usando o biossensor baseado em hexacianoferrato e FDH imobilizado diretamente no filme de polipirrol.

Interferente	Quantidade de frutose encontrada ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Recuperação (%)*
Ácido ascórbico	182	92
Etanol	195	98
Glicose	193	97
Sacarose	188	95

*A quantidade de frutose adicionada foi $198 \mu\text{mol L}^{-1}$. A quantidade de interferente foi de $200 \mu\text{mol L}^{-1}$.

2.8. Curva analítica

A Figura 34, mostra a curva analítica apresentando resposta linear na faixa de $0,1 - 0,8 \text{ mmol L}^{-1}$ do substrato, com desvio da linearidade para concentrações maiores. Assim, como no caso anterior, este fato evidencia uma provável saturação do centro ativo da enzima. A equação ajustada para a região linear ($1,0 \times 10^{-4}$ a $8,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$) pode ser representada por $j = 0,032 (\pm 0,013) + 1,542 (\pm 0,029)$ [frutose], com coeficiente de correlação de 0,9989. A repetibilidade da resposta do biossensor foi considerada excelente. O desvio padrão relativo para uma solução $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$ de frutose e número de replicatas, $n=7$, foi de 0,93 %.

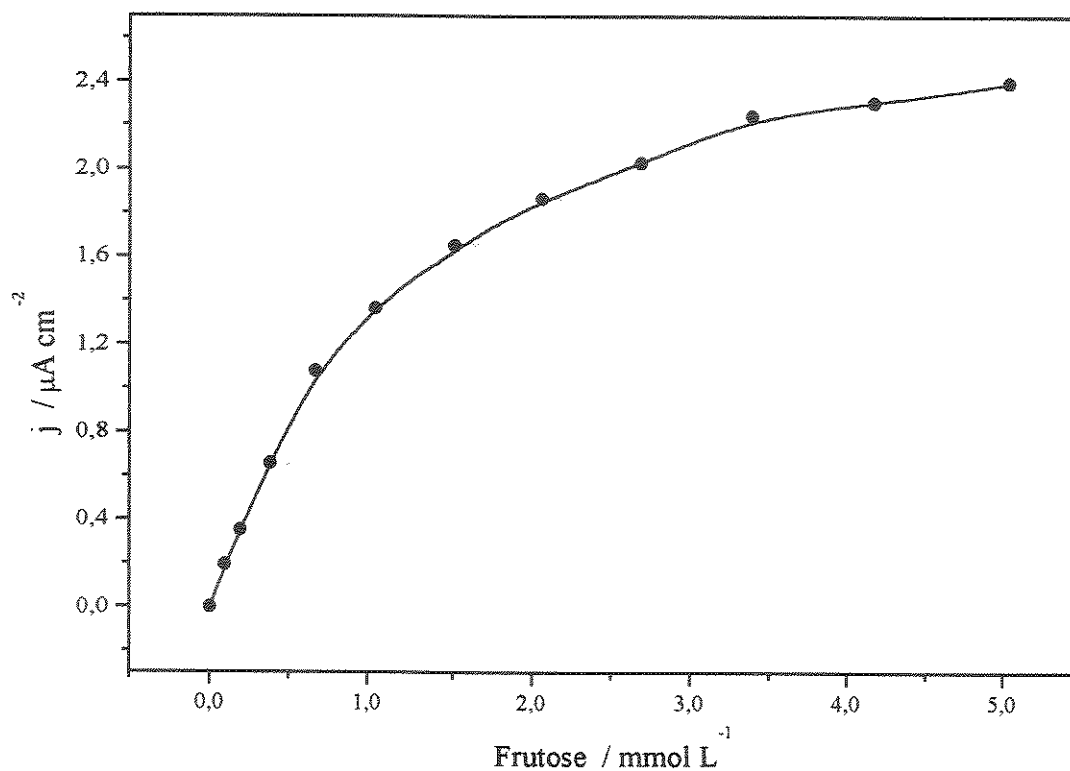


Figura 34 - Dependência da resposta do biossensor com a concentração de frutose em tampão McIlvaine pH 4,5. O potencial de operação foi 250 mV vs ECS e 20 mVs^{-1} .

2.9. Estabilidade do biossensor

A estabilidade do biossensor foi muito boa permitindo seu uso para aproximadamente 100 análises (com média de 15 análises/dia). A Figura 35 mostra a resposta relativa do biossensor com o tempo.

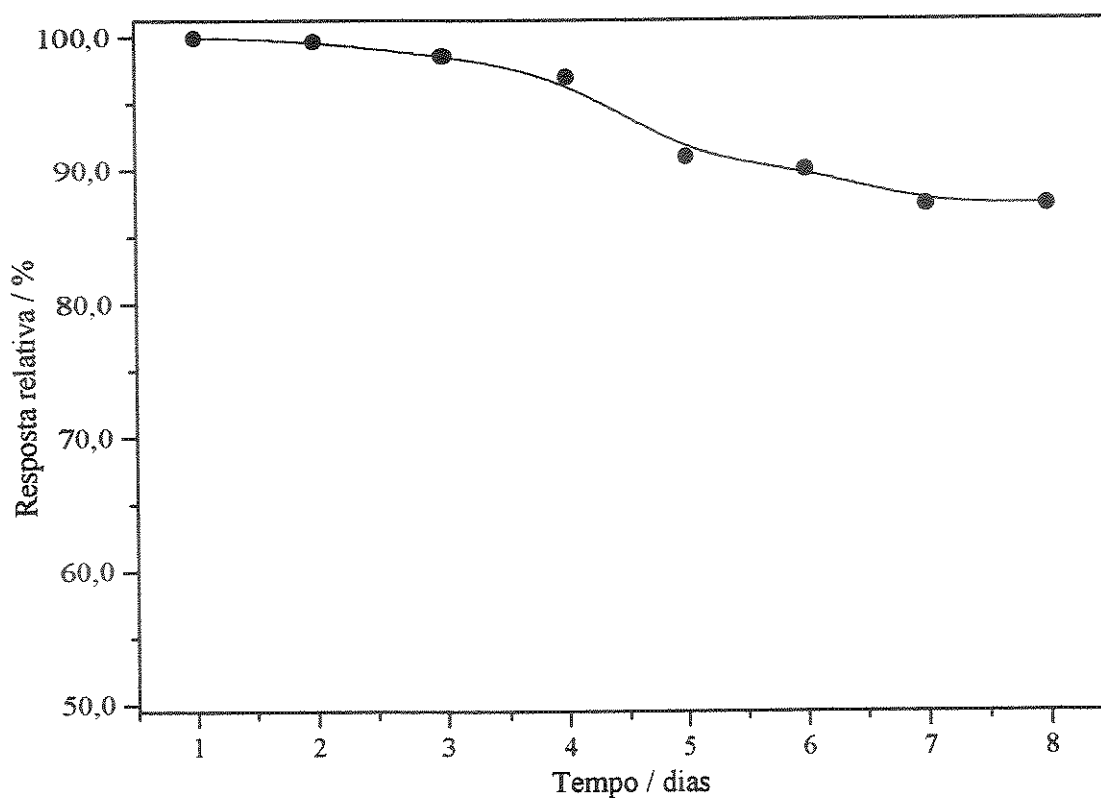


Figura 35 - Variação da resposta relativa do biossensor com o tempo. Solução tampão McIlvaine, pH 4,5; e potencial aplicado de 250mV vs ECS.

A simplicidade, bom desempenho e boa estabilidade do biossensor mostra que o mesmo pode ser usado para análise de frutose em amostra real, com a vantagem de não ser necessário tratamento prévio das amostras.

2.10. Análise de amostras reais

A Tabela 10, mostra os resultados obtidos na análise de frutose em amostras reais. Os resultados são comparados com os obtidos pelo método padrão, mostrando uma boa concordância entre os resultados.

Tabela 10 - Comparação entre o biossensor Ppy e o método padrão

Amostra	Biossensor*	Método padrão
Geléia I	95,8± (0,1)	97,5± (0,1)
Geléia II	95,7± (0,1)	97,4± (0,1)
Adoçante	96,8± (0,1)	98,1± (0,1)

*porcentagem em relação aos valores nominais contidos na embalagem dos produtos.

3. ENZIMA IMOBILIZADA EM GLUTARALDEÍDO, SOBRE ELETRODO DE PLATINA MODIFICADO COM FILME DE POLIPIRROL.

3.1. Propriedades eletroquímicas do biossensor

Neste caso, a incorporação do mediador de elétrons, ferricianeto, foi também verificada, através de voltametria cíclica. A Figura 36 mostra voltamogramas cíclicos obtidos com (A) apenas o eletrodo base de Pt; (B) eletrodo de Pt com filme de PPy dopado com mediador ferricianeto; (C) eletrodo com filme de PPy e glutaraldeído, biossensor e (D) biossensor na presença de substrato.

É observado um aumento considerável da corrente capacitiva no voltamograma (B); isso acontece, provavelmente, devido ao aumento da resistência causada pela dupla camada PPy/glutaraldeído.

Pode-se constatar, através dos voltamogramas (C) e (D), a eletrocatalise da reação enzimática.

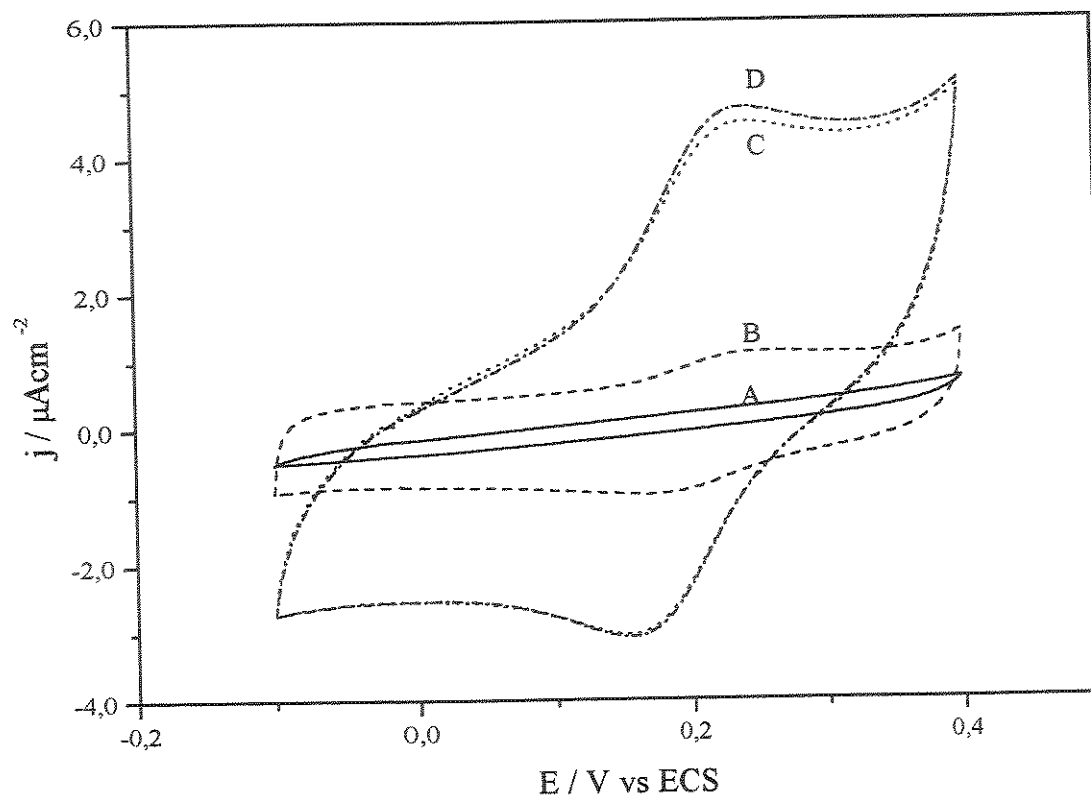


Figura 36 - Voltamogramas cíclicos obtidos com (A) eletrodo de Pt limpo, (B) eletrodo de Pt com filme de Ppy dopado com ferricianeto de sódio, (C) eletrodo de Pt com filme de Ppy e glutaraldeído, biossensor, sem adição de substrato e (D) biossensor com adição de substrato, 10 mmol L^{-1} . Tampão McIlvaine pH 4,5; 20 mVs^{-1} .

3.2. Efeito do pH

De uma maneira análoga aos estudos da influência do pH realizados para os biossensores anteriores, pode-se concluir que o melhor pH a ser utilizado é o pH ótimo da enzima, que é 4,5, como pode ser observado pela Figura 37. Para valores inferiores a 3,0 e superiores a 7,0 o biossensor tornou-se inativo, mais uma vez, provavelmente devido a desnaturação da enzima.

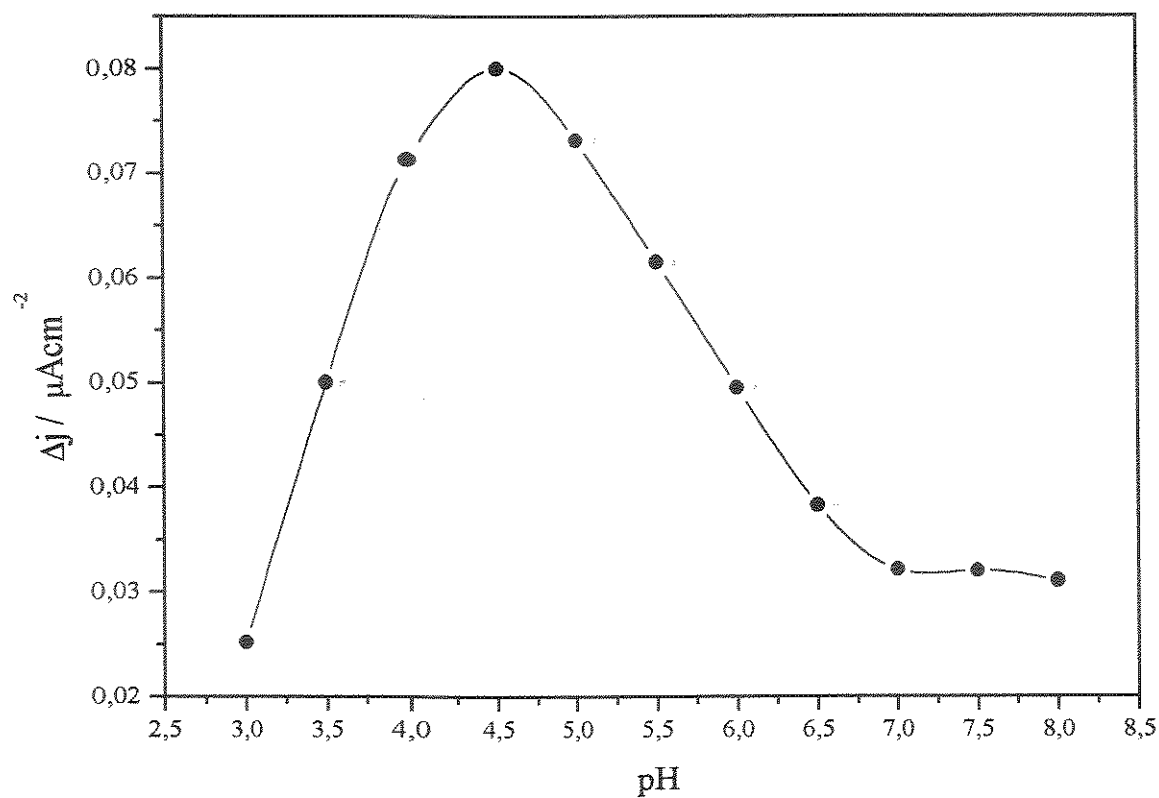


Figura 37 - Influência do pH na resposta do biossensor, obtida a um potencial aplicado de 230 mV vs ECS e concentração de frutose de $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$.

3.3. Influência do potencial aplicado

A sensibilidade do sensor ao potencial aplicado é mostrada na Figura 38 e como nos biossensores anteriores, é observada pelo maior aumento da corrente de pico catódico em torno do potencial de pico.

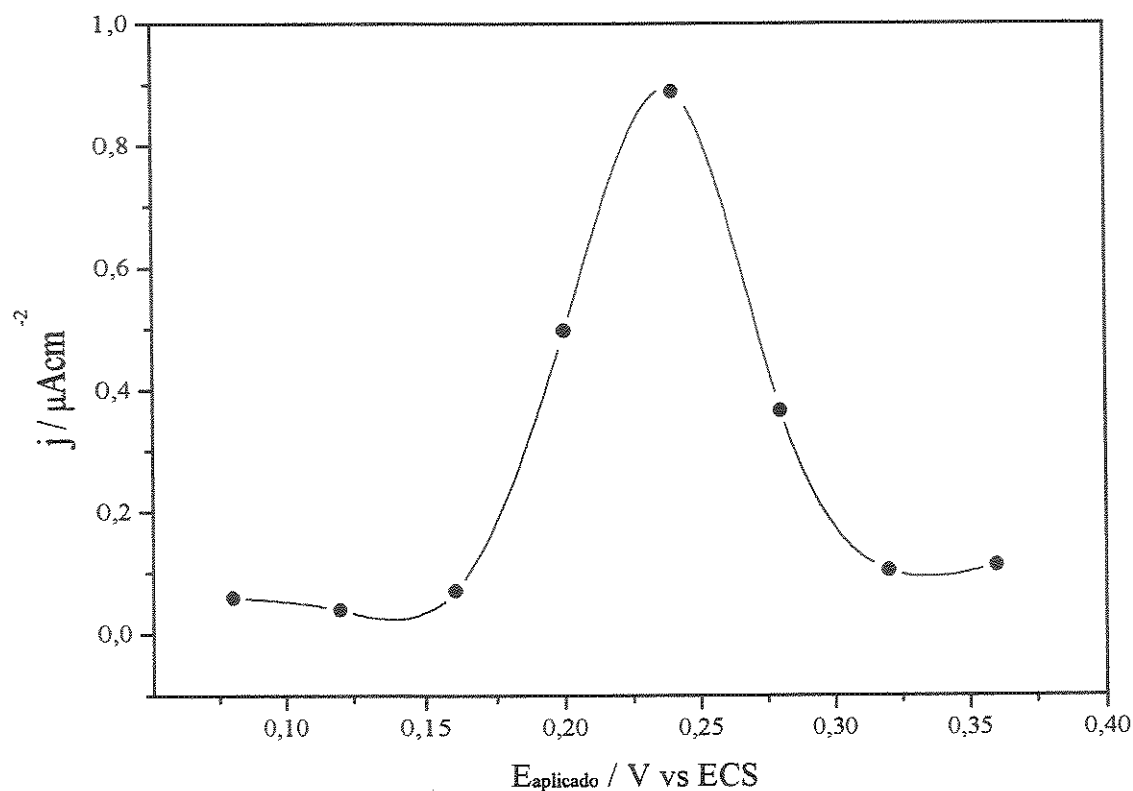


Figura 38 - Dependência da resposta do biossensor para frutose em relação ao potencial do eletrodo, obtido em tampão McIlvaine pH 4,5 e 20 mVs^{-1} .

3.4. Tempo de resposta do biossensor

Pela Figura 39 observa-se que o tempo de resposta para este biossensor foi de aproximadamente 15 segundos, duas vezes maior que o tempo de resposta do biossensor anterior, provavelmente devido à resistência causada pelas duas camadas de filme de PPy e glutaraldeído, aumentando o tempo necessário à difusão das espécies até à superfície do sensor base.

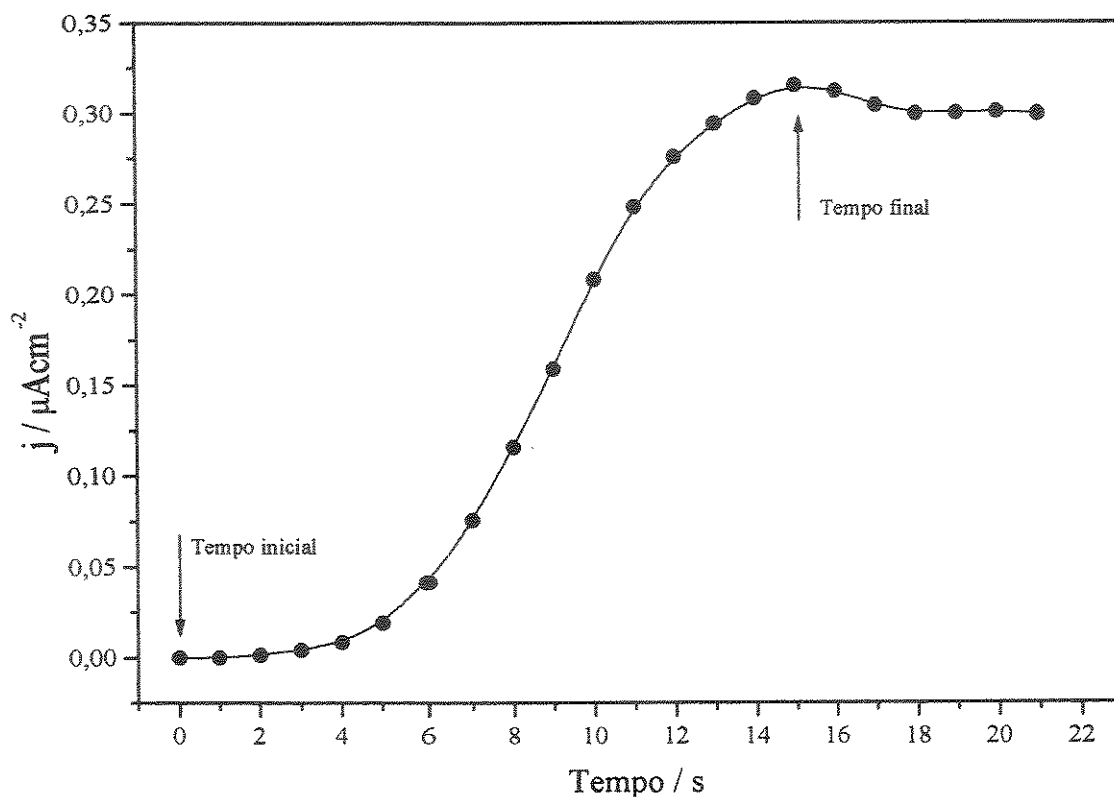


Figura 39 - Dependência da resposta do biossensor com o tempo após adição do substrato. O potencial aplicado foi 230 mV vs ECS e concentração de frutose de $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$, em 5,0 ml de solução tampão McIlvaine pH 4,5 e 20 mVs^{-1} vs ECS.

3.5. Limitação difusional

A Figura 40 mostra o efeito da velocidade de varredura na resposta do biossensor. O desvio da linearidade poderia, indicar que a espécie eletroativa não estaria fortemente aderida à superfície do eletrodo, porém não foram observadas grandes variações na estabilidade do biossensor com o tempo.

Uma provável explicação para este comportamento está relacionada ao fato de haver uma dupla resistência à difusão dos elétrons através das duas camadas de filme, uma de PPy e outra de glutaraldeído.

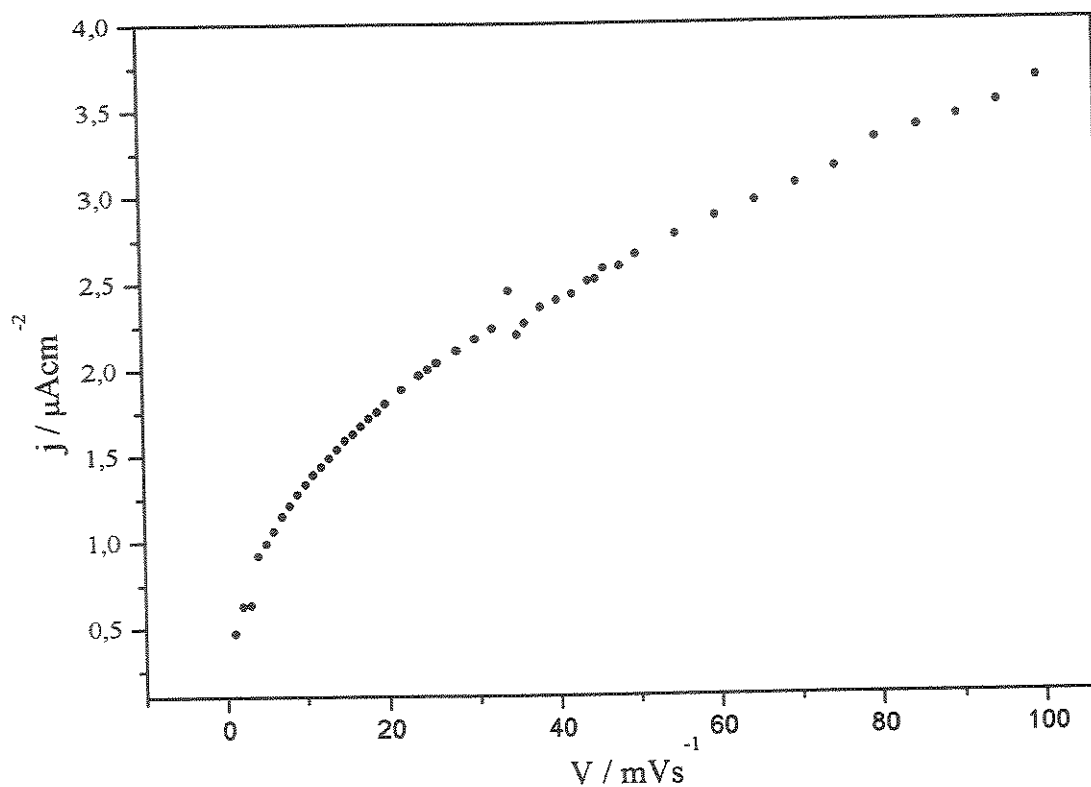


Figura 40 - Efeito da velocidade de varredura, V , em função da densidade de corrente de pico catódico, na resposta da voltametria cíclica, em solução tampão McIlvaine a pH 4,5 e potencial aplicado de 230 mV vs ECS.

3.6. Estudo de possíveis interferentes

O estudo de possíveis interferentes mostra que também para este biossensor, o ácido ascórbico é o mais importante, apresentando a menor porcentagem de recuperação, quando comparado aos outros interferentes estudados. A Tabela 11 mostra os resultados obtidos com este biossensor.

Tabela 11- Influência de possíveis interferentes na determinação de frutose usando o biossensor com filme de PPy dopado com hexacianoferrato e FDH imobilizada em glutaraldeído.

Interferente	Quantidade de frutose encontrada ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Recuperação (%)*
Ácido ascórbico	183	92
Etanol	191	96
Glicose	192	97
Sacarose	188	95

*A quantidade de frutose adicionada foi $198 \mu\text{mol L}^{-1}$. A quantidade de interferente foi de $200 \mu\text{mol L}^{-1}$.

Estes resultados indicam que o biossensor pode ser usado para determinação de frutose em amostras reais.

3.7. Curva analítica

Na Figura 41 apresenta a curva analítica obtida para este biossensor. No começo uma relação linear é observada e para uma faixa mais concentrada ocorre um desvio desta linearidade. Este comportamento é provavelmente provocado, como nos demais casos vistos, pela saturação do centro ativo da enzima. A equação ajustada para a região linear ($1,0 \times 10^{-4}$ a $8,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$) pode ser representada por $j = -0,0169 (\pm 0,0087) + 1,723 (\pm 0,0194) [\text{frutose}]$, com um coeficiente de correlação de 0,9996. A repetibilidade da resposta do biossensor foi ótima com um desvio padrão relativo de 0,78 %, quando utilizada uma solução $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$ de frutose e $n = 7$.

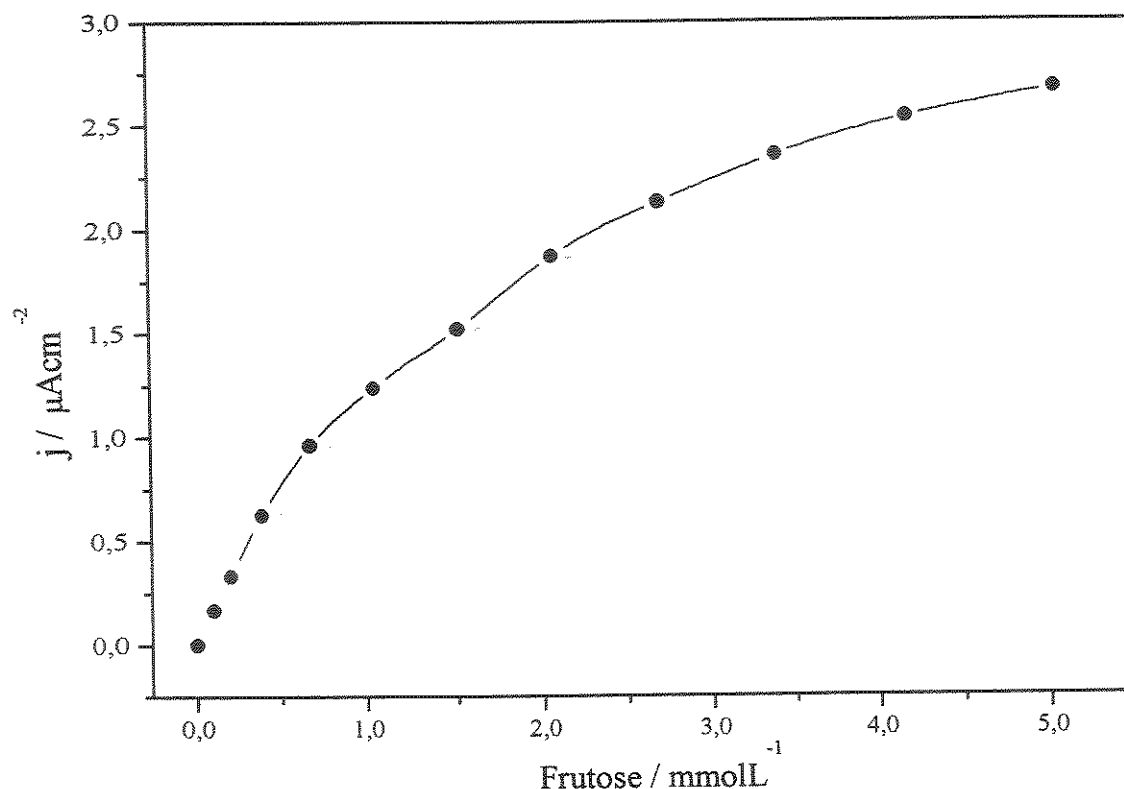


Figura 41 - Dependência da resposta do biossensor com a concentração de frutose em tampão McIlvaine pH 4,5. O potencial de operação foi 230 mV vs ECS e 20 mVs⁻¹.

3.8. Estabilidade do biossensor

Quando guardado sob refrigeração ($\pm 4^{\circ}\text{C}$), a estabilidade do biossensor é boa, permitindo seu uso para aproximadamente 200 medidas (aproximadamente 15 análises/dia) ou duas semanas.

Como pode ser observado pela Figura 42, o biossensor construído com enzima imobilizada em glutaraldeído não sofreu grande variação de estabilidade, com o decorrer do tempo. Isso pode ser atribuído ao uso do glutaraldeído que protege a enzima dentro de uma rede polimérica.

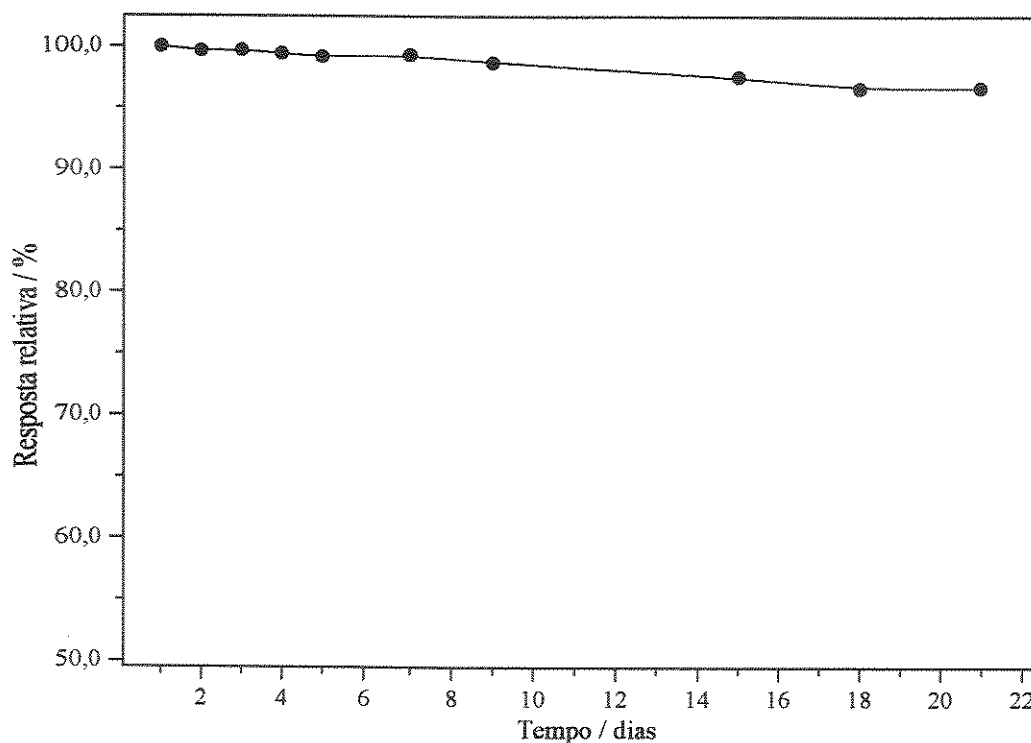


Figura 42 - Variação da resposta relativa do biossensor com o tempo. Solução tampão McIlvaine, pH 4,5; e potencial aplicado de 230 mV vs ECS.

3.9. Análise de amostras reais

O biossensor foi usado para determinar frutose em amostras de adoçante e geléias de fruta, sem tratamento prévio. Os resultados obtidos por diferentes métodos, Tabela 12, não apresentam diferenças maiores que 5 %, quando comparados com os valores nominais.

Tabela 12 - Comparação entre o biossensor Ppy/glutaraldeído e o método padrão.

Amostra	Biossensor*	Método padrão
Geléia I	95,6± (0,1)	97,5± (0,1)
Geléia II	95,9± (0,2)	97,4± (0,1)
Adoçante	96,9± (0,1)	98,1± (0,1)

*porcentagem em relação aos valores nominais contidos na embalagem dos produtos, n=7.

A recuperação da frutose, usando o biossensor, foi sempre maior que 95 %, para todas as amostras.

CAPÍTULO IV

CONCLUSÕES

A Tabela 13 agrupa os principais parâmetros analíticos obtidos com os três tipos de biossensores construídos.

Tabela 13 - Comparação entre os diversos tipos de imobilização estudados

	Sílica	PPy	Glutaraldeído
pH ótimo	4,5	4,5	4,5
E aplicado, mV	20	250	230
Tempo de resposta, s	6	8	15
Faixa linear, mmol L ⁻¹	0,1 - 0,7	0,1 - 0,8	0,1 - 0,8
Vida útil	3 semanas (300)*	1 semana (100)	2 semanas (200)
Desvio padrão, %	0,67	0,93	0,78

*(número de análises realizadas com o mesmo biossensor)

Pelos dados, pode-se admitir que o biossensor construído com sílica modificada, como suporte enzimático, apresentou desempenho ligeiramente superior aos demais. Entretanto, os demais seriam mais vantajosos em relação a uma miniaturização e construção de multi-eletrodos.

O potencial de 20 mV vs ECS usado nas medidas amperométricas, para o biossensor construído com sílica, é adequado para sistemas enzimáticos, pois potenciais baixos amenizam os efeitos de interferências provenientes da oxidação de compostos como ascorbato e uriato, entre outros.

Para o caso dos biossensores construídos utilizando-se filme de polipirrol, ressalta-se que os potenciais para as medidas amperométricas foram fixados no potencial de pico, pois potenciais maiores podem levar a perda das propriedades eletroquímicas do filme de polipirrol, alta rugosidade e baixa aderência, enquanto potenciais menores, promovem a formação de filme com baixa qualidade (Schenoff, 1992).

Para o biossensor utilizando a imobilização da enzima em glutaraldeído, a maior eficiência pode ser atribuída ao uso do reagente bifuncional, que aumenta a vida útil do biossensor quando comparado ao com imobilização direta no filme de PPy, pois mantém a enzima protegida numa estrutura polimérica.

A presença de albumina ajuda também a proteger a enzima, pelo maior conteúdo protéico envolvido, melhorando sua sensibilidade e seletividade. Porém, aumenta o tempo de resposta, devido à maior resistência causada pela introdução de mais uma camada de filme.

Os procedimentos utilizados são extremamente simples, podendo ser empregados com vantagens, principalmente, em situações onde há a necessidade de se analisar um grande número de amostras em curto intervalo de tempo.

Outra vantagem dos sistemas estudados reside no emprego de pequenos volumes de amostras, diferentemente dos métodos colorimétricos tradicionais, que exigem volumes bem superiores, cerca de 500 μL .

Também vale a pena ressaltar a relação custo/benefício, já que com a enzima imobilizada é possível a análise de um grande número de amostras utilizando-se apenas uma pequena quantidade de enzima.

Estes biossensores poderão ser usados com sucesso em sistemas de fluxo, eliminando a interferência do ácido ascórbico com relativa facilidade, já que em relação aos biossensores para frutose apresentados na literatura, possui um tempo de resposta relativamente menor.

Pode-se prever um sensível aumento das aplicações clínicas utilizando biossensores, como também um aumento na utilização destes em controle de bio-processos. Outra área em que se espera um grande aumento é aquela envolvendo o uso de sensores multi-enzimáticos sobre arranjos de microeletrodos.

PROPOSTAS PARA TRABALHOS FUTUROS

PROPOSTAS PARA TRABALHOS FUTUROS

Os resultados obtidos com os três biossensores, permitem prever outras possibilidades de trabalho, tais como:

- ✓ Utilização do sistema sílica gel modificada com TiO_2 para imobilizar diversos tipos de mediadores de interesse na construção de biossensores, como azul de metileno, entre outros.
- ✓ Construção de biossensores miniaturizados.
- ✓ Análise de frutose em produtos da indústria sucroalcooleira.
- ✓ Imobilização da enzima juntamente com o mediador, durante a polimerização do filme de polipirrol.
- ✓ Utilização da enzima ascorbato oxidase em sistema de análise em fluxo, visando a eliminação da interferência causada pelo ácido ascórbico.
- ✓ Utilização de sistema FIA, com biossensores construídos com frutose dehidrogenase e glicose oxidase para análise simultânea de frutose e glicose, sobretudo em produtos dietéticos.
- ✓ Cálculo das constantes de velocidade para o sistema
- ✓ Aplicação do biossensor em monitoramento contínuo de processos biotecnológicos.

BIBLIOGRAFIA

BIBLIOGRAFIA

- ABBOU, M. and SIOUFFI, A. M.; "Liquid-Chromatography of Sugar on Diol Columns-Detection with Cuprammonium Reagent", *J. of Liquid-Chromatography*, 1987, **10**, 95-106.
- ABU-LEHIA, I. H.; "A Simple and Rapid Colorimetric Method for Lactose Determination in Milk", *Food Chemistry*, 1987, **24**, 233-240.
- ADAMS, R. N.; *Anal. Chem.*, 1958, **30**, 1576. Apud in GILMATRIN, M. A. T. and HART, J. P., "Sensing with chemically and biologically modified carbon electrodes - A review", *Analyst*, 1995, **120**, 1029-1045.
- AMINE, A., KAUFFEMANN, J. M., GUILBAULT, G. G. and BACHA, S.; "Characterization of mixed enzyme-mediator-carbon paste electrodes", *Anal. Letters*, 1993, **26**, 1281-1299.
- BAUM, P. and CZOK, R.; *Biochem. Z.*, 1959, 332, 121. Apud in GUILBAULT, G. G., "Analytical uses of immobilized enzymes" Marcel Dekker, Inc., New York, 1984.
- BAUMAN, E. K., GOODSON, L. H. GUILBAULT, G. G. and KRAMER, D. N.; *Anal. Chem.* 1965, **37**, 1378 apud in GUILBAULT, G. G., "Analytical uses of immobilized enzymes" Marcel Dekker, Inc., New York, 1984.
- BEGUM, A., KOBATAKE, E., SUZAWA, T., IKARIYAMA, Y. and AIZAWA, M.; "New electrocatalytic biomolecular interface for fabricating a fructose dehydrogenase-based sensing system", *Anal. Chim. Acta*, 1993, **280**, 31-36.
- BEH, S. K., MOODY, G. J. and THOMAS, J. D. R.; "Effect of Pre-treatment of platinum for modified platinum wire glucose oxidase amperometric electrodes", *Analyst*, 1989, **114**, 29-32.
- BENNET, T. P. and FRIEDEN, E.; "Modern Topics in biochemistry structure and Function of Biological Molecules", New York, Mac Millan, 1966, p 175.
- BERGMEYER, H. V., BERNT, E., SCHMIDT, F. and STORK, H.; *Methods of enzymatic analysis*, 1974, **3**, 1196-1201.
- BERTRAND, M. G.; "Le dosage de sucres reducteurs", *Bulletin Society Chemistry*, 1906, **35**, 1285-1299.
- BOWERS, L. D. and CARR, P. W.; "Applications of Immobilized Enzymes in Analytical Chemistry", *Anal. Chem.*, 1976, **48**, 544A-559A.

- BOYER, P. D.; "The Enzymes", Acad. Press, vol. 2, pag. 35, N. York, 1970.
- BREMLE, G.; PERSSON, B. AND GORTON, L.; "An Amperometric Glucose Electrode Based on Carbon Paste, Chemically Modified with Glucose-Dehydrogenase, Nicotinamide Adenine-Dinucleotide, and a Phenoxazine Mediator, Coated with a Poly(Ester Sulfonic-Acid) Cation Exchanger", *Electroanalysis*, 1991, **3**, 77-86.
- CAMPOS, M. A. P.; "Algumas conquistas das ciências da nutrição". *An. Farm. Quím. São Paulo*, 1964, **15** (7/8), 107-126.
- CECH, T. R., ZAUG, A. J. and GRABOWSKI, P. J.; *Cell*, 1981, **27**, 487. Apud in SOARES, T. A. e LINS, R. D., "Ribozimas: nem toda enzima é proteína", *Química Nova*, 1995, **18** (4), 375-378.
- CÉSPEDES, F., FÀBREGAS, M. J., BARTROLÍ, J., and ALEGRATS, S.; *Anal. Chim. Acta*, 1993, **273**, 409-417. Apud in GILMATRIN, M. A. T. and HART, J. P., "Sensing with chemically and biologically modified carbon electrodes - A review", *Analyst*, 1995, **120**, 1029-1045.
- CHANG, T. M. S.; "Semipermeable microcapsuler", *Science*, 1964, **146**, 524-525.
- CHAVES, N.; "O açúcar na nutrição", Recife, 1969, p 10-13.
- CLARK, L. and LYONS, C.; *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1962, **102**, 29 apud in GUILBAULT, G. G., "Analytical uses of immobilized enzymes" Marcel Dekker, Inc., New York, 1984.
- CSÖREGLI, E., GORTON, L. and MAKRO-VARGA, G.; "Carbon fibres as electrode materials for the construction of peroxidase-modified amperometric biosensors", *Anal. Chim. Acta*, 1993, **273**, 59-70.
- DIAZ, A. F., KANAZAWA, K. K. and GARDINI, G. P.; *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, 1979, **635**. Apud in GUILBAULT, G. G., "Analytical uses of immobilized enzymes" Marcel Dekker, Inc., New York, 1984.
- DUNSMORE, A., MELLET, P. and WOLFF, M.; "Same factors affecting the Lane and Eynon titration method for determining reducing sugars in sugar products", *Proceeding of the South African Sugar Technologists Association*, Durban, 1980, 72-76.
- FERREIRA, R. and COUTINHO, K.; J.; *J. Theor. Biol.*, 1993, **164**, 291-305. Apud in SOARES, T. A. e LINS, R. D., "Ribozimas: nem toda enzima é proteína", *Química Nova*, 1995, **18** (4), 375-378.

- FLORKIN, M. AND STORTZ, E.; "Enzyme Nomenclature, Recommendations - Comprehensive Biochemistry Series, Vol. 13", 3rd Ed., Elsevier, Amsterdam, 1973.
- FLORKIN, M. and STOTZ, E.; "Enzyme Nomenclature, Recommendations", *Comprehensive Biochemistry Series*, 1973, Vol. 13, 3^a Ed., Elsevier, Amsterdam, New York. Apud in GUILBAULT, G. G., "Analytical uses of immobilized enzymes" Marcel Dekker, Inc., New York, 1984.
- FUNG, Y.S. AND MO, S.Y.; "Application of Dual-Pulse Staircase Voltammetry for Simultaneous Determination of Glucose and Fructose", *Electroanalysis*, 1995, 7, 160-165.
- GARCIA, C. A. B., OLIVEIRA NETO, G., KUBOTA, L. T. and GRANDIN, L. A.; "A new amperometric biosensor for fructose using carbon paste electrode modified with silica gel coated with meldonin's blue and fructose 5-dehydrogenase.", *J. of Electroanal. Chem.*, 1996, 418, 147-151.
- GARRETT, R. H. and GRISHAM, C. M.; "Biochemistry", Saunders College Publishing, Fort Worth, 1995, Sixth Edition.
- GILMATRIN, M. A. T. and HART, J. P., "Sensing with chemically and biologically modified carbon electrodes - A review", *Analyst*, 1995, 120, 1029-1045.
- GOLDFELD, M. G., VOROBÉVA, E. S. and POLTORAK, O. M., *Zh. Fiz. Khim.* 40, 2594, 1966 apud in GUILBAULT, G. G., "Analytical uses of immobilized enzymes" Marcel Dekker, Inc., New York, 1984.
- GORTON, L., CSÖREGI, E., DOMINGUEZ, E. PETTERSSON, G. J., VARGA, G. M. and PERSSON, B.; "Selective Detection in Flow-Analysis Based on the Combination of Immobilized Enzymes and Chemically Modified Electrodes", *Anal. Chim. Acta*; 1991, 250, 203-248.
- GORTON, L.; "Carbon paste electrodes modified with enzymes, tissues, and cell - Review", *Electroanal.*, 1995, 7 (1), 23-45.
- GRAY, D. N., KEYES, M. H. and WATSON, B.; "Immobilized Enzymes in Analytical Chemistry", *Anal. Chem.*, 1977, 49, 1067A-1078A.
- GUERRIER-TAKADA, C. and ALTMAN, S., *Sciense*, 1984, 223, 285-286. Apud in SOARES, T. A. e LINS, R. D., "Ribozimas: nem toda enzima é proteína", *Química Nova*, 1995, 18, 4, 375-378.
- GUERRIER-TAKADA, C., GARDINER, K., MARSH, T. L., PACE, N. and ALTMAN, S.; *Cell*, 1983, 35, 849-857. Apud in SOARES, T. A. e LINS, R.

- D., "Ribozimas: nem toda enzima é proteína", *Química Nova*, 1995, **18** (4), 375-378.
- GUILBAULT, G. G., "Analytical uses of immobilized enzymes" Marcel Dekker, Inc., New York, 1984.
- HANGES-MAHR, M. and PUNGOR, E.; "Determination of Reducing Sugars by the Segmented-Flow Method", Hungarian Academic Science, Budapest, 1982, **21**, 307-315.
- HART, F. L. AND FISHER, H. J.; "Modern Food Analysis", New York, Springer-Verlag, 1971, p 519.
- HU, J. and TURNER, A. P. F.; "An Enzyme Electrode for Glucose Consisting of Glucose-Oxidase Immobilized at a Benzoquinone-Modified Carbon Electrode", *Anal. Lett.*, 1991, **24** (1), 15-24.
- HUGHES, S. and JOHNSON, D. C.; "Triple-Pulse Amperometric Detection of Carbohydrates After Chromatographic-Separation", *Anal. Chim. Acta.*, 1983, **149**, 1-10.
- HUGHES, S. MESCHI, P. L. and JOHNSON, D. C.; "Amperometric Detection of Carbohydrates at Platinum-Electrodes in Alkaline-Solutions by Application of a Triple-Pulse Potential Waveform", *Anal. Chim. Acta*, 1981, **132**, 11-22.
- HUMMEL, J. P. and ANDERSON, B. S., *Arch. Biochem. Biophys.* 1965, **112**, 443-447, apud in GUILBAULT, G. G., "Analytical uses of immobilized enzymes" Marcel Dekker, Inc., New York, 1984.
- IKEDA, I., MATSUSHITA, F. and SENDA, M.; "D-Fructose Dehydrogenase-Modified Carbon Paste Electrode Containing p-Benzoquinone as a Mediated Amperometric Fructose Sensor", *Agric. Biol. Chem.*, 1991, **54** (11), 2919-2924.
- JANSEN, E. F. and OLSON, A. C.; *Arch. Biochem. Biophys.*, 1969, **129**, 221 apud in GUILBAULT, G. G., "Analytical uses of immobilized enzymes" Marcel Dekker, Inc., New York, 1984.
- KALCHER, K., KAUFFMANN, J. M., WANG, J. SVANCARA, I. VYTRAS, K. NEUHOLD, C. and YANG, Z.; "Sensors based on carbon paste in electrochemical analysis: A review with particular emphasis on the period 1990-1993", *Electroanal.*, 1995, **7** (1), 5-22.
- KHAN, G. F., KOBATAKE, E., SHINOHARA, H., IKARIYAMA, Y. and AIZAWA, M.; "Molecular Interface for an Activity Controlled Enzyme Electrode and Its Application for the Determination of Fructose", *Anal. Chem.*, 1992, **64**, 1254-1258.

- KINOSHITA, K.; "Carbon - Electrochemical and physiochemical properties", Wiley-Interscience, New York, 1988.
- KOBAMOTO, M., LOFROTH, G., CAMP, P., VANAMBURG, G. and AUGENSTEIN, Z.; *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 1966, **24**, 622-625 apud in BASILIO, C. A.; "Extração, purificação, imobilização, estudo cinético e calorimétrico das enzimas proteolíticas presentes no latex do mamoeiro", UNICAMP, 1995, Tese (Doutorado)-Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas.
- KOBAYASHI, T. and LAIDLER, K. J.; "Kinetic analysis for solid-supported enzymes", *Biochem. Biophys. Acta*, 1987, **302**, 1-10.
- KRUGER, K., GRABOWSKI, P. J. ZAUG, A. J., SANDS, J., GOTTCHELLING, D. E. and CECH, T. R.; *Cell*, 1982, **31**, 147-157. Apud in SOARES, T. A. e LINS, R. D., "Ribozimas: nem toda enzima é proteína", *Química Nova*, 1995, **18** (4), 375-378.
- KUBOTA, L. T., GUSHIKEM, T. PEREZ, J. and TANAKA, A. A.; "Electrochemical Properties of Iron Phthalocyanine Immobilized on Titanium(IV) Oxide Coated on Silica Gel Surface", *Langmuir*, 1995, **11**, 1009.
- KUBOTA, L.T.; GUSHIKEM, Y.; CASTRO, S.C. AND MOREIRA, J.C.; "Preparation and Characterization of Ti(IV) Oxide Grafted Onto Silica on a Silica-Gel Surface", *Colloids Surf.*, 1991, **57**, 11-15.
- LANE, J. H. and EYNON, L.; "Determination of reducing sugars by mean of Fehling solution with methylene blue as internal indicator", *J. of the Society of Chemistry Industry, London*, 1923, **42**, 321-371.
- LANGE, M. A. and CHAMBERS, J. Q.; "Amperometric Determination of Glucose with a Ferrocene-Mediated Glucose-Oxidase Polyacrylamide-Gel Electrode", *Anal. Chim. Acta*, 1985, **175**, 89-97.
- LEHNINGER, A. L.; "Princípios de Bioquímica", Ed. Sarvier, São Paulo, 1993, 8ª impressão.
- LINDAU, G. and RHODIUS, R., *Z. Physik. Chem.* A172, 321, 1935, apud in GUILBAULT, G. G., "Analytical uses of immobilized enzymes" Marcel Dekker, Inc., New York, 1984.
- LOW, N. H. AND SPORNS, P.; "Analysis and Quantitation of Minor Disaccharides and Trisaccharides in Honey, Using Capillary gas-Chromatography", *J. of Food Science*, 1988, **53**, 558-561.
- LOWE, C.R.; *Biosensors*, 1985, **1**, 3.

- LOWMAN, D. W. and MACIEL, G. E.; "Determination of sucrose in sugar beet juices by nuclear magnetic resonance spectrometry", *Anal. Chem.*, **51**, 1, 1979.
- LOWMAN, D. W. AND MACIEL, G. E.; *Anal Chim. Acta*, 1980, **52**, 2018-2021. Apud in GUILBAULT, G. G., "Analytical uses of immobilized enzymes" Marcel Dekker, Inc., New York, 1984.
- MAAH, G. W. AND SISLER, G. H.; *J. Am. Soc. Sugar Beet Technol.*, 1975, **18**, 257. Apud in GUILBAULT, G. G., "Analytical uses of immobilized enzymes" Marcel Dekker, Inc., New York, 1984.
- MANNINO, S and COSIO, M. S.; *Analyst*, "Organic-Phase Enzyme Biosensor for Moisture Determination in Food Products 1994, **119** (9), 2001-2003.
- MARBLE, A., WHITE, P., BRADLEY, R. F. and KRALL, L. P.; "Joslin's Diabetes Mellitus"; 11th ed., Lea and Febiger, Philadelphia, 1971.
- MASOOM, M. and TOWNSHEND, A.; "Simultaneous Determination of Sucrose and Glucose in Mixtures by Flow-Injection Analysis with Immobilized Enzymes", *Anal. Chim. Acta*, 1985, **171**, 185-194.
- MATEO, R. BOSCH, F., PASTOR, A. and JIMENEZ, M.; "Capillary column gas chromatographic identifications of sugars in honey as trimethylsilyl derivatives", *J. Chromatogr.*, 1987, **410**, 319.
- MATSUMOTO, K., HAMADA, °, UKEDA, H. and OSAJIMA, Y.; "Amperometric Flow Injection Derermination of Fructose with na Immobilized Fructose Dehydrogenase Reactor", *Anal. Chem.* 1986, **58**, 2732-2734.
- MATSUMOTO, K., KAMIKADO, H., MATSUBARA, H. and OSAJIMA, Y.; "Simultaneous Determination of Glucose, Fructose and Sucrose in Mixturee by Amperometric Flow Injection Analysis with Immobilized Enzyme Reactors", *Anal. Chem.*, 1988, **60**, 147-151.
- McILVAINE NEILL, R., WEISS, D. E. AND WILLIST, D.; *Aust. J. Chem.*, 1965, **18**, 477. Apud in GUILBAULT, G. G., "Analytical uses of immobilized enzymes" Marcel Dekker, Inc., New York, 1984.
- MEADE, C. P. and CHEN, J. C. P.; "Cane Sugar Handbook: a manual for cane sugar manufacturers and their chemists", 10^a ed. John Wiley, New York, 1977, p947.
- MICHAELIS, L. and MENTEN, M.; *Biochem. Z.*, 1913, **49**, 333. Apud in GUILBAULT, G. G., "Analytical uses of immobilized enzymes" Marcel Dekker, Inc., New York, 1984.

- MOO-YOUNG, M. and KOBAYASHI, T.; "Effectiveness factors for immobilized-enzyme reactions", *Canj. J. Chem. Eng.*, 1972, **50**, 162-165. apud in BASILIO, C. A.; "Extração, purificação, imobilização, estudo cinético e calorimétrico das enzimas proteolíticas presentes no latex do mamoeiro", UNICAMP, 1995, Tese (Doutorado)-Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas.
- MOPPER, K. and JOHNSON, L.; "Reversed-Phase Liquid-Chromatographic Analysis of Dns-Sugars-Optimization of Derivatization and Chromatographic and Application to Natural Samples", *J. Chromatography*, 1983, **256**, 27-38.
- MOPPER, K., DAWSON, R., HANSEN, H. P. AND LIEBEZEIT, G.; "Borate Complex Ion-Exchange Chromatography with Fluorimetric Detection for detection for Determination of Saccharides", *Analytical Chemistry*, 1980, **52**, 2018-2022.
- NELSON, J. M. and GRIFFING, E. G.; "Aplication of Invertase", *J. Am. Chem. Soc.*, 1916, **38**, 1109-1115.
- NORTHROP, J. H.; *Gen. Physiol.*, 1930, **13**, 739. Apud in SOARES, T. A. e LINS, R. D., "Ribozimas: nem toda enzima é proteína", *Química Nova*, 1995, **18** (4), 375-378.
- O'DRISCOLL, K. F. and MERCER, D. G. "Enzymes immobilized. In: Encyclopedia of Polymers Science and Technology" New York 2, 1987, 235-269.
- OGREN, L. and JOHANSSON, G.; *Anal. Chim. Acta*, 1978, **96**, 1.
- OSANN, G.; *Poggendorf's Ann.*, 1845, **67**, 205. Apud in GUILBAULT, G. G., "Analytical uses of immobilized enzymes" Marcel Dekker, Inc., New York, 1984.
- PERES, R. C. D., PERNAUT, J. M. and De PAOLI, M.-A. "Proprieties of Poly(Pyrrole) Films Electrochemically Synthesized in the Presence of Surfactants", *Synth. Met.*, 1989, **28**, c59-c64.
- PERES, R. C. D.; "Estudo, síntese e propriedades de poli (pirrol) dodecilsultato", IQ-UNICAMP, 1989; *Dissertação de Mestrado* - Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas.
- RAMIREZ, M. T., PALOMAR, I., GONZÁLEZ, I. and ROJAS-HERNÁNDEZ, A.; "Carbon paste electrodes with electrytic binder: influence of the preparation method", *Electroanal.*, 1995, **7** (2), 184-188.
- RUIZ, B. L., DEMPSEY, E., HUA, C., SMYTH, M. R. and WANG, J.; *Anal. Chim. Acta*, 1993, **273**, 425-430. Apud in GILMATRIN, M. A. T. and

- HART, J. P., "Sensing with chemically and biologically modified carbon electrodes - A review", *Analyst*, 1995, **120**, 1029-1045.
- RUZICKA, J. and HANSEN, E. H.; "A new Potentiometric gas sensor - the air-gas electrode", *Anal. Chim. Acta*, 1974, **69**, 129-141.
- SCHIFFREEN, R. S., HANN, A. D., BOWERS, L. D. and CARR, P. W.; "Analytical aspects of immobilized enzymes columns", *Anal. Chem.*, 1977, **49**, 1929-1939.
- SCHLENOFF, J. B. and XU, H.; "Evolution of Physical and Electrochemical Properties of Polypyrrole During Extended Oxidation", *J. Electroanal. Soc.*, 1992, **139**, v9, 2397-2401.
- SCHUHMANN, W.; "Conducting Polymer Based Amperometric Enzyme Electrodes", *Mikrochimica Acta*, 1995, **121**, 1-29.
- SCOUTEN, W. H., LUONG, J. H. T. and BROWN, R. S.; "Enzyme or Protein Immobilization Techniques for Applications in Biosensor Design", *Tibtech*, 1995, **13**, 178-185.
- SHAW, P. E., WILSEN, C. W. and KNIGHT, JR., R. J.; "High-Performance Liquid-Chromatographic Analysis of D-Manno-Heptulose, Perseitol, Glucose, and Fructose in Avocado Cultivars", *J. Agric. and Food Chem.*, 1980, **28**, 379-382.
- SILMAN, I. H. and KATCHALSKI, E.; *Ann. Rev. Biochem.* 1966, **35**, 873 apud in GUILBAULT, G. G., "Analytical uses of immobilized enzymes" Marcel Dekker, Inc., New York, 1984.
- SILVA, V. L., "Construção e avaliação de eletrodo enzimático para determinação de uréia utilizando canavalia marítima". UNICAMP, 1991, Tese (Doutorado)-Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas.
- SKOOG, D. A., WEST, D. M. and HOLLER, F. J.; "Analytical Chemistry *An Introduction*", Saunders College Publishing, Philadelphia, 1994, Sixth Edition.
- SOARES, T. A. e LINS, R. D., "Ribozimas: nem toda enzima é proteína", *Química Nova*, 1995, **18** (4), 375-378.
- SOLONIEWICZ, R. and TEODORCZYK, M.; "Spectrophotometric determination of reducing sugars with aromatic nitro compounds", *Mikrochim. Acta* 1982, **1**, 105-114.

- SOMOGYI, M.; *J. Biological Chemistry*, 1945, 160, 61. Apud in GUILBAULT, G. G., "Analytical uses of immobilized enzymes" Marcel Dekker, Inc., New York, 1984.
- STANEK, J., CERNY, M., KOCOUREK, J. and PACAK, J.; "The monosacharides", New York, Academic Press, 1963, 1006p.
- SUMMER, J.; *J. Biol. Chem.*, 1926, 69, 435. Apud in SOARES, T. A. e LINS, R. D., "Ribozimas: nem toda enzima é proteína", *Química Nova*, 1995, 18 (4), 375-378.
- TANIMOTO, T. and BURR, G. O.; "The Hawaiian Planters Record", 1964, 57, 151.
- TREVAN, M. D.; "Immobilized Enzymes - Na introduction and applications in biotechnology", New York, John Wiley & Sons, 1980, 19p.
- TURNER, A.P.; KARUBE, I. AND WILSON, G. (Eds.), "Biosensors: Fundamental and Applications", Oxford Scientific, Oxford, 1987.
- TVERHINOVA, E. A., LOBODA, N. I. and POLTORAK, O. M.; *Vestn. Morsk. Univ. Khim.*, 1971, 12, 526-529 apud in BASILIO, C. A.; "Extração, purificação, imobilização, estudo cinético e calorimétrico das enzimas proteolíticas presentes no latex do mamoeiro", UNICAMP, 1995, Tese (Doutorado)-Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas.
- UPDIKE, S. J. and HICKS, G. P.; *Nature*, 1971, 214, 986 apud in GUILBAULT, G. G., "Analytical uses of immobilized enzymes" Marcel Dekker, Inc., New York, 1984.
- VALLEE, B. L. and RIORDAM, J. F. *Ann. Rev. Biochem.* 1969, 38, 733 apud in GUILBAULT, G. G., "Analytical uses of immobilized enzymes" Marcel Dekker, Inc., New York, 1984.
- VIDAL-VALVERDE, C., MARTIN-VILA, C., OLMEDILLA, B. and BLANCO, I.; "High-Performance Liquid-Chromatographic Systems to Separate and Quantify a Mixture of 9 Sugars and 4 Polyols", *J. Liq. Chromatogr.*, 1985, 8, 75-94.
- VOROBÉVA, E. S. and POLTORAK, O. M., *Vestn. Mosk. Univ. Khim.*, 21, 17, 1966 apud in GUILBAULT, G. G., "Analytical uses of immobilized enzymes" Marcel Dekker, Inc., New York, 1984.
- WANG J; NASER N.; "Improved performance of carbon paste amperometric biosensors through the incorporation of fumed silica", *Electroanalysis*, 1994 6 (7), 571-575.

- WANG, J. and TAHA, Z.; "Catalytic-Oxidation and Flow Detection of Carbohydrates at ruthenium Dioxide Modified Electrodes", *Analytical Chemistry*, 1990, **62**, 1413-1416.
- WARBURG, O.; *Wassenstoffubertragende Fermente*, Springer Verlag, Berlin, 1948 Apud in GUILBAULT, G. G., "Analytical uses of immobilized enzymes" Marcel Dekker, Inc., New York, 1984.
- WHITE, A., HANDLER, P. and SMITH, E. L.; "Principles of Biochemistry", New York, McGraw-Hill, 1954, p 1070.
- WOOD, W. A., FETTING, R. A. and HERTLEIN, B. C.; "Gluconic dehydrogenase from pseudomonas fluorescens", *Methods Enzymol.*, 1962, **5**, 265-291.
- WU, H. N. and LAI, M. M. C.; *Sciense*, 1989, 243, 652-654. Apud in SOARES, T. A. e LINS, R. D., "Ribozimas: nem toda enzima é proteína", *Química Nova*, 1995, **18** (4), 375-378.
- YAMADA, Y., AINDA, K. and UEMURA, T.; "Enzymatic Studies on the Oxidation of Sugar and Sugar Alcohol", *J. of Biolchem.*, 1967, **61** (2), 636-646.
- ZENTGRAF, B. and RINGPFEIL, M.; "Natural Sources of more Stable Enzymes", *Pure Appl. Chem.*, 1991, **63**, 1528-1533.

A new amperometric biosensor for fructose using a carbon paste electrode modified with silica gel coated with Meldola's Blue and fructose 5-dehydrogenase

Carlos A.B. Garcia, Graciliano de Oliveira Neto, Lauro T. Kubota^{*}, Luciane A. Grandin

Instituto de Química, Unicamp, CP 6154, 13083 Campinas, SP, Brazil

Received 15 November 1995; revised 14 March 1996

Abstract

A carbon paste modified with silica gel coated with Meldola's Blue and fructose 5-dehydrogenase was used to construct a new biosensor for fructose. An efficient electron transfer mediation from the reduced enzyme to the carbon paste electrode was verified, at a low applied potential of 20 mV vs. SCE, where interfering reactions are minimized. A linear response range for 0.1 to 0.8 mmol l⁻¹ fructose was adjusted by the equation $I = 0.0150(\pm 0.006) + 0.618(\pm 0.011)$ [fructose], with a correlation coefficient of 0.999 and an rsd of 0.68% for $n = 7$. The biosensor was used to determine fructose in sweets and fruit jellies and the results present good recovery, higher than 96% in both cases. A stable response is observed over two months, when stored in a refrigerator, or for 300 measurements in continuous use.

Keywords: Biosensors; Fructose; Meldola's Blue mediator; Modified silica gel; Fructose 5-dehydrogenase

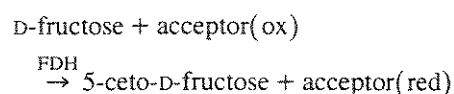
1. Introduction

Nowadays, the necessity for determination of sugar in food and biological fluids for quality control and disease diagnostics, such as in diabetes, has received much attention in clinical and industrial analysis [1,2]. Several methods for glucose and fructose determination have been developed in recent years [3,4]. Analytical techniques such as titration [5], polarimetry [6], gas-liquid chromatography [7,8], spectrophotometry [9,10], enzymatic analysis [11], NMR spectrometry [12], fluorimetry [13] and electrochemistry [14–18] have been described in the literature for determination of sugars in food and blood. However, various studies are being carried out to obtain faster and more selective methods for monitoring sugar species in situ [19].

A great number of biosensors have been developed for clinical and food analysis [20,21]. However, few papers concerning a fructose sensor have been published, although this sugar is frequently used as a dietetic sweetener. Presumably, this is related to the need to use three kinds of enzyme (hexokinase, EC 2.7.1.1, phosphoglucose iso-

merase, EC 5.1.3.9 and glucose-6-phosphate dehydrogenase, EC 1.1.1.49) plus two co-enzymes (ATP and NADP), which increase the cost and complexity of the analysis [22].

Yamada et al. [23] discovered the enzyme D-fructose 5-dehydrogenase (FDH, EC 1.1.99.11) some years ago, and confirmed that the enzyme catalyzes the oxidation of D-fructose to 5-ceto-D-fructose. Recently, Prado and Sampietro [24] described the purification and properties of D-fructose 5-dehydrogenase from *Gluconobacter Industrius*. They verified the possibility of its use in the quantitative determination of D-fructose. The reaction catalyzed by the enzyme can be represented as



Several acceptors can be used in this reaction in the same way as for glucose oxidase. Thus, acceptors such as ferrocene [25], quinone [26], phenoxazine [27] can be used to construct a biosensor. However, in the majority of the works, the mediators are not stable and are leached from the support. The surfaces of these electrodes need to be renewed after some measurements. So, the immobilization procedure is very important to obtain an efficient and

^{*} Corresponding author.

stable electrode. Although the mobility of the mediator is low when it is chemically immobilized, the stability is high. Thus, when a chemically immobilized mediator presents a good charge transfer between the enzyme and the electrode, it can be very interesting to develop a biosensor.

In previous work, we reported a modified carbon paste electrode on which Meldola's Blue was immobilized on silica gel coated with titanium phosphate [28]. This electrode may be used for the development of an amperometric biosensor for fructose. The low redox potential of this mediator is very important to avoid interferences, such as from ascorbic acid, cysteine, etc. [29,30], and the stability of the immobilized mediator yields biosensors with a long lifetime. This work describes the development and performance of a biosensor for fructose using an electrode of carbon paste modified with silica gel coated with Meldola's Blue and fructose 5-dehydrogenase.

2. Experimental

The procedure for grafting titanium(IV) oxide onto a silica gel surface was described in a previous work [31]. Silica gel (Fluka) having a specific area of $500\text{ m}^2\text{ g}^{-1}$, an average pore diameter of 6 nm and a particle size between 0.025 and 0.2 mm, previously activated at 150°C for 4 h under vacuum (10^{-4} Torr), was used in this work. The amount of titanium was determined by gravimetric analysis after being leached from the silica surface with hot concentrated HCl solution. This material will be denoted ST in the following.

Phosphate was grafted onto the ST surface by adding 20 g of this material to 200 ml of an aqueous H_3PO_4 solution (0.1 mol l^{-1}) and the mixture was shaken for 8 h. The solid was washed and filtered with demineralized water in a sintered glass funnel. The solid obtained was dried on a vacuum line at 80°C . The amount of phosphate grafted onto ST was determined by spectrophotometry. This material will be denoted STP in the following.

The immobilization of Meldola's Blue was carried out by immersing about 2 g of STP in 20 ml of 0.5% (m/v) aqueous dye solution. The mixture was shaken for 10 min and the solid was filtered, washed and dried under vacuum at room temperature. The quantity of immobilized mediator was determined by elemental analysis. This material will be denoted STPM in the following.

The electronic spectra of soluble Meldola's Blue and of that adsorbed on an STP surface were obtained by making a suspension of STPM in carbon tetrachloride in a 1 mm optical cell. The spectrum was recorded from 400 up to 800 nm on a Cary 2300 spectrophotometer. Carbon tetrachloride was used in this case because its refractive index is very similar to that of silica [32].

The electrode was prepared by mixing 100 mg of graphite (Fluka), 100 mg of STPM, 20 mg of FDH (Sigma) and some drops of mineral oil, and this mixture was

homogenized. About 5 mg of this paste was put into the cavity of a platinum electrode fixed at 1 mm depth in a glass tube extremity with 4 mm internal diameter. The biosensor was stored in a McIlvaine buffer (pH 4.5) at 5°C .

A saturated calomel electrode (SCE) was used as the reference electrode and a platinum wire as the auxiliary electrode. All measurements were carried out in a PG-STAT20 potentiostat from Echo Chemie after deaeration with pure nitrogen for 10 min. The volume used in the measurements was 5 ml of McIlvaine buffer (pH 4.5). The fixed potential to make the amperometric measurements was 25 mV vs. SCE, except when modified to verify the potential effect on biosensor response.

The samples were prepared by dissolving about 0.5 g of the sweet or 1 g of the fruit jelly in 25.00 ml of twice distilled water. Then, 50 μl of this solution was added to the cell containing 5 ml of measurement buffer.

3. Results and discussion

3.1. Preparation and characteristics of the modified silica

The specific surface area of the silica coated with titanium(IV) oxide decreases from 500 to $420\text{ m}^2\text{ g}^{-1}$, as determined by the BET method. This decrease was assigned to the coalescence of some pores and/or blocking of some of the smaller pores during the coating reaction [33]. The amount of titanium coated on the silica surface was similar to other preparations [31], i.e. 1.0 mmol g^{-1} . The reaction between titanium tetrachloride and silanol groups and the hydrolysis of chloride ions were described in earlier work [31]. In the second step, the phosphate reacts with the hydrated titanium oxide on the silica surface as described by Kubota et al. [28]. The resulting material was denoted STP. The amount of phosphorus, determined by spectrophotometry, was 0.136 mmol g^{-1} . This value indicates that not all the titanium atoms react with phosphate, presumably due to the steric hindrance of the titaniums in the smaller pores.

Meldola's Blue was adsorbed onto this material and the quantity of dye on STP, determined by elemental analysis, was $68\text{ }\mu\text{mol g}^{-1}$. The electronic spectra of Meldola's Blue dissolved in solution and adsorbed on STP were similar, but a shift of the maximum of absorption from 525 nm towards 575 nm was observed. This behavior indicates that there is significant interaction between phosphate groups and the dye (Fig. 1).

3.2. Electrochemical properties

The redox couple of the Meldola's Blue adsorbed on STP was described in an earlier paper [28], showing a midpoint potential of -25 mV vs. SCE. Fig. 2 presents the cyclic voltammograms of the carbon paste electrodes mod-

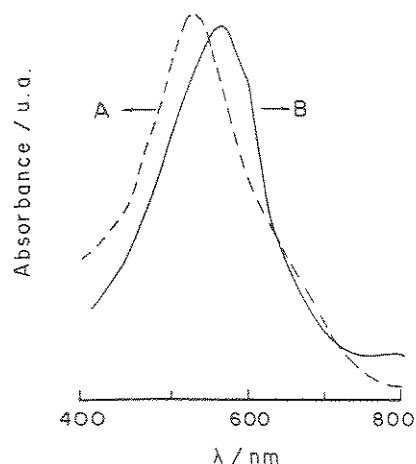


Fig. 1. Visible spectra obtained for Meldola's Blue (A) dissolved and (B) adsorbed on STP.

ified with (A) STPM and (B) STPM plus FDH, obtained in McIlvaine buffer. The midpoint potential was -50 mV vs. SCE, showing that the buffer causes a shift of the midpoint potential. FDH did not influence the electrochemical behavior of the Meldola's Blue adsorbed on STP, but a higher current was observed, indicating that the enzyme increases the resistance and/or permits an easier diffusion of the ions into the paste. This behavior can be explained by the diffusion facility of the ions into the paste, i.e. when the enzyme is added to make a paste it becomes easier for the ions to diffuse through the paste, increasing the electrochemical rugosity. However, the major contribution should be assigned to the higher rugosity of the biosensor caused by the enzyme. The experiment carried out to check this behavior showed that the capacity current increased 25 times when the enzyme was added. This behavior suggests that the effective electrode area is increased when the enzyme is added.

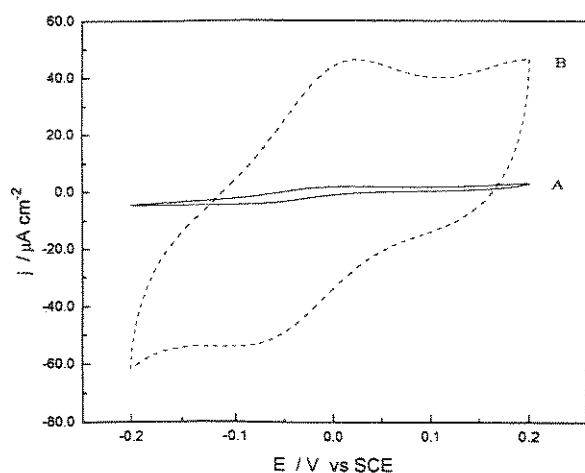


Fig. 2. Cyclic voltammogram obtained with the carbon paste electrode at 20mVs^{-1} , in McIlvaine buffer at pH 4.5 solution of (A) STPM and (B) STPM + enzyme (fructose 5-dehydrogenase).

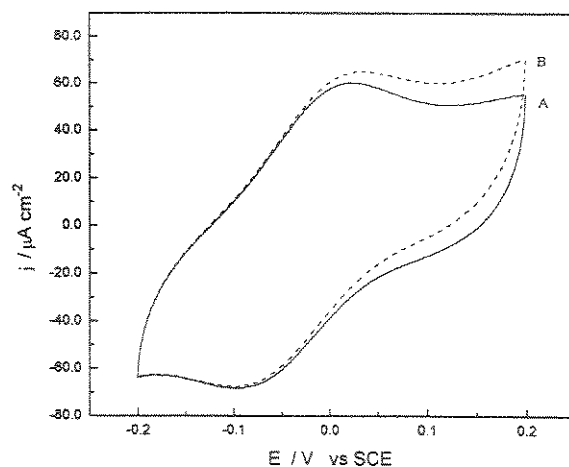


Fig. 3. Cyclic voltammogram obtained with the biosensor at 20mVs^{-1} , in McIlvaine buffer at pH 4.5, (A) without fructose and (B) with 10mmol l^{-1} fructose.

The properties of the enzyme and mediator to electro-oxidize fructose can be observed in Fig. 3. This behavior is evidence that the biosensor is sensing the electrocatalyses of the enzymatic reaction. The observed current is not high, but it is enough to use the biosensor in direct determinations. Fig. 4 shows that the best composition of the biosensor has 10% enzyme added to the paste. At lower quantities of enzyme the current was low, probably because the amount of enzyme is not enough to react with all the substrate. For more than 10%, the resistance became very high, making the electron transfer in the paste difficult and so decreasing the response.

The influence of pH on the biosensor response is presented in Fig. 5. The best range of pH was similar to that observed for the best activity of FDH [23]. For pH lower than 3 and higher than 7 the biosensor became inactive, presumably due to enzyme denaturation.

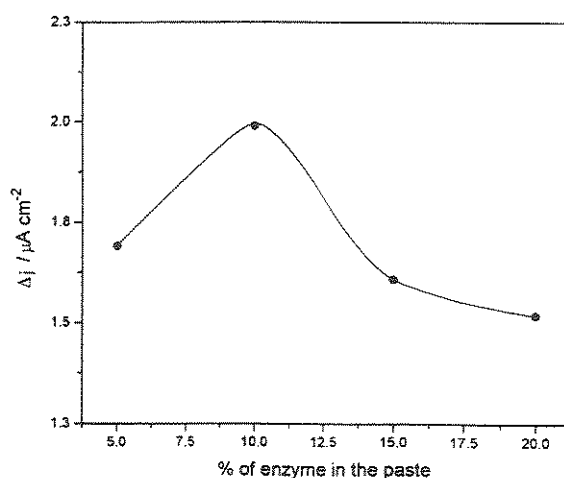


Fig. 4. Effect of enzyme percentage on amperometric biosensor response, in McIlvaine buffer at pH 4.5 at an applied potential of 20mV vs. SCE and a fructose concentration of 0.5mmol l^{-1} .

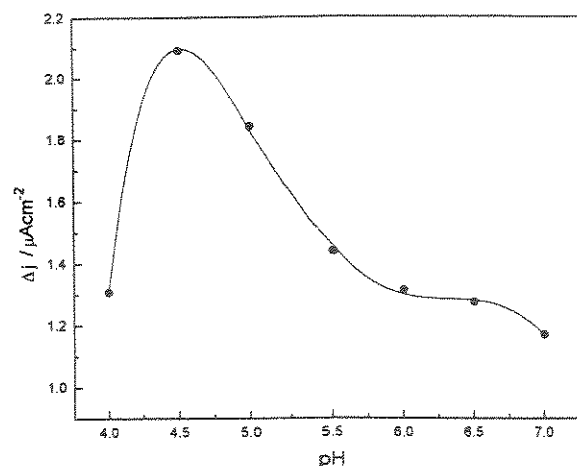


Fig. 5. The influence of solution pH on biosensor response, obtained at an applied potential of 20 mV vs. SCE and a fructose concentration of 0.5 mmol l^{-1} .

Fig. 6 shows calibration curves obtained with different applied potentials, suggesting that the applied potential affects the sensitivity of the biosensor response significantly. An important point that should be considered in this case is the low applied potential (20 mV vs. SCE) needed to obtain great sensitivity of the biosensor. This potential is low enough to eliminate interference problems, such as from ascorbic acid, urate, cystein, etc. [30,34].

The response time, i.e. the time for the current to reach the maximum, was very low compared with other biosensors described in the literature [29], about 6 s, as can be seen in Fig. 7.

3.3. Fructose sensing

In Fig. 8 the current versus fructose concentration is plotted. At the beginning a linear relation is observed, and

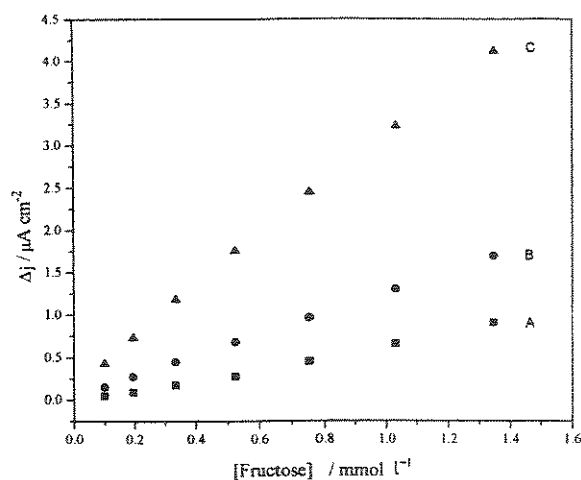


Fig. 6. The dependence of the response of the fructose biosensor on electrode potential, obtained in McIlvaine buffer at pH 4.5. (A) – 40 mV, (B) 20 mV and (C) 80 mV vs. SCE.

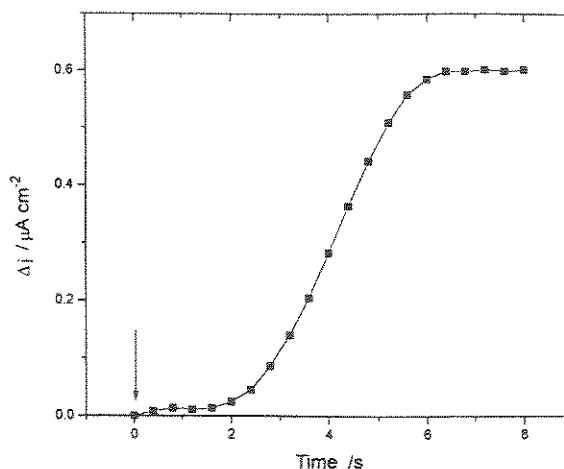


Fig. 7. Dependence of the biosensor response with time after addition of the substrate. The applied potential was 20 mV vs. SCE and the fructose concentration was 0.5 mmol l^{-1} , in 5.0 ml of McIlvaine buffer at pH 4.5.

for a more concentrated range a deviation from linearity is verified. This behavior is probably due to saturation of the active center of the enzyme. The equation adjusted for the linear region (1.0×10^{-4} up to $7.0 \times 10^{-4} \text{ mol l}^{-1}$) can be represented by $I = 0.015(\pm 0.006) + 0.618(\pm 0.011)$ [fructose], with a correlation coefficient of 0.999. The reproducibility of the biosensor response was excellent, obtaining an rsd of 0.68% for 0.5 mmol l^{-1} fructose with $n = 7$.

Interferences were checked in the presence of equal quantities of the interferent and substrate, but no significant influence was observed except for ascorbic acid, which showed an interference of 10%, as can be verified from the results of Table 1. This behavior indicates that the biosensor can be used in fructose determination in real samples which do not have ascorbic acid present. The biosensor was used to determine fructose in sweets and fruit jelly samples without prior treatment. The results

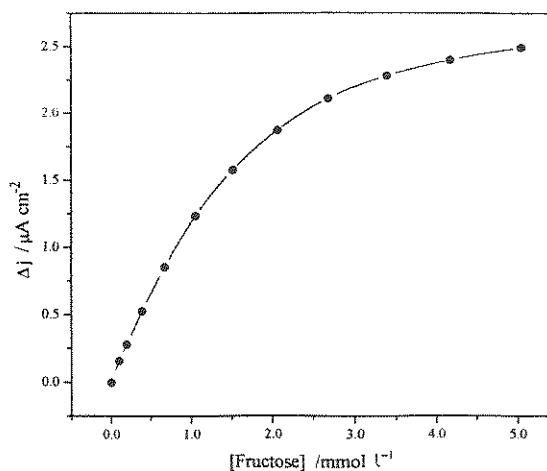


Fig. 8. Dependence of the biosensor response on fructose concentration in McIlvaine buffer at pH 4.5. The operating potential was 20 mV vs. SCE.

Table 1

Influence of interfering compounds on fructose determination using the biosensor based on Meldola's Blue and fructose 5-dehydrogenase coated on silica gel modified with titanium phosphate. The quantities of interferent were $200 \mu\text{mol l}^{-1}$

Interferent	Quantity of fructose found / $\mu\text{mol l}^{-1}$	Recovery / % ^a
Ascorbic acid	180	91
Ethanol	194	98
Galactose	191	96
Glucose	192	97
Ribose	193	96
Sucrose	189	96
Xylose	192	97

^a The amount of fructose added was $198 \mu\text{mol l}^{-1}$.

obtained by different methods do not differ by more than 5% when the standard addition method was used. The recovery of the fructose by the biosensor was always higher than 96%, for either sample.

The stability of the biosensor was very good, allowing continuous use for at least 300 measurements, or for up to two months, when stored in a refrigerator.

4. Conclusions

The simplicity, low applied potential, high stability and good performance of this biosensor show a great potential for use in fructose determination. However, some studies to eliminate the ascorbic acid interference should be carried out to obtain the ideal sensor for fructose, perhaps using the enzyme ascorbate oxidase. This biosensor could be used with success in a flow system, eliminating the ascorbic acid interference with relative ease. The great efficiency may be attributed to the modified silica and enzyme to improve the stability and selectivity, at a low applied potential, although the electron shuttle between enzyme and electrode may be decreased. The high surface area of the silica contributes to minimizing this effect, keeping a good sensitivity.

Acknowledgements

The authors thank FAPESP for financial support and Professor Carol Collins for English revision of the manuscript. C.A.B.G. is indebted to CAPES for a fellowship.

References

- [1] P.E. Shaw, C.W. Wilson and R.J. Knight, *J. Agric. Food Chem.*, **28** (1980) 379.
- [2] A. Marble, P. White, R.F. Bradley and L.P. Krall, *Joslin's Diabetes Mellitus*, Lea and Febiger, Philadelphia, PA, 11th edn., 1971.
- [3] J. Wang and N. Naser, *Electroanalysis*, **6** (1994) 571.
- [4] A. Begum, E. Kobatake, T. Suzawa, Y. Ikariyama and M. Aizawa, *Anal. Chim. Acta*, **280** (1993) 31.
- [5] C.P. Meade and J.C.P. Chea, *Cane Sugar Handbook*, Wiley, New York, 1977, p. 947.
- [6] G.W. Maah and G.H. Sisler, *J. Am. Soc. Sugar Beet Technol.*, **18** (1975) 257.
- [7] R. Mateo, F. Bosch, A. Pastor and M. Jimenez, *J. Chromatogr.*, **410** (1987) 319.
- [8] N.H. Low and P. Spouns, *J. Food Sci.*, **53** (1988) 558.
- [9] I.H. Abu-Lehia, *Food Chem.*, **24** (1987) 233.
- [10] M. Masoom and A. Townsend, *Anal. Chim. Acta*, **171** (1985) 185.
- [11] E. Csöregi, L. Gorton and G. Makro-Varga, *Anal. Chim. Acta*, **273** (1993) 59.
- [12] D.W. Lowman and G.E. Maciel, *Anal. Chem.*, **51** (1979) 85.
- [13] J. Mopper, R. Dawson, G. Liebezeit and H.P. Hansen, *Anal. Chem.*, **52** (1980) 2018.
- [14] S. Hughes, P.L. Meschi and D.C. Johnson, *Anal. Chim. Acta*, **132** (1981) 11.
- [15] S. Hughes and D.C. Johnson, *Anal. Chim. Acta*, **149** (1983) 1.
- [16] J. Wang and Z. Taha, *Anal. Chem.*, **62** (1990) 1413.
- [17] S.K. Beh, G.J. Moody and J.D.R. Thomas, *Analyst*, **114** (1989) 29.
- [18] A. Amine, J.M. Kauffmann, G.G. Guilbault and S. Bacha, *Anal. Lett.*, **26** (1993) 1281.
- [19] A.P. Turner, I. Karube and G. Wilson (Eds.), *Biosensors: Fundamental and Applications*, Oxford Scientific, Oxford, 1987.
- [20] C.R. Lowe, *Biosensors*, **1** (1985) 3.
- [21] M. Shimohigoshi, K. Yokoyama and I. Karube, *Anal. Chim. Acta*, **303** (1995) 295.
- [22] K. Matsumoto, H. Kamikado, H. Matsubara and Y. Osajima, *Anal. Chem.*, **60** (1988) 147.
- [23] Y. Yamada, K. Aida and I. Uemura, *Agric. Biol. Chem.*, **30** (1966) 95.
- [24] F.E. Prado and A.R. Sampietro, *Biotechnol. Appl. Biochem.*, **19** (1994) 361.
- [25] S.K. Beh, G.J. Moody and J.D.R. Thomas, *Analyst*, **116** (1991) 459.
- [26] E.Y. Kutz and A.A. Solovev, *Anal. Chim. Acta*, **266** (1992) 97.
- [27] J. Kulys, L. Wang, H.E. Hansen, T. Buch-Rasmussen, J. Wang and M. Ozsoz, *Electroanalysis*, **7** (1995) 92.
- [28] L.T. Kubota, F. Gouvea, A.N. Andrade, B.G. Milagres and G. de Oliveira Neto, *Electrochim. Acta*, **41** (1996) 1465.
- [29] G. Bremle, B. Persson and L. Gorton, *Electroanalysis*, **3** (1991) 77.
- [30] Y.S. Fung and S.Y. Mo, *Electroanalysis*, **7** (1995) 160.
- [31] L.T. Kubota, Y. Gushikem, S.C. Castro and J.C. Moreira, *Colloids Surf.*, **57** (1991) 11.
- [32] Y. Gushikem and J.C. Moreira, *J. Colloid Interface Sci.*, **107** (1985) 70.
- [33] D.R. Vollet, J.C. Moreira, Y. Gushikem, L.T. Kubota and J.A. Varella, *Colloids Surf.*, **40** (1989) 1.
- [34] L. Gorton, G. Jonsson-Pettersson, E. Csöregi, K. Johansson, E. Dominguez and G. Makro-Varga, *Analyst*, **117** (1992) 1235.