

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE QUÍMICA

ANA PAULA DA SILVA BITELO

DESENVOLVIMENTO DE UM BIOSSENSOR ELETROQUÍMICO DE GLICOSE
PARA SER APLICADO NA INDÚSTRIA DE HIDRÓLISE DE AMIDO E
LABORATÓRIO DE CONTROLE DE QUALIDADE DE ALIMENTOS

Porto Alegre, 2016.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE QUÍMICA

ANA PAULA DA SILVA BITELO

DESENVOLVIMENTO DE UM BIOSSENSOR ELETROQUÍMICO DE GLICOSE
PARA SER APLICADO NA INDÚSTRIA DE HIDRÓLISE DE AMIDO E
LABORATÓRIO DE CONTROLE DE QUALIDADE DE ALIMENTOS

Trabalho de conclusão de curso apresentado junto à atividade de ensino “Projeto Tecnológico” do curso de Química Industrial, como requisito parcial para a obtenção do grau de Químico Industrial.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Leliz Ticona Arenas

Porto Alegre, 2016.

Dedico este trabalho em primeiro lugar a Deus e a todos que de uma forma ou outra colaboraram, proporcionando a construção e a realização deste trabalho. Em especial, dedico ao meu marido Jeremias Panizzon e ao meu pai, Milton Bitelo, que deram um suporte muito importante composto por apoio, compreensão e carinho durante estes anos.

AGRADECIMENTOS

À Deus, autor do entendimento humano. À minha família, em especial ao amor Jeremias Panizzon e ao meu pai Milton Bitelo, por todo apoio que sempre me deram, pelo incentivo e por estarem presentes em momentos importantes da minha vida.

À professora Dr^a. Leliz Ticoná Arenas pela orientação, ensinamentos, entusiasmo, apoio, dedicação e oportunidade de realização deste trabalho.

À professora Dr^a. Eliana Weber de Menezes pelo apoio, colaboração e oportunidade.

Aos professores Dr. Edilson Valmir Benvenuti e demais professores pelos ensinamentos e toda contribuição para a minha formação acadêmica.

Aos demais professores colaboradores pela disponibilidade, paciência e grande contribuição na realização de etapas importantes desse trabalho, o meu muito obrigada.

A todos os meus amigos pelos momentos de distração e alegria, os quais tenho um grande carinho.

RESUMO

Os biossensores são ferramentas analíticas que combinam biomoléculas imobilizadas com transdutores químicos ou físicos para criar uma superfície que permita a medição direta de um analito específico. Um fator importante no desenvolvimento de um biossensor eletroquímico está na imobilização e estabilização das enzimas sobre os substratos condutores. A habilidade de controlar a interação da enzima com a superfície dos sólidos é um desafio devido à complexidade das moléculas e, principalmente, ao direcionamento espacial da enzima na adesão. Uma forma de contornar esta distribuição seria a formação de um filme fino de enzimas sobre a superfície de substratos condutores, o qual permitiria uma distribuição homogênea da enzima impedindo sua aglomeração. Desta maneira os sítios ativos da enzima ficam mais disponíveis no processo de transferência de elétrons, facilitando que este processo seja muito mais eficiente e permitindo que o biossensor seja mais sensível. Neste trabalho foi realizada a obtenção de um filme de óxido misto $\text{Nb}_2\text{O}_5/\text{SiO}_2$ sobre a superfície de uma placa condutora de FTO-vidro, esta matriz serviu como base para a imobilização da enzima glicose oxidase (GOX) permitindo desenvolver um biossensor eletroquímico de glicose estável e reprodutível nas medidas. Uma das maneiras de aumentar a sensibilidade e diminuir o limite de detecção da glicose é a incorporação de nanopartículas metálicas de Au (AuNp). As AuNp tem a propriedade facilitar a transferência de elétrons aumentando a área eletroativa, tornando os sensores eletroquímicos mais sensíveis. Neste trabalho foi incorporado AuNp nos filmes $\text{Nb}_2\text{O}_5/\text{SiO}_2$ realizando-se um estudo da quantidade suficiente de AuNp que facilite a transferência de elétrons no sistema. Posteriormente no sistema $\text{Nb}_2\text{O}_5/\text{SiO}_2$ -AuNp foi imobilizado na forma de filme a enzima GOX utilizando-se o novo material obtido como sensor para glicose. Foi observado que a adição de AuNp contribuiu favoravelmente para a quantificação da glicose e que o biossensor construído tem grande potencial para ser utilizado nos laboratórios de controle de qualidade da indústria alimentícia.

Palavras-chave: Glicose. Biossensor eletroquímico. Hidrólise do amido. Imobilização de enzimas.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	10
2. ESTADO DA ARTE	12
2.1. BIOSSENSORES.....	12
2.2. PENTÓXIDO DE NIÓBIO (Nb_2O_5)	15
2.3. AMIDO	16
2.3.1. Composição, estrutura e fontes de amido.....	16
2.3.2. Propriedades do amido	18
2.3.3. A Indústria Amideira.....	18
2.3.4. O Mercado Mundial de Amido.....	18
2.3.5. Setores de Aplicação dos Produtos Amiláceos.....	19
2.3.6. Produção de xaropes de glucose a partir do milho	20
2.3.6.1. A Hidrólise Enzimática do Amido.....	20
2.3.7. Hidrolisados de amido.....	21
2.3.7.1. Glicose	22
3. SITUAÇÃO ATUAL	23
4. OBJETIVOS	25
4.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	25
5. PROPOSTA TECNOLÓGICA	26
6. METODOLOGIA	27
6.1. OBTENÇÃO DO FILME NANOESTRUTURADO Nb_2O_5/SiO_2 NA SUPERFÍCIE DE UM SUBSTRATO CONDUTOR FTO.....	27
6.2. FORMAÇÃO DE FILMES DE NANOPARTÍCULAS DE OURO (AuNp) NA SUPERFÍCIE Nb_2O_5/SiO_2	28
6.3. FORMAÇÃO DE FILMES DE ENZIMA GLICOSE OXIDASE (GOx) NA SUPERFÍCIE DO Nb_2O_5/SiO_2 -FTO MODIFICADA COM AuNp	28
6.4. MEDIDAS ELETROQUÍMICAS	29
6.4.1. Célula Eletroquímica.....	29
6.4.2. Eletrodo de Trabalho.....	30
6.4.3. Eletrodo de Ag/AgCl.....	30
6.4.4. Contra-Eletrodo.....	31
6.4.5. Caracterização eletroquímica das placas Nb_2O_5/SiO_2 -FTO modificadas com AuNp	31
6.4.6. Obtenção da curva de calibração para o eletrodo $SiNb_{2/5}xAuNp$ modificada com GOX.....	31
7. RESULTADOS E DISCUSSÕES	33
7.1. COMPORTAMENTO ELETROQUÍMICO DA GLICOSE OXIDASE IMOBILIZADA NA SUPERFÍCIE DO $SiNb_{2/5}xAuNp$	37
7.2. ATIVIDADE ELETROCATALÍTICA DO FILME $SiNb_{2/5}xAuNp/GOx$ PARA A GLICOSE	40

7.3. ANÁLISE DE INTERFERENTES	42
8. RELAÇÃO DE CUSTOS.....	44
9. CONCLUSÃO	47
REFERÊNCIAS.....	48

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - a: Dispositivo eletrônico analisador de glicose; b: sensores de glicose da marca Accu- Chek; c: Testes de glicose a partir de um biossensor comercial.....	13
Figura 2 - Diagrama esquemático do funcionamento de um sensor	14
Figura 3 - Estrutura da amilose – polímero linear composto por D-glucoses unidas por ligações α -1,4.....	17
Figura 4 - Estrutura da amilopectina – polímero ramificado composto por D-glucoses unidas por ligações α -1,4 e α -1,6.....	17
Figura 5 - Representação dos diversos setores de aplicação dos produtos amiláceos e respectiva quota	19
Figura 6 - Aparato experimental utilizando dipcoating.....	27
Figura 7 - Recipiente de vidro utilizado como célula eletroquímica Erro! Indicador não definido.	
Figura 8 - Biossensor eletroquímico construído	30
Figura 9 - Espectro de absorção na região do UV-Vis das dispersões de AuNPs estabilizadas com SiDbCl ₂	33
Figura 10 - Imagem obtida por microscopia de eletrônica de transmissão das AuNPs.	34
Figura 11 - Espectro de absorção na região do UV-Vis dos filmes SiNb ₂ e SiNb ₂ /5xAuNp.	34
Figura 12 - Voltamogramas cíclicos dos filmes, (A) SiNb ₁ e SiNb ₁ /10xAuNp e (B) SiNb ₂ , SiNb ₂ /5xAuNp e SiNb ₂ /10xAuNp em presença de uma solução K ₃ [Fe(CN) ₆]/K ₄ [Fe(CN) ₆] 1mmolL ⁻¹ e 0.1 mol L ⁻¹ KCl	36
Figura 13 - Voltamograma cíclico do eletrodo SiNb ₂ /5xAuNp/ GOX em tampão fosfato pH=7.....	38
Figura 14 - Voltamogramas cíclicos do eletrodo SiNb ₂ /5xAuNp/ GOX a diferentes velocidades de varredura: 50, 60, 80, 90, 100, 120, 150, 200, 250 e 300mVs ⁻¹ . Em tampão fosfato pH=7	39
Figura 15 - Gráfico de I _{pa} em função da velocidade de varredura.....	39

Figura 16 - Oxidação da molécula de glicose pela ação da enzima glicose oxidase	41
Figura 17 - Voltamogramas cíclicos do eletrodo SiNb ₂ /5xAuNp/ GOX na presença de glicose nas seguintes concentrações: 0,498; 0,990; 1,478; 1,961; 2,439; 2,913; 3,382 e 4,762 mmolL ⁻¹ em tampão fosfato pH=7 a 20 mVs ⁻¹	41
Figura 18 - Relação linear da intensidade de corrente de pico anódico em função da concentração de glicose	42
Figura 19 - Voltamogramas cíclicos do eletrodo SiNb ₂ /5xAuNp/ GOX na presença de 2,44 mmolL ⁻¹ de frutose e maltose	Erro! Indicador não definido.

1 INTRODUÇÃO

O nome Glucose veio do grego *glykys* (γλυκύς), que significa "doce", mais o sufixo -ose, indicativo de açúcar. Tem função de fornecedor de energia, participa das vias metabólicas, além de ser precursora de outras importantes moléculas.

O xarope de milho é um líquido doce e pegajoso utilizado como adoçante na indústria alimentícia. É sintetizado a partir da hidrólise do amido e é composto, principalmente, por glicose. O xarope é utilizado na indústria para formar a textura do alimento mais leve, aumentar volume, prevenir cristalização do açúcar e salientar o sabor. Por ser mais barato que o açúcar comum, ele vem sendo utilizado em larga escala.

A determinação de glicose encontra-se entre as análises físico químicas mais importantes, pois é a partir desta quantificação que se regulamenta e classifica um alimento segundo várias características estabelecidas pela legislação. Os métodos para a determinação de glicose mais utilizados atualmente são o "Checkmate Blood Glucose Monitoring System" e o método Lane e Eynon (DAUDT *et. al*). Porém a precisão dos resultados obtidos é baixa, logo outros métodos vêm sendo estudados dentre eles, os biossensores eletroquímicos. Estes são de fácil manipulação, seletivos e apresentam muitas vezes baixo limite de detecção, além de possuir uma boa precisão e baixo custo.

Um critério importante no desenvolvimento de um biossensor eletroquímico está na imobilização das enzimas sobre a superfície vítrea condutora. A capacidade de monitorar o contato da enzima com a superfície dos sólidos é um desafio devido à geometria das moléculas e, sobretudo, ao seu arranjo espacial. Um caminho opcional para evitar esta situação é a síntese de um filme fino de enzimas, o qual contribui para uma homogeneidade do filme. Isto faz com que os sítios ativos fiquem mais desimpedidos, facilitando a troca de elétrons.

Neste trabalho foi realizada a síntese de um filme de óxido misto Nb₂O₅/SiO₂ sobre a superfície vítrea de FTO. Uma das formas de aumentar a sensibilidade e diminuir o limite de detecção da glicose seria a incorporação de nanopartículas metálicas de Au (AuNP). Para isto avaliou-se a quantidade suficiente de AuNP que

facilitasse a transferência de elétrons no sistema, juntamente a GOX immobilizada na forma de filme.

2 ESTADO DA ARTE

2.1 BIOSSENSORES

Os métodos clássicos de determinação de glicose não podem ser aplicados com facilidade e muitas vezes são inviáveis para a indústria alimentícia, por necessitarem de mão de obra especializada e maquinário caro. Assim, surge a necessidade de métodos rápidos, baratos e de fácil operação. A busca por métodos analíticos alternativos levou à junção entre a especificidade biológica e a sensibilidade eletroquímica. O biossensor eletroquímico mostrou-se uma boa alternativa para a detecção do conteúdo de compostos fenólicos uma vez que possui vantagens como fácil (ou nenhuma) preparação da amostra, seletividade, sensibilidade, reprodutibilidade e baixo custo (FREIRE *et.al.*, 2003).

Segundo a IUPAC biossensores eletroquímicos são dispositivos capazes de fornecer informações quantitativas ou semiquantitativas de análises específicas por meio da utilização de um receptor biológico que é mantido em contato direto com um elemento de transdução eletroquímica (THÉVENOT *et al.*, 2001). Dentre os receptores biológicos estão, as enzimas, organelas, tecidos animal e vegetal, microrganismos, anticorpos, ácidos nucleicos e outros. Ainda, os biossensores podem ser classificados, de acordo com o transdutor utilizado, como eletroquímico, entre estes potenciométrico, amperométrico e condutimétrico; óptico, entre estes com medidas de luminescência e fluorescências; e, detectores de massa (CORTES, 2008).

Um ponto crucial na construção de um biossensor é a imobilização da enzima sobre o eletrodo. Este processo auxilia a ligação do substrato à enzima tornando a velocidade da reação máxima e um pH ótimo. Para este processo costuma-se empregar procedimentos de ligação cruzada, ligação covalente, encapsulamento em géis ou membranas e, mais recentemente, impressão em eletrodos (FREIRE, 2002).

Os biossensores eletroquímicos, principalmente os potenciométricos e amperométricos, são os mais utilizados devido à facilidade operacional e alta sensibilidade inerentes ao método. Consistem na medida da variação de potencial e

corrente, respectivamente, que acontecem quando o receptor biológico entra em contato com o analito.

Por trabalharem em baixo potencial os biossensores não possuem os mesmos problemas de interferências encontrados por outros eletrodos eletroquímicos convencionais (FREIRE, 2002).

O primeiro biossensor foi proposto para oxidar a glicose em ácido glucônico usando um eletrodo para, amperometricamente, detectar o consumo de oxigênio, que é proporcional à concentração de glicose (STRADIOTTO; YAMANAKA; ZANONI, 2003).

A glicose oxidase (GOX) é uma flavoproteína que catalisa a oxidação da β -D-glicose pelo oxigênio molecular em glucono- δ -lactone, o qual subsequente e espontaneamente se hidrolisa em ácido glucônico, gerando nessa hidrólise peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Sua descoberta ocorreu em 1928 por Muller, em extratos do fungo *Aspergillus Níger*. Esta é produzida naturalmente por alguns fungos e insetos, onde o seu produto catalítico, H_2O_2 , atua como um agente bactericida e fungicida.

O desenvolvimento de biossensores para o monitoramento de glicose no sangue constitui um importante avanço no sistema de auto-avaliação para pacientes diabéticos. Atualmente, testes de glicose podem ser feitos de forma rápida e prática através de biossensores comerciais. Estes são dispositivos baseados na medida da corrente elétrica gerada pela oxidação da glicose feita pela enzima glicose oxidase. Geralmente esses dispositivos possuem uma leitura na faixa de 10 a 600 mg/dL. Na Figura 1 é mostrado um biossensor comercial da marca *Accu-Chek* e o teste clínico para o monitoramento de glicose (SANTOS, 2012).

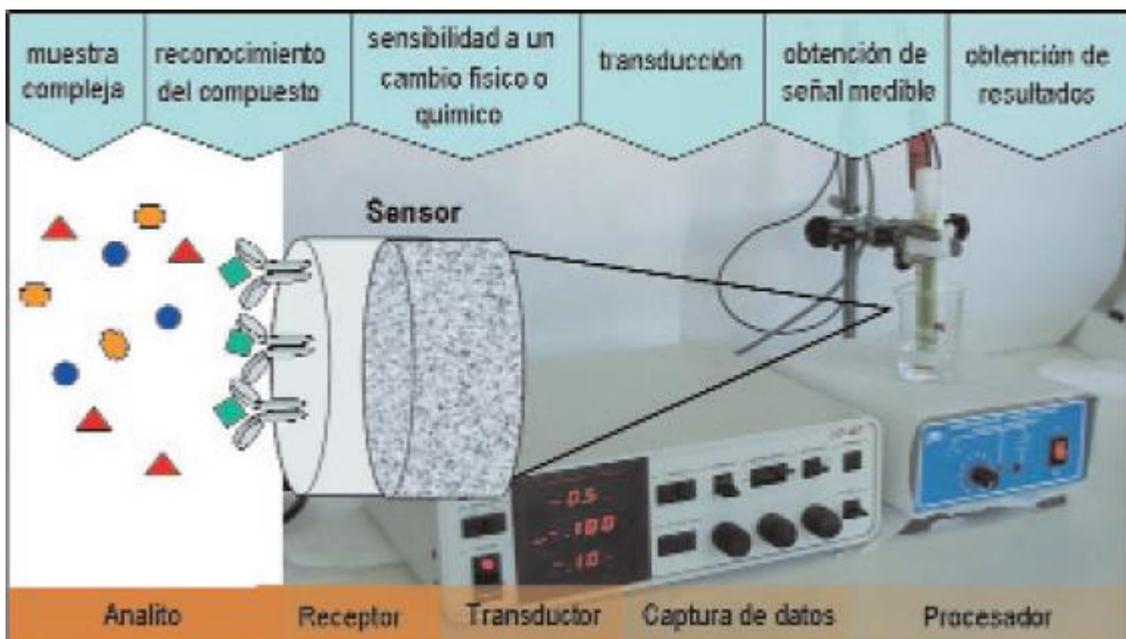
Figura 1 - a: Dispositivo eletrônico analisador de glicose; b: sensores de glicose da marca *Accu-Chek*; c: Testes de glicose a partir de um biossensor comercial



Aplicações de nanomateriais em biossensores têm recebido muito interesse nos últimos anos. Entre os vários biossensores estudados, sensores de glicose têm recebido destaque devido a sua importância em diagnósticos clínicos e análises químicas. Apesar do grande avanço no monitoramento da glicose das últimas décadas, ainda há muitos desafios para alcançar um monitoramento contínuo preciso (SANTOS, 2012).

Os métodos analíticos instrumentais convencionais consistem em HPLC, cromatografia gasosa e eletroforese capilar. Estes baseiam-se nas seguintes etapas: I) posse da amostra; II) tratamento; III) extração; IV) purificação; V) análise cromatográfica e, VI) obtenção de resultados. A figura 1 abaixo mostra um esquema das etapas dos métodos analíticos mais comuns.

Figura 2 - Diagrama esquemático do funcionamento de um sensor



Para garantir a segurança alimentícia, os laboratórios de controle deveriam ser capazes de processar um grande número de amostras em um período curto de tempo. De acordo com requerimentos é importante o desenvolvimento de novas técnicas rápidas, econômicas, sensíveis e capazes de realizar medidas, cujo resultado possa ser usado como alarme para a detecção rápida do risco de contaminação. Devido as características dos biossensores, estes constituem os principais candidatos como ferramentas de análise com numerosas aplicações na

indústria agroalimentária, controle ambiental e saúde humana. As características que mais se destacam destes dispositivos e que os convertem em opções altamente atrativas são: I) sua especificidade, II) alta sensibilidade, III) curto tempo de análise, IV) capacidade de inclusão em sistemas integrados, V) facilidade de automatização, vi) capacidade de trabalhar em tempo real, VI) versatilidade, VII) não destrutivos, o que permite o controle de processos *in situ*, VIII) não contaminante, não prejudica o meio ambiente (PIVIDORI *et. al.*, 2006).

2.2 PENTÓXIDO DE NIÓBIO (Nb_2O_5)

O nióbio pertence à família 5A da tabela periódica, seu número atômico é 41, e sua massa atômica é 92,9064 u. É um metal prateado brilhante com estrutura cúbica de corpo centrado. Quando puro é macio e dúctil, entretanto, impurezas alteram essas propriedades. É o elemento menos eletropositivo da família 5A e seu elétron extra na camada d aumenta fortemente a ligação metal-metal, levando a um alto ponto de fusão, de ebulição e uma entalpia de atomização superior aos seus vizinhos da família 4A. Esta característica também favorece sua aplicação em catálise heterogênea como suporte devido à sua forte ligação com a fase ativa. O nióbio apresenta todos os estados de oxidação de +5 até -1, no entanto o estado de oxidação +5 é o mais estável. O elemento possui 5 grandes classes de compostos, a saber, fosfatos, carbetos, sulfetos, nitretos e óxidos.

O Nb_2O_5 é um semicondutor de grande importância do ponto de vista tecnológico. Suas notáveis propriedades químicas e físicas fazem dele um material promissor para aplicação como adsorvente, sensor de gases, células solares e em componentes eletrocromáticos. São também conhecidas várias aplicações catalíticas dos óxidos nióbio, utilizados como fase ativa ou como suporte. Os óxidos de nióbio aumentam acentuadamente a atividade catalítica e também prolongam a vida do catalisador quando adicionado em pequenas quantidades. O Nb_2O_5 tem sido largamente estudado como catalisador em vários tipos de reações tais como a esterificação, hidrólise, condensação, alquilação e desidrogenação. Além disso, o Nb_2O_5 apresenta grande absorção de energia na região do ultravioleta. Esta larga

absorção, associada a adequadas propriedades eletrônicas e texturais, o torna um potencial candidato para aplicações em fotocatalise heterogênea. (LOPES, *et. al.*, 2015).

2.3 AMIDO

2.3.1 Composição, Estrutura e Fontes de Amido

O amido é a principal substância de reserva nas plantas superiores e fornece de 70 a 80% das calorias consumidas pelo homem. As fontes comerciais de amido mais importantes são os grãos de cereais, os grãos de leguminosas e as raízes tuberosas. As cinco principais espécies consideradas mundialmente como fontes comerciais de amido são o milho, o trigo, o arroz, a batata e a mandioca.

O armazenamento de amido sob a forma de grânulos é um processo conveniente para a planta uma vez que é uma fonte insolúvel de energia, a qual pode ser gradualmente utilizada através da ação de enzimas, sem aumentar a pressão osmótica. Os depósitos de amido podem ser temporários ou permanentes. Como forma de armazenar temporariamente os produtos da fotossíntese, o amido é produzido em grande quantidade nas folhas dos vegetais. Por outro lado, como reserva permanente de hidratos de carbono para as plantas, o amido é armazenado em órgãos de reserva, tais como as sementes, a medula, os raios medulares e o córtex de caules e raízes.

O amido puro é um pó branco, sem sabor e inodoro, insolúvel em água e álcool. Consiste numa mistura de dois polissacáridos estruturalmente diferentes: a amilose e a amilopectina.

A amilose (Figura 3) é uma molécula linear composta por unidades de D-glucose ligadas uniformemente por pontes glicosídicas α -1,4, que conferem forma helicoidal à molécula. Tal como a amilose, a amilopectina (Figura 4) é constituída por unidades de glucose unidas por ligações α -1,4, diferindo desta por apresentar ligações α -1,6 que constituem pontos de ramificação. Devido a essas diferenças

estruturais, a amilose é mais hidrossolúvel que a amilopectina, e essa característica pode ser usada para separar esses dois componentes.

Figura 3- Estrutura da amilose – polímero linear composto por D-glucoses unidas por ligações α -1,4

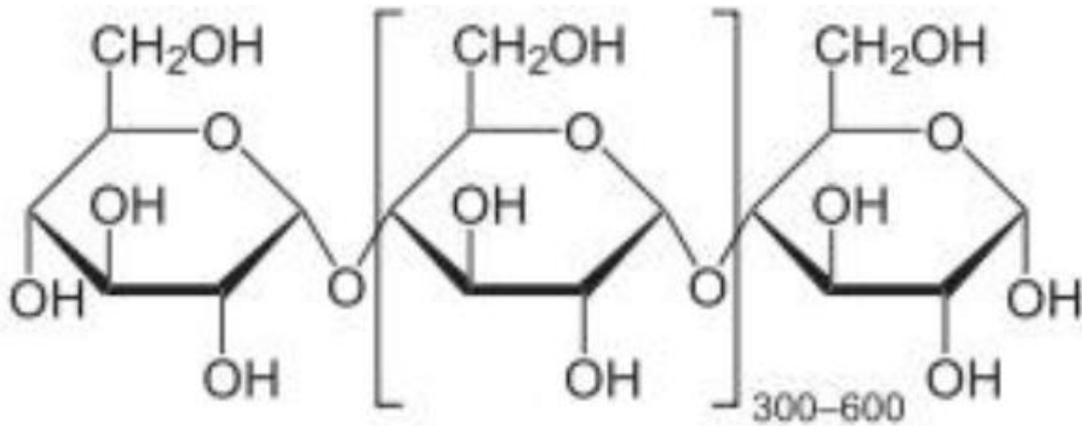
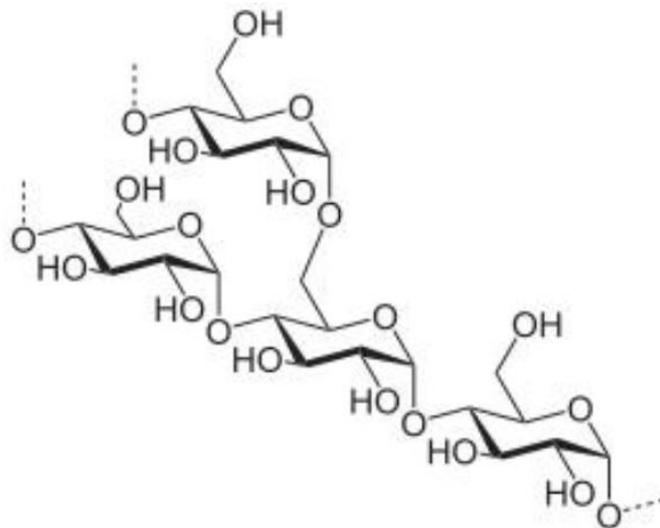


Figura 4 - Estrutura da amilopectina – polímero ramificado composto por D-glucoses unidas por ligações α -1,4 e α -1,6



2.3.2 Propriedades do Amido

O amido tem sido considerado um produto de grande potencial não só para alimentação humana e animal, mas também para a indústria. Contudo, importa ressaltar que a exploração deste potencial depende do conhecimento das suas propriedades quanto à estrutura, forma, cor, absorção de água, solubilidade, dilatação e viscosidade.

2.3.3 A Indústria Amideira

A indústria amideira extrai amido de diversas fontes e processa-o numa grande variedade de produtos, como é o caso dos amidos nativos, xaropes de glucose, xaropes de glucose-frutose (vulgo isoglucozes) e dextrose (anidra ou monohidratada). Dos processos de produção obtêm-se, ainda, diversos subprodutos, como por exemplo, o *corn gluten feed*, o *corn gluten meal* ou o gérmen, cuja valorização representa uma forma de reduzir custos de produção.

2.3.4 O Mercado Mundial de Amido

O mercado mundial de amido está dividido em cinco matérias-primas: milho, trigo, arroz, batata e mandioca. O milho é a mais significativa, sendo utilizado em 75% da produção mundial de amido. É a principal fonte de amido nos Estados Unidos, sendo responsável por cerca de 90% da produção de amido do país. No que diz respeito à União Europeia, o milho é responsável por cerca de 46% da produção de amido. No Brasil, o sector de produção de amido de milho é responsável por 70% da produção total de amido, sendo os restantes 30% predominantemente provenientes de mandioca.

De acordo com a *Association des Amidonniers et Féculiers*, a indústria do amido na União Europeia processa cerca de 21,6 milhões de toneladas de matérias-primas e produz mais de 9,0 milhões de toneladas de amido e seus derivados.

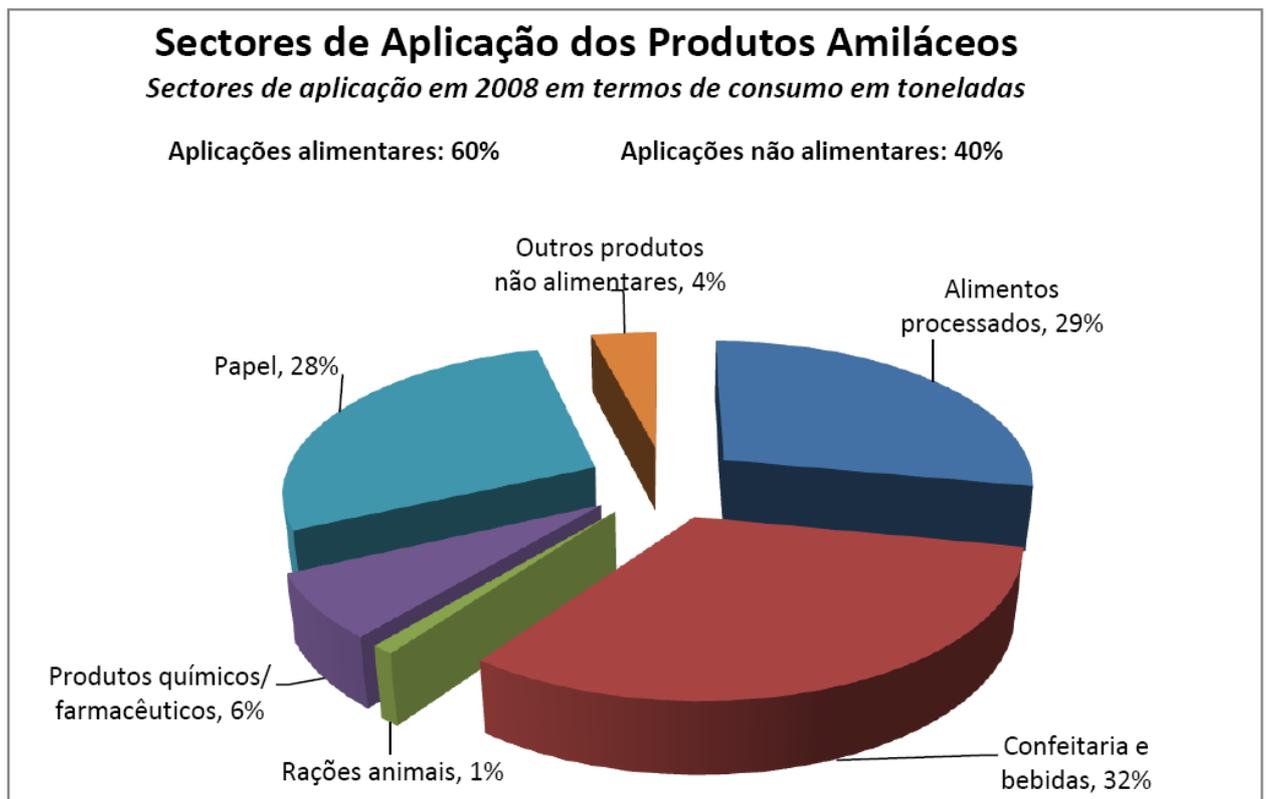
2.3.5 Setores de Aplicação dos Produtos Amiláceos

Os produtos amiláceos são utilizados como matérias-primas principalmente nas indústrias alimentares, indústrias de rações animais, indústrias farmacêuticas e ainda em indústrias de papel.

Segundo a *Association des Amidonniers et Féculiers*, o consumo de amido e seus derivados nos mercados da União Europeia atingiu os 8,7 milhões de toneladas em 2008 (AAF, 2009).

A Figura 5 representa os diversos setores de aplicação dos produtos amiláceos e respectiva quota.

Figura 5 - Representação dos diversos setores de aplicação dos produtos amiláceos e respectiva quota



2.3.6 Produção de Xaropes de Glucose a Partir do Milho

Os xaropes de glucose são o produto da hidrólise do amido. Este pode ser hidrolisado por via química (através de tratamento com ácidos, temperatura, pressão), por via enzimática, ou ainda por uma conjugação dos dois processos.

2.3.6.1 A Hidrólise Enzimática do Amido

A hidrólise enzimática do amido pela alfa-amilase, por mais exaustiva que seja, não converte todo o amido a moléculas de glucose. Sendo uma enzima que ataca somente as ligações alfa-1,4 no interior da molécula, a sua ação sobre a amilose produz moléculas de maltose, de maltotriose e poucas moléculas de glucose. Na amilopectina, ela ataca as mesmas ligações alfa-1,4, sendo inativa em relação às ligações alfa-1,6. Como resultado, vamos encontrar as mesmas moléculas citadas anteriormente, acrescidas de compostos ramificado, chamados dextrinas, onde aparecem as ligações alfa-1,6.

As amilodextrinas, liberadas logo após o início da hidrólise enzimática do amido, reagem com iodo dando uma cor azul. As dextrinas tendo menor peso molecular (e bastante ramificações) reagem com o iodo dando uma cor avermelhada e sendo, por isto, chamadas de eritrodextrinas. À medida que a hidrólise progride, as eritrodextrinas vão sendo desdobradas em unidades menores, ainda contendo 15 ramificações (ligações α -1,6), que são chamadas de acrodextrinas por não produzirem um composto corado com o iodo. Prosseguindo a hidrólise pela α -amilase, poderíamos reduzir as dextrinas até o tamanho de oligosídeos contendo ligações α -1,6 e algumas moléculas de isomaltose, um diolosídeo com ligação alfa-1,6.

A hidrólise pela α -amilase, portanto transforma o amido (não redutor e com reação azul com iodo), progressivamente com acrodextrinas (com baixo poder e não coráveis pelo iodo) e em glucose, maltose, isomaltose e oligosídeos redutores e que também não desenvolvem coloração com iodo.

A α -amilase é ativada por íons cloreto e tem um pH ótimo de ação em torno de 6,7 sendo inativa em pH ácido. No aquecimento a enzima sofre desnaturação e perde sua atividade.

2.3.7 Hidrolisados de amido

A denominação de hidrolisados de amido reúne todos os produtos do fracionamento do amido, independentemente dos catalisadores usados (ácidos, enzimas) ou do grau deste fracionamento. Inclui um importante número de produtos diferentes como glicose, maltose, maltotetraose, maltodextrinas, frutose, ciclodextrinas, dextrinas, etc.

Atualmente são produzidos no Brasil três categorias de hidrolisados para o uso alimentício, a glicose, maltose e maltodextrina, além de seus derivados como o sorbitol, um produto derivado de glicose. Os oligossacarídeos, tais como as isomaltoses, são novos derivados de hidrolisados que vêm conquistando mercado nos últimos anos. Este mercado é especificamente destinado aos produtos ligados à saúde, como as fibras dietéticas e para favorecimento de crescimento de bactérias lácticas, como os probióticos.

Os hidrolisados de amido podem ser comercializados na forma de xarope, o que é mais comum e na forma de pó. As maltodextrinas e glicose em pó são desidratadas por *spray-dryer*. Os xaropes líquidos são mais baratos, mas apresentam alta viscosidade, o que complica o transporte e a comercialização. O transporte deve ser feito em caminhões tanques especiais, com sistema de aquecimento para descarga. As empresas produtoras chegam a instalar tanques de armazenamento de xarope nos compradores, em sistema de comodato, devido ao custo de sua instalação. Os xaropes armazenados por muito tempo podem escurecerem virtude da reação de Maillard, principalmente os derivados de cereais, que podem conter proteínas residuais.

A opção de um produto seco é uma solução interessante para pequenos consumidores, pois os hidrolisados em sacaria são mais estáveis devido à atividade de água mais baixa e são mais fáceis de transportar e dosar. Podem ser elaborados

pela desidratação do xarope por atomização (*spray-drying*) ou secagem em tambor(*drum-drying*).

2.3.7.1 Glicose

A matéria-prima comercial para produção da glicose é o amido. A glicose comercial é uma mistura hidrolisada composta predominantemente de glicose, além de maltose, maltotriose e de outros sacarídeos em proporção variável.

A expressão xarope de glicose designa todas as soluções aquosas purificadas e concentradas de polímeros de D-glicose, obtidas por hidrólise do amido. Por glicose são compreendidos os hidrolisados contendo moléculas de glicose na proporção de 5 a 95%, com a condição de que predominem em relação aos demais polissacarídeos. A glicose pura ou dextrose é composta por 100% de D-glicose e pode ser produzida por hidrólise do amido ou da sacarose (a partir da cana-de-açúcar), seguida de separação da D-glicose e dos outros mono ou polissacarídeos. No caso da produção a partir de sacarose, pode ser feita a conversão enzimática da frutose para glicose, ou o contrário se a intenção é o preparo de xarope de frutose.

3 SITUAÇÃO ATUAL

O advento de novas técnicas de análise de contaminantes e de tecnologias voltadas para a garantia da segurança de alimentos valorizou produtos que são submetidos ao controle de qualidade, ou que apresentam embalagens bioativas. Além disso, a intensificação da adoção de medidas que diminuam os riscos à saúde e as barreiras sanitárias restritivas ao comércio internacional, têm impulsionado o controle da qualidade de alimentos. A contaminação dos alimentos pode ser de natureza química, física ou biológica. A contaminação física, oriunda da presença de materiais estranhos ao alimento, geralmente, pode ser constatada visualmente, enquanto os outros tipos de contaminação são de difícil identificação visual, exceto nos casos em que a contaminação é demasiada e ocorrem modificações perceptíveis nas características sensoriais do produto. Por esse motivo, métodos de análise sensíveis e de resultados rápidos, ao final do processamento dos produtos alimentícios, são necessários para garantir a qualidade no mercado.

Os biossensores são dispositivos bioeletrônicos capazes de detectar rapidamente espécies químicas e/ou biológicas (analito), tanto qualitativa como quantitativamente. Esses dispositivos estão sendo recomendados para serem empregados nas áreas da saúde, ambiental, alimentícia e até na prevenção de bioterrorismo.

No contexto brasileiro, a legislação tem sido cada vez mais rigorosa quanto aos limites de glicose no xarope de milho e em produtos em que o mesmo é utilizado.

O tempo e os custos envolvidos com a detecção de glicose (por exemplo: aquisição, preparo e análise da amostra) têm imposto limitações no número de amostras que podem ser analisadas para um determinado lote em uma indústria alimentícia. Por outro lado, o aumento na quantidade de dados analíticos permite maior confiabilidade nas decisões de gerenciamento, por melhorar a eficiência e a caracterização do composto analisado in situ ou ainda a eficiência dos procedimentos. Assim, a limitação no número das análises tem criado uma demanda por tecnologias analíticas que permitam um aumento no número destas análises

num menor tempo e com custos acessíveis. Dentro deste contexto, é importante contar com metodologias emergentes na área de determinação e quantificação da glicose, como os instrumentos denominados biossensores (ROSATTO *et al.*, 2001).

4 OBJETIVOS

Este projeto tecnológico tem por objetivo a construção de um biossensor eletroquímico para a determinação de glicose em xaropes de hidrolisado de amido.

4.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Os objetivos específicos deste trabalho são:

- a) Sintetizar um filme nanoestruturado de $\text{Nb}_2\text{O}_5/\text{SiO}_2$ sobre a superfície de vidro condutor FTO utilizando a técnica de *dipcoating*;
- b) Incorporação de nanopartículas de ouro (AuNP) na superfície do filme nanoestruturado $\text{Nb}_2\text{O}_5/\text{SiO}_2$ com a finalidade de aumentar a área eletroativa e a transferência eletrônica;
- c) Imobilizar a enzima glicose oxidase (GOX) na superfície do filme SiNb/AuNP e avaliar a potencialidade eletroanalítica do sistema como eletrodos para a determinação de glicose.

5 PROPOSTA TECNOLÓGICA

Os alimentos apresentam diversos açúcares redutores tais como glicose, frutose e/ou a combinação das mesmas. Uma vez que os instrumentos de medição do nível de glicose são bastante conhecidos por não serem reutilizáveis, é esperado que o biossensor eletroquímico desenvolvido neste trabalho possa ser utilizado mais de uma vez, além de possuir propriedades diferenciadas tais como atividade catalítica, seletividade, e sensibilidade. Estas características corroboram uma maior precisão, aumento da eficiência na quantificação, além de possuir alta estabilidade.

Durante os últimos anos, a busca por biossensores eletroquímicos que sejam econômicos e sensíveis está se tornando um requisito industrial. Dessa forma, vem sendo intensificada a busca por biossensores reutilizáveis e com sensibilidade considerável, substituindo biossensores importados. Esses podem ser construídos a partir de filmes finos e apresentam como grande vantagem o fato de se poder utilizar diversas vezes, possuir um menor custo e apresentar alta precisão analítica.

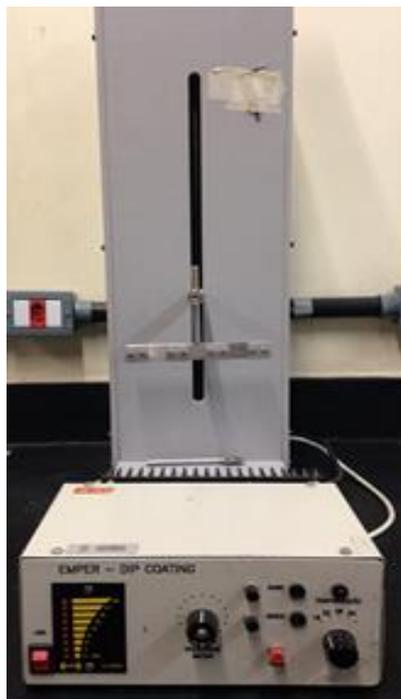
Neste trabalho, pretende-se avaliar os custos da elaboração do dispositivo proposto uma vez que apresenta potencial de inovação tecnológica pois poderá dar origem ao desenvolvimento de dispositivos eletroquímicos facilmente portáteis com grande interesse na área vinícola e na indústria alimentícia. Este fato é um grande diferencial que torna o estudo interessante, visto que a demanda de amostras em uma indústria é muito grande e a necessidade de economia, além de resultados rápidos e confiáveis, se tornam possíveis.

6 METODOLOGIA

6.1 OBTENÇÃO DO FILME NANOESTRUTURADO Nb₂O₅/SiO₂ NA SUPERFÍCIE DE UM SUBSTRATO CONDUTOR FTO

Para a obtenção do filme Nb₂O₅/SiO₂, preparou-se uma solução com 10 mL de etanol, 400 µL de etóxido de nióbio e 25 µL de tetraetilortosilicato (TEOS) num béquer de 50 mL em atmosfera inerte de argônio. A relação molar entre o etóxido de nióbio e TEOS foi de 0,1:1. Adicionou-se uma gota de HF e agitou-se por 10 minutos e. Nesta solução submergiu-se o vidro condutor FTO (flúor dopado com óxido de estanho) com dimensões de 1,0 cm de largura, 5,0 cm de altura e 2,3 mm de espessura de 1x3 cm por *dipcoating*. Posteriormente o sistema obtido foi tratado termicamente a 400°C por 1 hora. Este material foi denominado como SiNb2. Para fins de teste, fez-se o mesmo procedimento porém variando-se a quantidade de etanol, etóxido de nióbio e TEOS. Utilizou-se 15 mL de etanol, 250 µL de TEOS e 400 µL de etóxido de nióbio. A relação molar entre o etóxido de nióbio e TEOS foi de 0,1: 0,1. Este material foi denominado SiNb1.

Figura 6 - Aparato experimental utilizando *dipcoating*



6.2 FORMAÇÃO DE FILMES DE NANOPARTÍCULAS DE OURO (AuNP) NA SUPERFÍCIE Nb₂O₅/SiO₂

Foi preparada uma solução de ouro 0,005 mol.L⁻¹. Para o preparo da mesma dissolveu-se 0,1 g de ouro em água régia (1 HNO₃: 3 HCl) em um balão volumétrico de 100 mL (Solução A). Em um erlenmeyer pesou-se 0,2 g do agente estabilizante, silsesquioxano iônico contendo o grupo 1,4-dizoniabiciclo[2,2,2]octano (SiDbCl₂), o qual foi dissolvido em 10 ml de água deionizada e aquecido a 60°C por 30 min. Esta solução foi transferida para uma proveta de 50 mL e completou-se com água deionizada. Transferiu-se novamente para um erlenmeyer e acrescentou-se 2,5 mL da solução A e 10 mL de uma solução de NaHB₄ 0,02 mol.L⁻¹.

Para a formação dos filmes de AuNP nas placas condutoras FTO foi utilizado o instrumento *dipcoating*. Três placas de FTO preparadas no item 6.1 foram suspensas e submersas. Cada uma delas foi submergida na solução por 5, 10 e 20 vezes. Deixou-se por 1 minuto na dispersão de AuNP e foram suspensas novamente. As placas preparadas foram denominadas como SiNb₂/5xAuNp, SiNb₂/10xAuNp e SiNb₂/20xAuNp respectivamente. Posteriormente as placas foram transferidas para uma cápsula de porcelana. Levou-se a estufa por 1 hora a 70°C para evaporação do solvente e colocou-se num dessecador à vácuo.

6.3 FORMAÇÃO DE FILMES DE ENZIMA GLICOSE OXIDASE (GOX) NA SUPERFÍCIE DO Nb₂O₅/SiO₂-FTO MODIFICADA COM AuNP

Inicialmente, foi preparada uma solução polimérica com 6 mL de TEOS, 1,2 mL de água, 1 gota de HCl 0,01 mol.L⁻¹. Agitou-se por 4 horas e foi adicionado 0,6 mL de solução de GOX 6,25 mg.mL⁻¹. Agitou-se novamente por 15 min e, posteriormente, depositou-se a solução na superfície SiNb₂/5xAuNp pelo método *dipcoating*. O material obtido foi utilizado como eletrodo de trabalho nos ensaios eletroquímicos.

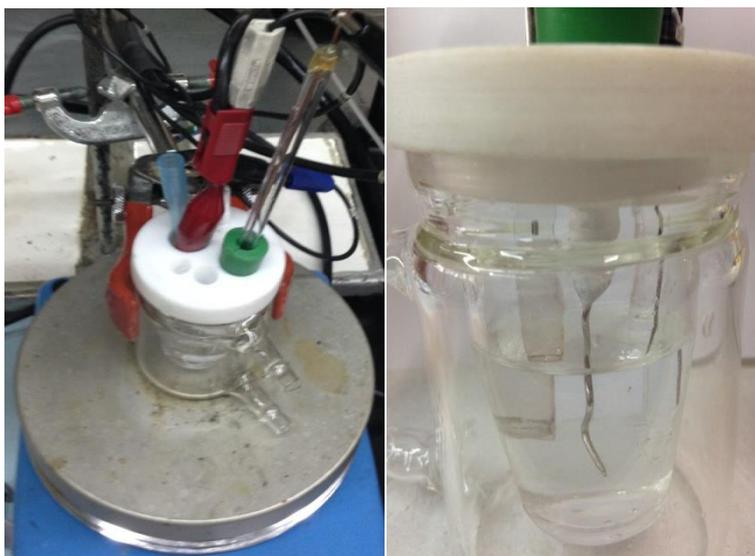
6.4 MEDIDAS ELETROQUÍMICAS

As medidas eletroquímicas foram realizadas em um potenciostato/galvanostato IviumStat utilizando uma cela eletroquímica convencional de três eletrodos. Os eletrodos utilizados foram um eletrodo de Ag/AgCl e um fio de platina, como eletrodos de referência e auxiliar, respectivamente, e o biossensor SiNb₂/5xAuNp/ GOX previamente preparado foi utilizado como eletrodo de trabalho. Todas as medidas foram conduzidas a temperatura ambiente (25°C). O software para tratamento de dados foi o IviumSoft.

6.4.1 Célula Eletroquímica

Como célula eletroquímica foi utilizado um recipiente de vidro de aproximadamente 50 mL com uma tampa de teflon com aberturas como mostrado na Figura 7. Para a realização das medidas, a placa que constituía o eletrodo de trabalho foi fixada na parte superior do recipiente. Nas outras aberturas da tampa do recipiente, foi possível fazer a inserção do fio de platina, utilizado como contra-eletrodo, e do eletrodo Ag/AgCl, utilizado como eletrodo de referência.

Figura 7: Recipiente de vidro utilizado como célula eletroquímica



6.4.2 Eletrodo de Trabalho

O biossensor construído utilizado como eletrodo de trabalho era constituído de vidro do tipo FTO (flúor dopado com óxido de estanho) com dimensões de 1,0 cm de largura, 5,0 cm de altura e 2,3 mm de espessura. Sobre a sua superfície incorporou-se um filme fino de SiNb de GOX.

Para isolar a área das placas que seria exposta às soluções de amostra de glicose foi utilizada uma fita adesiva de tal maneira que área exposta seja 1cm². Um dos biossensores eletroquímicos utilizados estão apresentados na Figura 8.

Figura 8: Biossensor eletroquímico construído



6.4.3 Eletrodo de Ag/AgCl

O eletrodo de referência utilizado foi o eletrodo de Ag/AgCl, que é composto por uma haste de prata recoberta com AgCl, imersa em uma solução saturada de cloreto de sódio 3 molL⁻¹. O potencial deste eletrodo, em relação ao eletrodo padrão de hidrogênio, é 0,205 V a 25 °C.

6.4.4 Contra-Eletrodo

O contra-eletrodo utilizado foi um fio de platina que, em uma célula de três eletrodos, é utilizado para permitir que uma corrente elétrica possa ser aplicada no eletrodo de trabalho, sendo possível uma conexão elétrica.

6.4.5 Caracterização eletroquímica das placas Nb₂O₅/SiO₂-FTO modificadas com AuNP

Os voltamogramas cíclicos foram obtidos na faixa de potencial de 0,5 V a -1,2 V vs Ag/AgCl e uma velocidade de varredura de 20 mV.s⁻¹. As medidas foram realizadas em uma cela eletroquímica contendo 25 mL de uma solução de ferricianeto de potássio e ferrocianeto de potássio 1,0 mmol.L⁻¹ em KCl 0,1 mol.L⁻¹.

6.4.6 Obtenção da curva de calibração para o eletrodo SiNb₂/5xAuNP modificada com GOX

A resposta do eletrodo SiNb₂/5xAuNP foi testada por voltametria cíclica na faixa de potencial de 0,5 a -0,20 V vs Ag/AgCl. Na cela eletroquímica contendo 20 mL de uma solução tampão fosfato pH=7. Foram adicionadas alíquotas de 100, 200, 300, 400, 500, 600 e 700 µL de uma solução de glicose de 0,1 mol.L⁻¹ sob agitação durante 1 minuto.

6.5 ESPECTROSCOPIA NA REGIÃO DO UV-VIS

Os espectros de UV-Vísivel da dispersão aquosa de AuNPs foram obtidos entre 200 e 900 nm, na temperatura ambiente, utilizando um espectrofotômetro SEC-2000 e um UV-160 1PC Shimadzu e água destilada como amostra de referência.

6.6 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO (MET)

As imagens de Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) da dispersão aquosa foram obtidas utilizando-se um microscópio JEL JEM-122, operando a 120kV. A amostra da dispersão aquosa de AuNPs utilizada para as imagens de MET foram preparadas adicionando duas gotas sobre uma grid de Cu revestido com carbono, seguida de secagem em condições ambientes.

7 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Os filmes de óxido misto $\text{SiO}_2/\text{Nb}_2\text{O}_5$ depositados no vidro condutor FTO, SiNb1 contendo maior quantidade de sílica e SiNb2 contendo menor conteúdo de sílica mostraram-se homogêneos e transparentes.

A dispersão de AuNPs, preparadas na presença de SiDbCl_2 , apresentam uma cor vermelha, no espectro UV visível é possível observar um máximo de absorção em 525 nm (Figura 9). A presença desta banda única indica a formação de AuNPs esféricas com diâmetro menor que 20 nm. A cor das AuNPs deve-se ao fenômeno de Ressonância de Plasmon, no qual os elétrons da nanopartícula metálica oscilam conjuntamente com a radiação eletromagnética da luz incidente. Na imagem da dispersão obtida pela microscopia de transmissão (Figura 10) é possível observar as nanopartículas esféricas.

Figura 9 - Espectro de absorção na região do UV-Vis das dispersões de AuNPs estabilizadas com SiDbCl_2

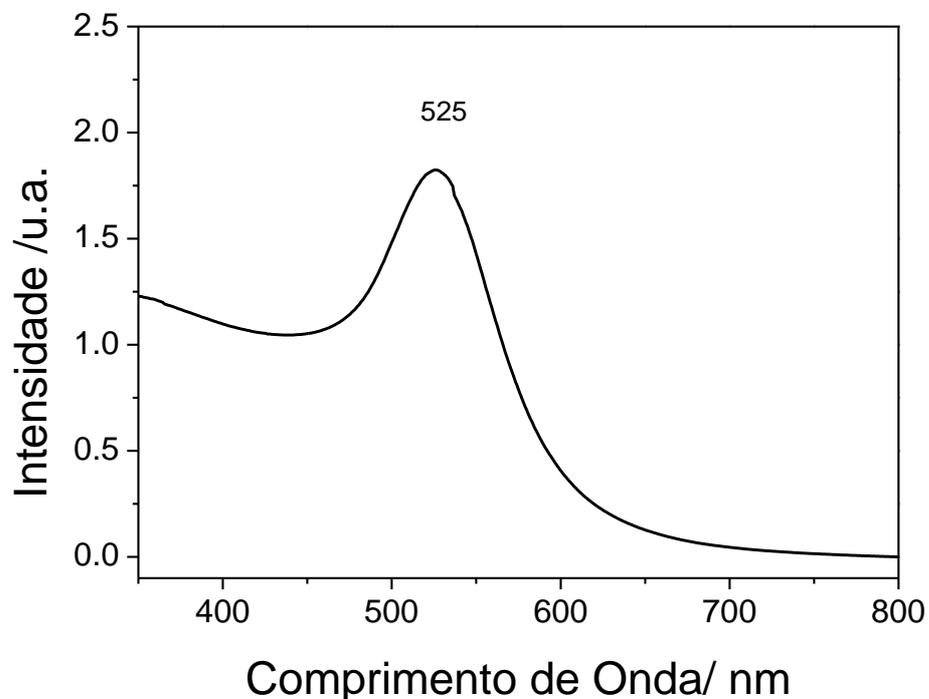
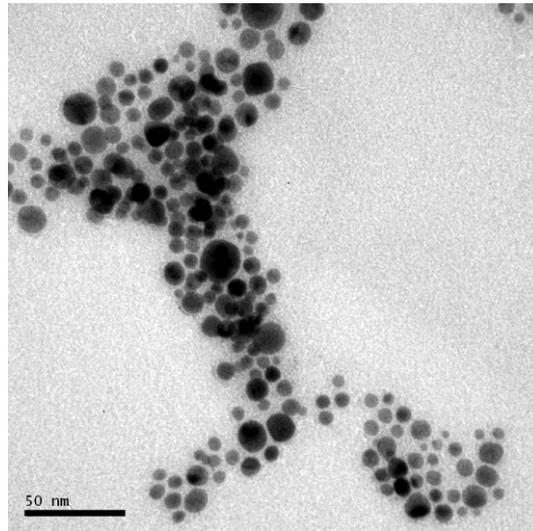
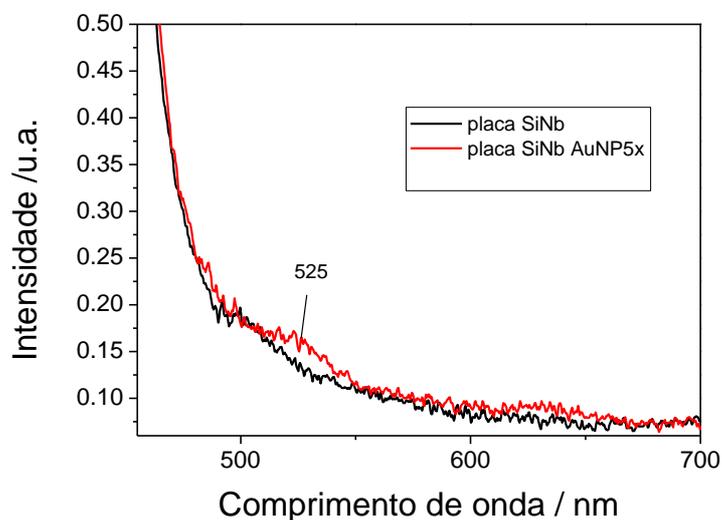


Figura 10- Imagem obtida por microscopia de eletrônica de transmissão das AuNPs



Os filmes AuNps depositados na superfície do $\text{SiO}_2/\text{Nb}_2\text{O}_5\text{-FTO}$, $\text{SiNb1}/10\text{xAuNp}$, $\text{SiNb2}/5\text{xAuNp}$, e $\text{SiNb2}/10\text{xAuNp}$, também se mostraram visualmente homogêneas de cor vermelha e fortemente aderidas na superfície. Na Figura 11 mostra os espectros UV-Vis da placa SiNb2 e após a imobilização de 5 mergulhos da dispersão de AuNP, $\text{SiNb2}/5\text{xAuNp}$, neste espectro observa-se uma banda em 525 nm indicativo de que as AuNPs mantêm o mesmo formato sem aglomeração.

Figura 11 - Espectro de absorção na região do UV-Vis dos filmes SiNb2 e $\text{SiNb2}/5\text{xAuNp}$



Os filmes $\text{Nb}_2\text{O}_5/\text{SiO}_2$ e após a deposição de AuNp neles, foram caracterizados por voltametria cíclica utilizando como sonda o $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]/\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$. Os voltamogramas obtidos são mostrados na Figura 12. A Tabela 1 mostra os valores de corrente de pico anódico e catódico, potenciais anódico e catódico bem como a razão i_{pa}/i_{pc} e o valor de ΔE_p a partir dos voltamogramas obtidos. A Figura 12 (A) representa a voltametria cíclica do filme SiNb1, com maior conteúdo de SiO_2 . Observa-se uma separação de picos de oxidação e redução do $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]/\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ de 1,2V. Após a imersão de 10 vezes na dispersão de AuNp (SiNb1/10xAuNp), os picos foram pouco definidos indicando pouca reversibilidade. Isto pode ser devido à passivação FTO pela sílica que é isolante, já que para a estabilização das AuNp também foi usado um composto que contém sílica o silsesquioxano iônico SiDbCl_2 . A Figura 12 (B) representa a voltametria cíclica do filme SiNb2, cujos picos mostraram-se bem definidos e quase reversíveis com uma separação de picos bem menor (0,65 V). A incorporação de 10 mergulhos de AuNp neste filme (SiNb2/10xAuNp) mostraram picos mais reversíveis ainda com uma separação de 0,23 V. Entretanto a intensidade de picos é muito menor que o filme SiNb2, onde foram incorporados 5 mergulhos da dispersão de AuNp (SiNb2/5xAuNp). Além de apresentar uma separação de picos maior, o filme SiNb2/5xAuNp demonstrou uma maior intensidade. Este resultado é indicativo de que neste material existe uma maior transferência de elétrons e uma área eletroativa maior. Devido a essa resposta este filme foi escolhido para imobilizar a enzima glicose oxidase.

Figura 12 - Voltamogramas cíclicos dos filmes, (A) SiNb1 e SiNb1/10xAuNp e (B) SiNb2, SiNb2/5xAuNp e SiNb2/10xAuNp em presença de uma solução $K_3[Fe(CN)_6]/K_4[Fe(CN)_6]$ 1mmolL^{-1} e $0,1\text{mol L}^{-1}$ KCl

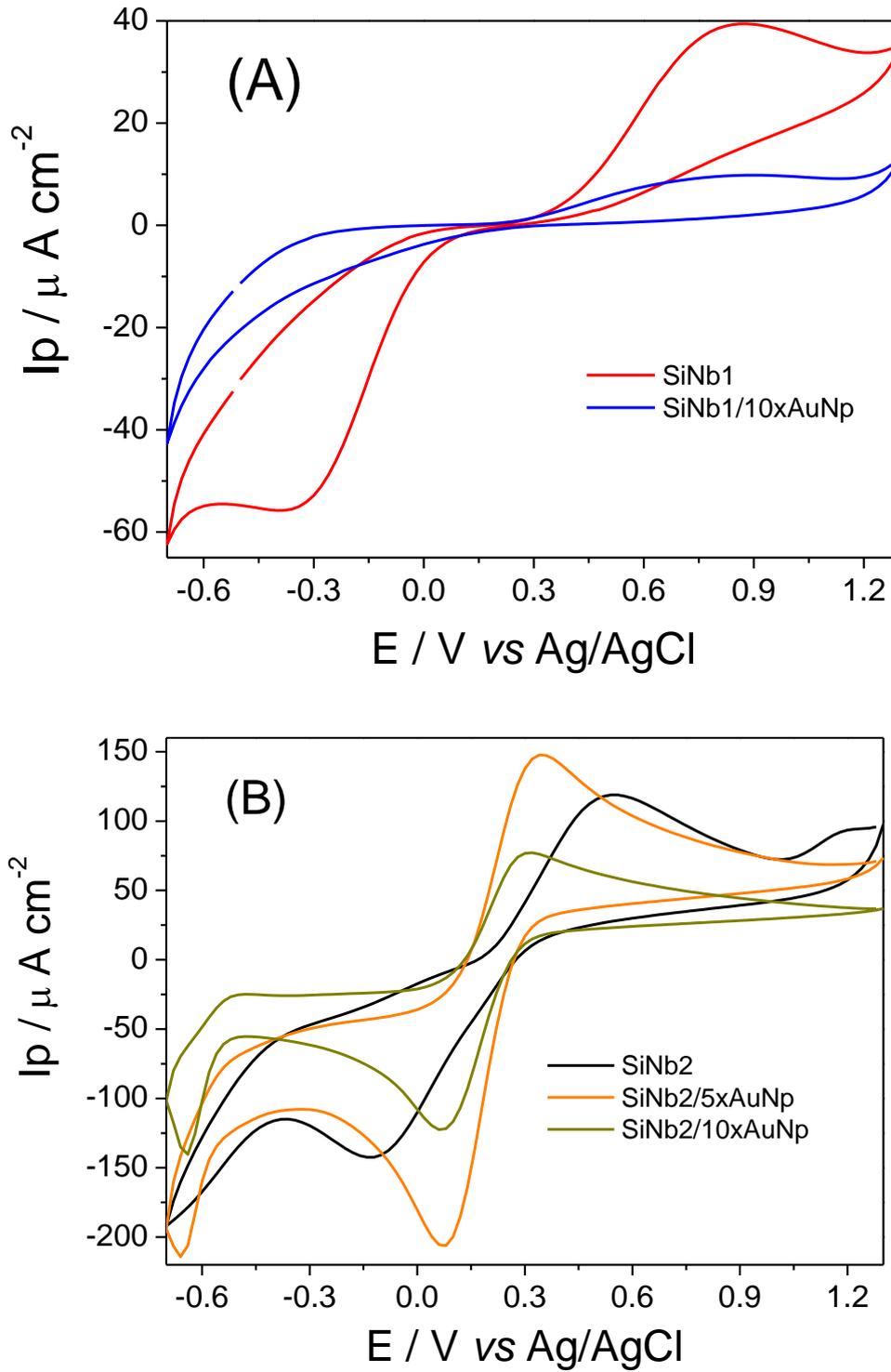


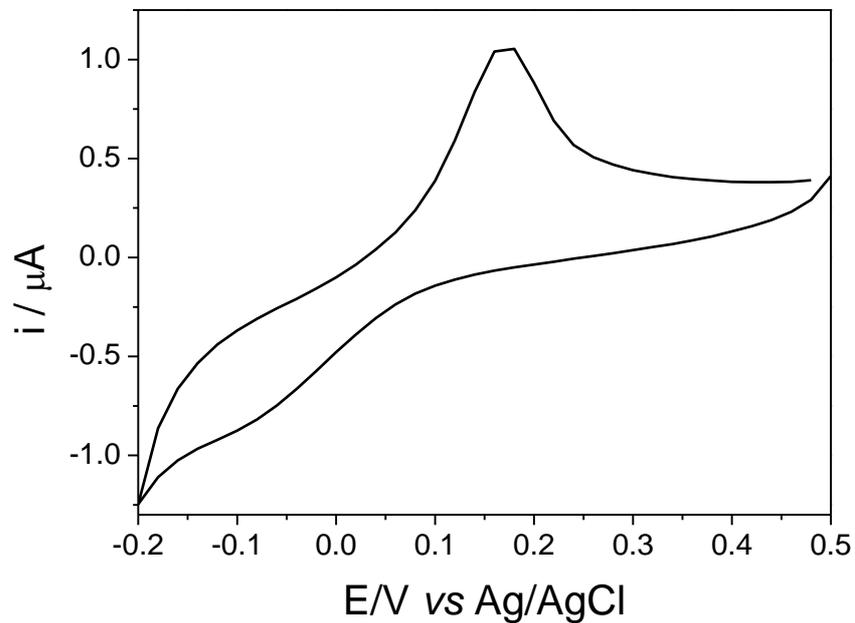
Tabela 1 - Valores das correntes anódico (i_{pa}) e catódico (i_{pc}), relação i_{pa}/i_{pc} , potencial do pico anódico e catódico (E_{pa} e E_{pc}) e ΔE para os filmes, obtidos a partir dos voltamogramas cíclicos

Filme	$i_{pa}/ \mu A$	$i_{pc}/ \mu A$	i_{pa}/i_{pc}	E_{pa}/ V	E_{pc}/ V	$\Delta E/ V$
SiNb1	39,4	- 56,1	0,70	0,82	-0,33	1,15
SiNb1/10xAuNp	9,37	-	-	0,75	-	-
SiNb2	118	- 143	0,83	0,54	-0,11	0,65
SiNb2/5xAuNp	146	- 206	- 0,71	0,35	0,07	0,28
SiNb2/10xAuNp	76,3	- 122	- 0,63	0,29	0,06	0,23

7.1 COMPORTAMENTO ELETROQUÍMICO DA GLICOSE OXIDASE IMOBILIZADA NA SUPERFÍCIE DO SiNb2/5XAuNP

Na Figura 13 é apresentado o voltamograma cíclico do filme SiNb2/5xAuNp contendo a enzima glicose oxidase em sua superfície, SiNb2/5xAuNp/GOX, realizada a 20 mVs^{-1} . Observa-se um pico anódico com intensidade de corrente $1,05 \mu A$ e um potencial de $0,17 \text{ V}$. Também se observa um pico catódico com intensidade de corrente $-0,81 \mu A$ e um potencial de $-0,08 \text{ V}$.

Figura 13 - Voltamograma cíclico do eletrodo SiNb2/5xAuNp/ GOX em tampão fosfato pH=7



Os picos são quase reversíveis cuja presença pode ser atribuída à oxidação e redução da glicose oxidase. Estes resultados são indicativos de que a glicose oxidase foi imobilizada na superfície de filme SiNb2/5xAuNp.

A Figura 14 apresenta os voltamogramas cíclicos do filme SiNb2/5xAuNp/GOX em diferentes velocidades de varredura, na faixa de potencial de 0 a 0,5V é possível observar que existe um aumento linear da intensidade do pico anódico com o aumento da velocidade de varredura como mostrado na Figura 15. Este comportamento é típico de um processo controlado por espécies adsorvidas na superfície do eletrodo, confirmando mais uma vez que a GOX se encontra adsorvida na superfície do filme SiNb2/5xAuNp.

Figura 14 - Voltamogramas cíclicos do eletrodo SiNb2/5xAuNp/ GOX a diferentes velocidades de varredura: 50, 60, 80, 90, 100, 120, 150, 200, 250 e 300mVs⁻¹ em tampão fosfato pH=7

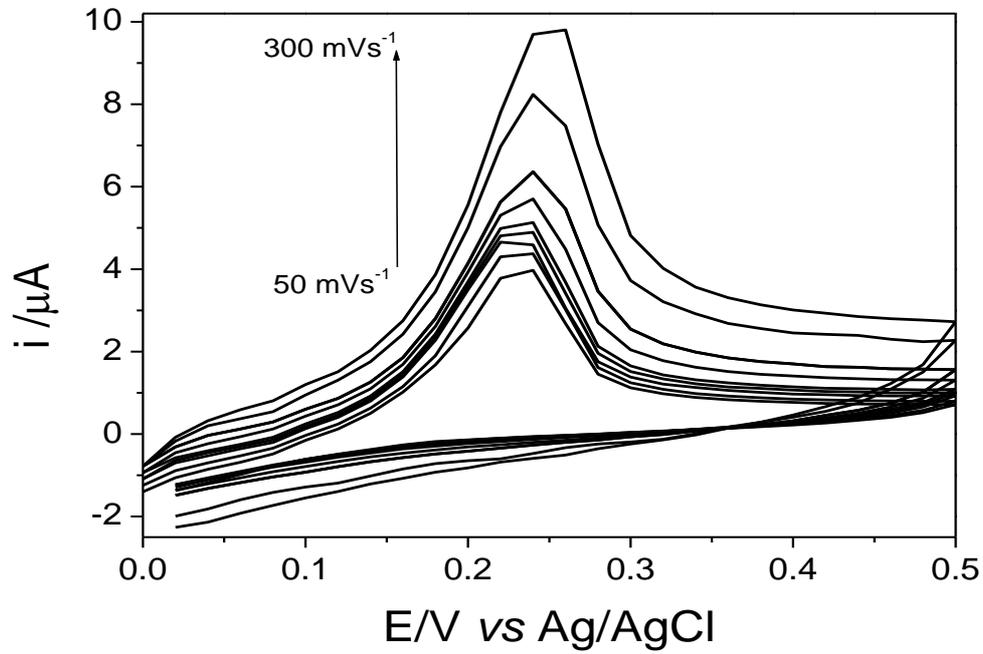
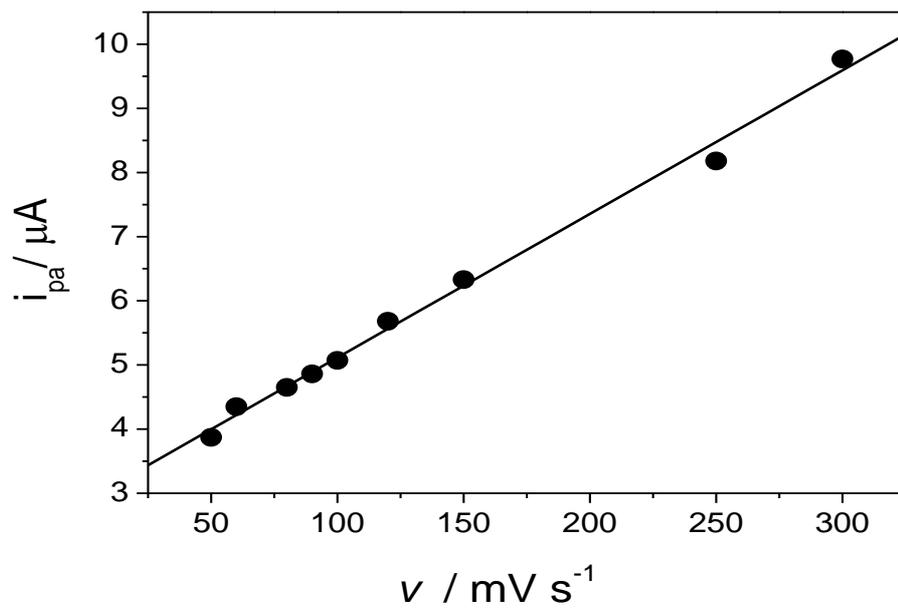


Figura 15 - Gráfico de i_{pa} em função da velocidade de varredura



7.2 ATIVIDADE ELETROCATALÍTICA DO FILME SiNb₂/5xAuNP/GOX PARA A GLICOSE

Na Figura 17 são mostradas os voltamogramas cíclicos do eletrodo SiNb₂/5xAuNP/GOX obtidas a diferentes concentrações de glicose. Observa-se a relação da variação da intensidade de corrente de pico anódico em função da concentração de glicose. Uma correlação linear para as concentrações de glicose entre 0,4975 – 2,44 mmolL⁻¹ é observada na Figura 18 e descrita pela Equação 1.

$$i_{pa} = (0,529 \pm 0,035)[\text{glicose}] + (1,041 \pm 0,057), \text{ para } n=6$$

Equação 1

Onde i_{pa} é a intensidade de corrente do pico anódico (μA), $[\text{glicose}]$ é a concentração de glicose (mmol L^{-1}), com coeficiente de correlação linear (r) = 0,993, para $n=6$.

O limite de detecção encontrado foi de 0,195 mmolL⁻¹ e uma sensibilidade de 0,529 $\mu\text{A L mol}^{-1}$. Para o cálculo do limite de detecção usou-se a Equação 2 (Ramos, 2013).

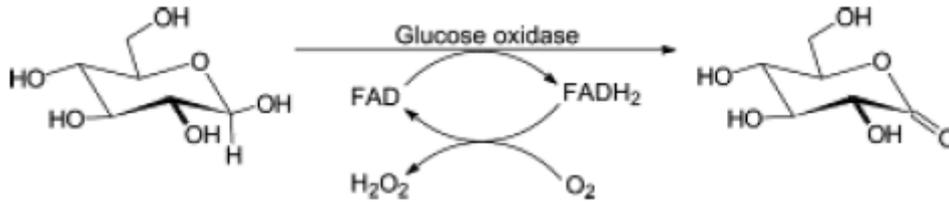
$$LD = \frac{3 \times \text{Desvio padrão do branco}}{\text{coeficiente angular}}$$

Equação 2

O fato que exista o aumento linear da intensidade de corrente pico anódico com a concentração da glicose é indicativo da capacidade eletrocatalítica do filme preparado neste trabalho. A reação de oxidação da glicose dá-se em dois passos: no primeiro a coenzima oxidada ganha 2 elétrons, ou seja, sofre uma redução e passa a ser FADH₂, estes dois elétrons vem da da β -D-glicose que ao perder os elétrons vira D-gluconolactona (Figura 16). No segundo passo a flavina se reoxida, ou seja, perde os 2 elétrons, pois eles são doados ao oxigênio (O₂). O oxigênio ao

receber estes elétrons é reduzido a peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (Leite *et. al.*, 2004).

Figura 16 – Oxidação da molécula de glicose pela ação da enzima glicose oxidase



Além do mais, estes resultados são indicativos que o eletrodo construído neste trabalho pode ser utilizado como biossensor para a determinação de glicose em diferentes amostras, tais como as da indústria alimentícia e clínica.

Figura 17 - Voltamogramas cíclicos do eletrodo SiNb2/5xAuNp/ GOX na presença de glicose nas seguintes concentrações: 0,498; 0,990; 1,478; 1,961; 2,439; 2,913; 3,382 e 4,762 mmolL^{-1} em tampão fosfato pH=7 a 20 mVs^{-1}

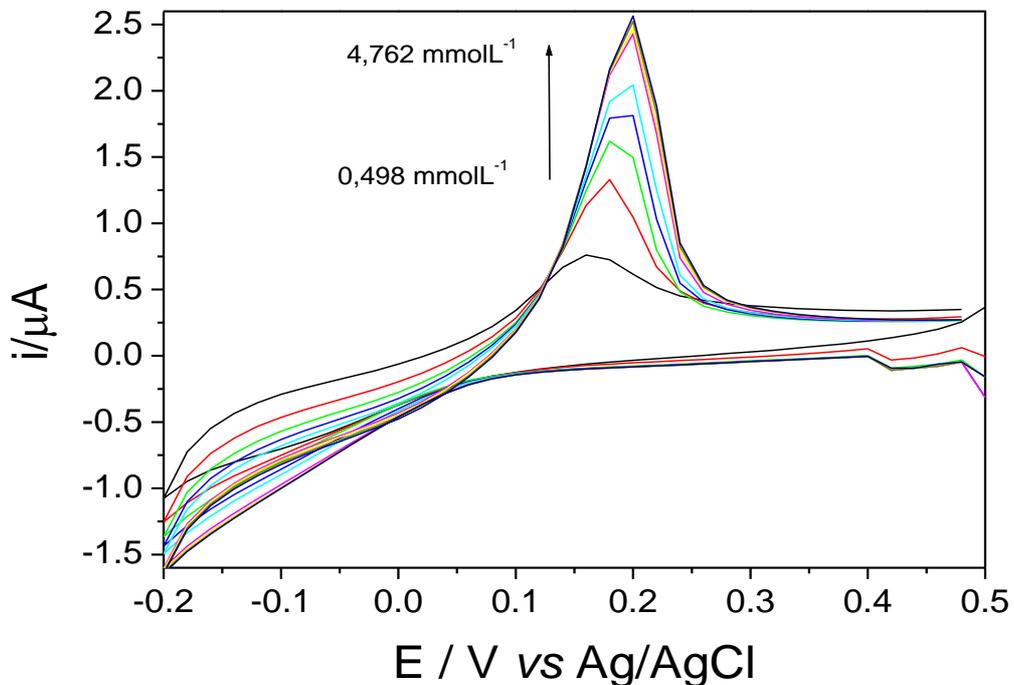
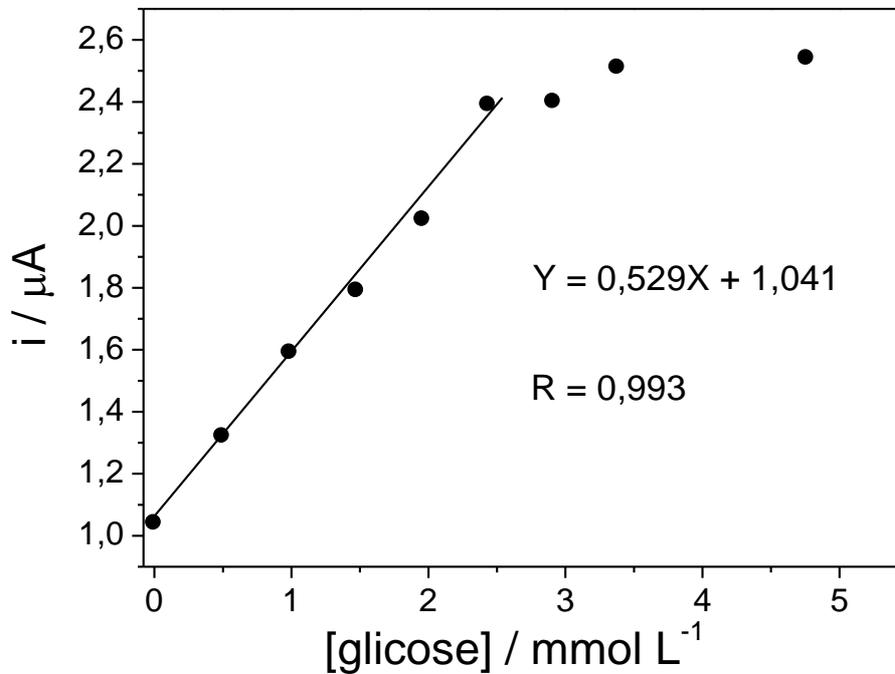


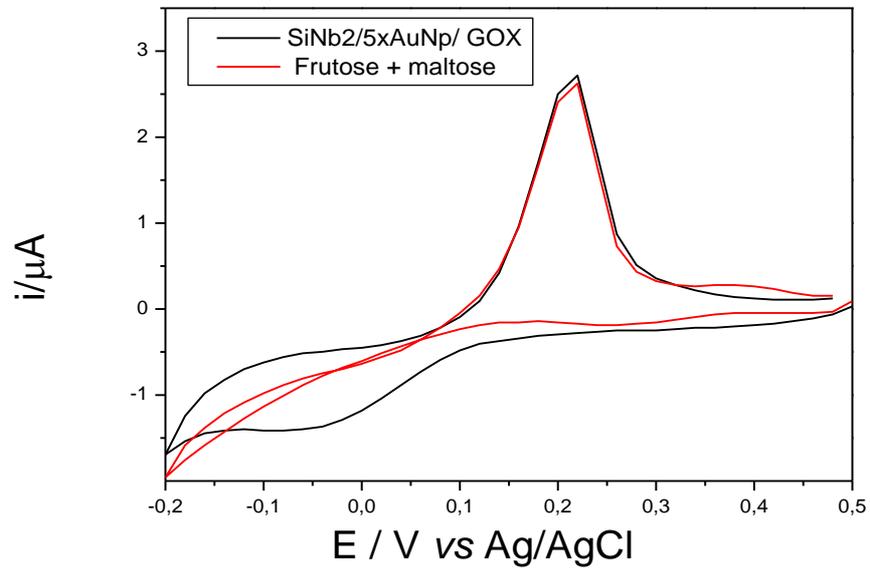
Figura 18 - Relação linear da intensidade de corrente de pico anódico em função da concentração de glicose



7.3 ANÁLISE DE INTERFERENTES

Na Figura 19 são apresentados os voltamogramas cíclicos do eletrodo SiNb₂/5xAuNp/ GOX, na presença de 2,44 mmolL⁻¹ de frutose e maltose. É possível observar que a intensidade do pico anódico não teve uma variação significativa. Este resultado é indicativo de que o biossensor elaborado não é sensível a estes interferentes que normalmente são encontrados na indústria de produção de glicose a partir da hidrólise do amido de milho.

Figura 19 - Voltamogramas cíclicos do eletrodo SiNb2/5xAuNp/ GOX na presença de 2,44 mmolL⁻¹ de frutose e maltose



8 RELAÇÃO DE CUSTOS

Foi realizada uma relação de custos para a utilização do biossensor eletroquímico construído para a determinação de glicose na indústria de alimentos. Partindo-se dos custos para uma escala laboratorial, foi possível prever os custos para uma escala industrial.

Na Tabela 2, está descrito o custo para a produção de 10 biossensores eletroquímicos a partir dos custos dos reagentes utilizados em sua construção.

Tabela 2 - Custo para sintetizar 10 biossensores eletroquímicos

Componentes	Quantidades	Custos (R\$)
Placa FTO	1/2	8,26
NbOEt	0,429 g	57,92
H ₃ CCH ₂ OH	10 mL	0,91
GOX	187,5 U	2,34
TEOS	6,025 mL	3,31
HF	0,05 mL	0,24
NaH ₂ PO ₄	6,9 g	15,94
NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O	8,9	2,47
HNO ₃	1 mL	2,26
HCl	0,05 mL	12,75
Ouro	2,5 mg	5,60
NaBH ₄	0,0565 g	1,037
Total		113,04

A avaliação foi baseada na relação em massa dos reagentes, os quais não foram utilizados em quantidades estequiométricas de modo a se obter uma maior conversão das reações realizadas para a construção do biossensor.

Os valores apresentados se baseiam nas seguintes referências de custo:

- Placa de vidro FTO (100 mm x 2,3 mm): apresenta o valor de R\$ 413,00 / 5 placas. Para produzir 100 biossensores eletroquímicos foram utilizados 5 placas de 10cm x 10cm;

- Etóxido de nióbio (NbOEt): o valor encontrado comercialmente foi de R\$ 625,00 /5,5 g;

- Etanol (CH₃CH₂OH): o valor encontrado comercialmente para o etanol foi de R\$ 91,00/L;

- Tetraetilortossilicato: o valor encontrado comercialmente foi de R\$ 550,00/L;

- Ácido fluorídrico (HF): o valor encontrado comercialmente para o ácido fluorídrico foi de R\$ 484,80/100 mL;

- Fosfato de sódio dihidratado (NaH₂PO₄): o valor encontrado comercialmente para o fosfato de sódio dihidratado foi de R\$ 231,00 /100 g;

- Fosfato de sódio dibásico dihidratado (Na₂HPO₄.H₂O): o valor encontrado comercialmente para o fosfato de sódio dibásico dihidratado foi de R\$ 139,00 /500 g;

- Glicose oxidase (GOX): o valor encontrado comercialmente para o glicose oxidase foi de R\$ 625,00 /50KU (15000 U/g de sólido);

- Ácido nítrico (HNO₃): o valor encontrado comercialmente para o ácido nítrico foi de R\$ 226,00 /100mL;

- Ácido clorídrico (HCl): o valor encontrado comercialmente para o ácido clorídrico foi de R\$ 255,00/500 mL;

- Ouro (Au): o valor encontrado comercialmente para o ouro foi de R\$ 1120/500 mg;

- Boro hidreto de sódio (NaHB₄): o valor encontrado comercialmente para o boro hidreto de sódio foi de R\$ 459,00/25 g.

O sensor que é atualmente utilizado na indústria para a determinação de glicose possui o valor comercial de R\$ 5,00/unidade. No entanto, como as análises são realizadas no mínimo 2 ao dia, o custo total é aproximadamente R\$ 10,00/dia. O biossensor construído apresentou um valor mais elevado que o comercial, de R\$ 11,30/unidade. Porém, deve-se considerar que para a síntese foram utilizados reagentes p.a. e em escala laboratorial. Da escala laboratorial para a industrial, seu custo tende a ser reduzido devido à redução do custo da matéria-prima, quando adquirida em grande quantidade.

Além disso, o biossensor eletroquímico construído pode ser utilizado por um longo período pois o mesmo possui uma boa sensibilidade, precisão e confiabilidade. Deste modo, a redução de custos pode levar à viabilidade da construção.

9 CONCLUSÃO

A proposta de projetar um biossensor aliando a síntese de um filme fino de $\text{Nb}_2\text{O}_5/\text{SiO}_2$ a AuNp em uma superfície FTO com capacidade de quantificar glicose foi atingida e mostrou-se potencialmente favorável para análises em amostras reais.

As AuNp incorporadas no FTO- $\text{Nb}_2\text{O}_5/\text{SiO}_2$ aumentaram significativamente a área eletroativa e a transferência de elétrons. O filme de AuNp mostrou-se estável e fortemente aderido. O filme formado de GOX na superfície do $\text{SiNb}_2/5\text{xAuNp}$ mostrou-se estável e bastante promissor como dispositivo para a determinação de glicose.

REFERÊNCIAS

ALVES, C. R.; DUTRA, R. A. F.; FURTADO, R. F.; GUEDES, M. I. F.; PIMENTA, M. G. R. Aplicações de biossensores na Análise da Qualidade de Alimentos. **Chemical Engineering Journal**.

ARCHELA, E.; DALL'ANTONIA, L.H. Determinação de compostos fenólicos em vinho: uma revisão. **Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas, Londrina**, v. 34, n. 2, p. 193-210, 2001.

CORTES, A. P. **Biossensores para dopamina: lacase imobilizada em polissacarídeo**. Manuscrito da Qualificação. Universidade Estadual de Londrina. Londrina, 2008.

DAUDT, C. E.; SIMON, J. A. Um método rápido para análise de glicose em mostos e sua quantificação em algumas cultivares do Rio Grande do Sul. **Revista Ciência Rural, Santa Maria**.v. 31, p. 697-701, 2001.

DEON, M.; **Sílica mesoporosa organofuncionalizada aplicada na imobilização de ftalocianina tetrassulfonada de cobre (II) para desenvolvimento de sensor eletroquímico**. 95p.Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre,2015.

DENARDIN, C. C.; SILVA, L. P. Estrutura dos grânulos de amido e sua relação com propriedades físico-químicas. **Revista Ciência Rural, Santa Maria**. v. 39, p. 945-954, mai-jun, 2009.

DURÁN, N.; FERREIRA, M. C.; FREIRE, R, S.; KUBOTA, L.; Dual amperometric biosensor device for analysis of binary mixtures of phenols by multivariate calibration using partial least squares. **Analytica Chimica Acta**. v. 485, p. 263-269, 2003.

DURÁN, N.; FREIRE, R, S.; KUBOTA, L. T.; ROSATTO, S. S.; Biossensores amperométricos para determinação de compostos fenólicos em amostras de interesse ambiental. **Química Nova**, v. 24, p. 77-86, 2001.

DURST, R. A.; THÉVENOT, D. R.; TOTH, K.; WILSON, G. S. Electrochemical biosensors: recommended definitions and classification. **Biosensors e bioelectronics**. v. 16, p. 121-131, 2001.

FREIRE, R. S. **Efluente de indústria papelreira: processos alternativos de remediação e emprego de novas metodologias eletroanalíticas para determinação de compostos fenólicos.** 202 f. Tese de Doutorado. Universidade Estadual de Campinas. Campinas, 2002.

LEITE, O. D.; F, O.F. Um experimento de análise em fluxo envolvendo reações enzimáticas e quimiluminescência. **Química Nova**, v. 27, p. 337-341, 2004.

LOPES, O. F.; MENDONÇA, V. R.; SILVA, F.B.F.; PARIS, E.C.; RIBEIRO, C.; Óxidos de nióbio: uma visão sobre a síntese do Nb₂O₅ e sua aplicação em fotocatalise heterogênea. **Química Nova**, v. 38, p. 106-117, 2015.

PIVIDORI, M. I.; ZACCO, E.; LERMO, A.; ALEGRET, S.; MARCO, M. P.; BAEZA, F. S. Los biosensores en la industria alimentaria, el control medioambiental y la salud humana. **Farmespaña Industrial**. p. 68-73, 2006.

RAMOS, J. V. H. **Material híbrido bioinorgânico à base de sílica e quitosana aplicado no desenvolvimento de sensor eletroquímico para determinação de paracetamol na presença de dopamina.** 85p. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2013.

SANTOS, J. C. C. **Imobilização da enzima glicose oxidase em filmes nanoestruturados para aplicação em biossensores.** 94p. Dissertação de Mestrado. Universidade de São Paulo. São Carlos, 2012.

SCHNEID, A. C. **Síntese e aplicações de nanopartículas de prata estabilizadas por silsesquioxano iônico contendo o grupo catiônico 1,4-diazoniabicyclo[2,2,2]octano.** 91p. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, 2014.

STRADIOTTO, N. R.; ZANONI, M. V. B.; YAMANAKA, H. Electrochemical sensors: a powerful tool in analytical chemistry. **J. Braz. Chem. Soc.; Brazil**. v. 14, p. 159-173, 2003.