

UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

ROMARIO CARDOSO LEAL

**DESENVOLVIMENTO DE UM BIOSSENSOR AMPEROMÉTRICO PARA
DETERMINAÇÃO DE TRIGLICERÍDEOS EM BIODIESEL**

São Luís

2014

ROMARIO CARDOSO LEAL

**DESENVOLVIMENTO DE UM BIOSSENSOR AMPEROMÉTRICO PARA
DETERMINAÇÃO DE TRIGLICERÍDEOS EM BIODIESEL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal do Maranhão, como um dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Química, área de concentração Química Analítica.

Orientador: EDMAR PEREIRA MARQUES

São Luís

2014

Aos meus pais Maria Edna Cardoso de Sousa e Luiz José Leal e a minha inesquecível Tia Ana Lúcia (in memoriam).

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais Maria Edna Cardoso de Sousa e Luiz Jose Leal pelo amor, por sempre acreditarem e incentivarem meus estudos apesar das muitas dificuldades que surgiram.

Ao meu orientador Prof. Dr. Edmar Pereira Marques pela orientação deste estudo, pelos ensinamentos, paciência e dedicação.

À Prof.^a Dra. Aldalea Lopes Brandes Marques pelo incentivo e confiança.

A todos os professores do Programa de Pós-graduação em Química.

Ao MSc. Sakae Yotsumoto, que sempre esteve disponível para ajudar quando solicitado.

À minha noiva Valéria Bittencourt pelo amor, companheirismo e apoio.

A todos os alunos e pesquisadores do grupo LPQA e LAPQAP que contribuiriam direta ou indiretamente para execução deste trabalho e pelos momentos de descontração.

Aos amigos do mestrado da turma 2012.2

À FAPEMA, pela bolsa concedida.

À Universidade Federal do Maranhão.

*“Depois que um vento me opôs
resistência, velejo com todos os
ventos.”*

Friedrich Nietzsche

RESUMO

Um biossensor foi desenvolvido para a determinação de triglicerídeos em biodiesel. O biossensor foi preparado através da imobilização de peroxidase obtida de um extrato bruto de abobrinha em pasta de carbono. Foram realizados estudos visando otimizar as condições experimentais, dentre eles, proporção grafite:óleo mineral, concentração de enzimas imobilizadas e estabilidade para o biossensor e estudos de pH, potencial de trabalho e concentração do mediador para o meio. Para o biossensor a melhor proporção encontrada foram 75:25 grafite:óleo mineral e 212 U.mL⁻¹. A melhor resposta do biossensor foi observada em pH 6,5, no potencial de trabalho -0,075 V e 272,4 µmol/L do mediador hidroquinona. A amostra foi preparada através da extração do triglicerídeo presente na amostra biodiesel em uma mistura de 0,8 mL de etanol absoluto, 0,8 mL de água destilada e 1,6 mL de heptano e após a separação das fases, uma alíquota de 1 mL do reativo enzimático foi adicionado em uma alíquota de 0,3 mL da fase orgânica para a conversão do triglicerídeo em peróxido de hidrogênio. O peróxido de hidrogênio formado foi extraído usando 6 mL de solução de tampão fosfato 0,1 mol.L⁻¹ pH 6,5 e 9 mL de clorofórmio. Em seguida, o mediador hidroquinona foi adicionado à solução e medido a concentração de peróxido de hidrogênio presente na amostra em triplicata. A curva analítica construída apresentou boa linearidade no intervalo de concentração até 281 mmol.L⁻¹ com coeficiente de linearidade (r) = 0,997. O biossensor mostrou-se bastante sensível ao analito com os valores para o limite de detecção e quantificação 1,98 x10⁻⁹ mol.L⁻¹ e 5,93x10⁻⁹ mol.L⁻¹ respectivamente.

Palavras-chave: Biossensor, Triglicerídeos, Amperometria

ABSTRACT

A biosensor was developed for determination of triglycerides in biodiesel. The biosensor was prepared by immobilizing peroxidase obtained from a crude extract of zucchini on carbon paste. Studies were realized with intention to optimization experimental condition, including, graphite:mineral oil ratio, concentration of immobilized enzymes and stability for the biosensor and pH studies, working potential and concentration of the mediator to bulk solution. The best ratio found was 75:25 graphite:mineral oil and 212 U.mL⁻¹ to biosensor. The best response was observed at pH 6.5, working potential -0.075 V and 272.4 μmol/L of mediator hydroquinone. The sample was prepared by extracting biodiesel present in the sample in a mixture of 0.8 mL of absolute ethanol, 0.8 ml of distilled water and 1.6 ml of heptane and triglyceride after separation of the phases, an aliquot of 1 ml of enzyme reagent was added to an aliquot of 0.3 ml of the organic phase for the conversion of the triglyceride to hydrogen peroxide. The hydrogen peroxide formed was extracted using 6 mL of phosphate buffer 0.1 mol L⁻¹ pH 6.5 and 9 ml of chloroform. Then, the mediator hydroquinone was added to the solution and measured the concentration of hydrogen peroxide present in the sample in triplicate. The analytical curves showed good linearity in the range up to 281 mmol.L⁻¹ with a coefficient of linearity (r) = 0.998. The biosensor showed to be very sensitive to the analyte with the values for the limit of detection and quantification 1.98×10^{-9} mol L⁻¹ and 5.93×10^{-9} mol L⁻¹ respectively.

Keywords: Biosensor, Triglycerides, Amperometric

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Classificação dos biossensores.....	24
Figura 2.	Influência do pH na atividade enzimática do extrato bruto de peroxidase.....	35
Figura 3.	Voltamogramas cíclicos para avaliar a resposta do eletrodo de pasta de carbono (EPC) e eletrodo modificado com extrato bruto de peroxidase (biossensor) em tampão fosfato 0,10 mol.L ⁻¹ pH 6,5 contendo hidroquinona 5,0x10 ⁻⁴ mol.L ⁻¹ como mediador e 0,15 mol.L ⁻¹ de peróxido de hidrogênio. Velocidade de varredura: 50 mV.s ⁻¹	36
Figura 4.	Representação esquemática da reação entre hidroquinona, peróxido de hidrogênio e peroxidase.....	37
Figura 5.	Voltamogramas cíclicos obtidos para avaliar a influência da proporção pó de grafite:óleo mineral na resposta do biossensor em tampão fosfato 0,10 mol.L ⁻¹ pH 6,5 contendo hidroquinona 5,0x10 ⁻⁴ mol.L ⁻¹ como mediador e 0,15 mol.L ⁻¹ de peróxido de hidrogênio. Velocidade de varredura: 50 mV.s ⁻¹	38
Figura 6.	Voltamogramas cíclicos obtidos para avaliar a influência da concentração de peroxidase na resposta do biossensor em tampão fosfato 0,10 mol.L ⁻¹ pH 6,5 contendo hidroquinona 5,0x10 ⁻⁴ mol.L ⁻¹ como mediador e 0,15 mol.L ⁻¹ de peróxido de hidrogênio. Velocidade de varredura: 50 mV.s ⁻¹	39
Figura 7.	Ensaio amperométrico para avaliar o potencial de trabalho na resposta do biossensor em tampão fosfato 0,10 mol.L ⁻¹ pH 6,5 contendo hidroquinona 5,0x10 ⁻⁴ mol.L ⁻¹ como mediador e 0,15 mol.L ⁻¹ de peróxido de hidrogênio.....	40

- Figura 8.** Estudo da influência do pH sobre a resposta amperométrica do biossensor em tampão fosfato $0,10 \text{ mol.L}^{-1}$ contendo hidroquinona $5,0 \times 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ como mediador e $0,15 \text{ mol.L}^{-1}$ de peróxido de hidrogênio. Potencial de trabalho: $-0,075 \text{ V}$ 41
- Figura 9.** Ensaio amperométrico para avaliar a influência da concentração do mediador em tampão fosfato $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ pH 6,5 e $0,15 \text{ mol.L}^{-1}$ de peróxido de hidrogênio. Potencial de trabalho: $-0,075 \text{ V}$ 42
- Figura 10.** Repetibilidade (a) e resposta relativa (b) do biossensor em tampão fosfato $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ contendo hidroquinona $2,72 \times 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ como mediador e $0,15 \text{ mol.L}^{-1}$ de peróxido de hidrogênio. Velocidade de varredura: 50 mV.s^{-1} 43
- Figura 11.** Curva analítica do biossensor em tampão fosfato $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ contendo hidroquinona $2,72 \times 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ como mediador. Potencial de trabalho: $-0,075 \text{ V}$. $(r) = 0,997$; Equação da reta: $y = 0,0867 + 10,5282 x$ 44

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Especificações do biodiesel. Resolução ANP 14/2012.....	21
Tabela 2.	Valores obtidos na otimização do método.....	45
Tabela 3.	Validação do método proposto através do Teste t de Student.....	46

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Ag/AgCl: Eletrodo de Prata/Cloreto de Prata

ANP: Agencia Nacional de Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis

ASTM: American Society for Testing and Materials

CEN: European Committee for Standardization

CGAR: Cromatografia de Alta Resolução

CV%: Coeficiente de Variância

EN: Norma Europeia

EPC: Eletrodo de Pasta de Carbono

IUPAC: União Internacional de Química Pura e Aplicada

LAPQAP: Laboratório de Pesquisas em Química Analítica

LD: Limite de Detecção

LQ: Limite de Quantificação

NBR: Norma Brasileira

R: Coeficiente de correlação

SD: Desvio Padrão

Tcal: T calculado

Ttab: T tabelado

Xmédia: Média

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	16
2.	REVISÃO DE LITERATURA.....	20
2.1	BIODIESEL.....	20
2.2	BIOSSENSORES.....	23
2.3	METODOLOGIAS ANALÍTICAS PARA A DETERMINAÇÃO DE TRIGLICERIDEOS.....	26
3.	OBJETIVOS.....	29
3.1	OBJETIVO GERAL.....	29
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	29
4.	PARTE EXPERIMENTAL.....	31
4.1	REAGENTES.....	31
4.2	INSTRUMENTAÇÃO.....	31
4.3	OBTENÇÃO DO EXTRATO BRUTO CONTENDO A ENZIMA PEROXIDASE.....	31
4.4	DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DO EXTRATO BRUTO.....	31
4.5	PREPARO DO ELETRODO.....	32
4.6	PREPARO DA AMOSTRA.....	32
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	35
5.1	ESTUDO DA INFLUÊNCIA DO PH NA OBTENÇÃO DO EXTRATO BRUTO DE PEROXIDASE.....	35
5.2	ESTUDO DA RESPOSTA DO BIOSSENSOR.....	36
5.3	ESTUDO DA INFLUÊNCIA DA PROPORÇÃO GRAFITE:ÓLEO MINERAL NA RESPOSTA DO BIOSSENSOR	37
5.4	ESTUDO DA INFLUÊNCIA DA CONCENTRAÇÃO DE PEROXIDASE NA RESPOSTA DO BIOSSENSOR.....	38
5.5	AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE TRABALHO.....	39
5.6	EFEITO DO PH SOBRE A RESPOSTA AMPEROMÉTRICA DO BIOSSENSOR.....	40
5.7	INFLUÊNCIA DA CONCENTRAÇÃO DO MEDIADOR NA RESPOSTA DO BIOSSENSOR.....	41
5.8	REPETIBILIDADE DO BIOSSENSOR.....	42

5.9	CURVA ANALÍTICA E APLICAÇÃO DO BIOSSENSOR.....	44
5.10	VALIDAÇÃO DO MÉTODO ATRAVÉS DO TESTE T DE STUDENT.....	45
6.	CONCLUSÕES.....	48
7.	REFERÊNCIAS.....	50

CAPÍTULO 1: INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

Os problemas ambientais causados pelo uso de combustíveis de origem fóssil vêm contribuindo, cada vez mais, para a busca por combustíveis de fontes renováveis de energia (DERMIBAS, 2008). Uma alternativa à gasolina é o etanol, no qual os Estados Unidos são hoje líder na produção. O Brasil ocupa a vice-liderança mundial e detém grandes avanços tecnológicos na sua produção. Analogamente ao etanol, o biodiesel é a alternativa renovável mais usada no Brasil para o diesel de petróleo (SOUSA e RIBEIRO, 2012), pois não é tóxico, além da melhor qualidade das emissões durante o processo de combustão (LOBO *et al*, 2009).

Segundo a RESOLUÇÃO ANP Nº 14, DE 11.5.2012 - DOU 18.5.2012, o biodiesel é um combustível composto de alquil ésteres de ácidos carboxílicos de cadeia longa, produzido a partir da transesterificação e/ou esterificação de matérias graxas, de gorduras de origem vegetal ou animal, e que atenda a especificação contida no Regulamento Técnico nº 4/2012.

Para garantir a qualidade do biodiesel é necessário estabelecer padrões de qualidade, fixando teores limites dos contaminantes que não prejudiquem a qualidade das emissões da queima, bem como o desempenho e a integridade do motor e a segurança no transporte e manuseio (VALDEZ *et al*, 2012).

Um dos parâmetros de qualidade determinados pelo regulamento técnico nº4/2012 são os glicerídeos. Como contaminantes do biodiesel, os glicerídeos estão relacionados com a transesterificação incompleta do óleo ou gordura com o álcool. A presença de glicerídeos em biodiesel é indesejável, porque é responsável pela diminuição do rendimento do motor (STRADIOTTO e LOURENÇO, 2009), leva a problemas de formação de depósitos, entupimento de bicos, danos ao tanque de combustíveis e possivelmente liberação de acroleína para a atmosfera. A acroleína como o mais simples dos aldeídos insaturados, pelo seu poder reativo, pode causar danos à saúde (QUADROS *et al*, 2011).

Para a determinação de glicerídeos, seguindo a legislação brasileira, utilizam-se os métodos NBR 15342, NBR 15344, ASTM D6584 ou EN 14105, que empregam a cromatografia em fase gasosa de alta resolução (CGAR) como técnica analítica. Esta técnica apresenta boa sensibilidade, entretanto, as análises são lentas e trabalhosas, uma vez que as amostras precisam ser tratadas, por isso, faz-se necessário a busca por metodologias alternativas.

Uma alternativa eficiente é o uso de biossensores. Estes são dispositivos que utilizam componentes biológicos como elementos de reconhecimento, ligados a um sistema de detecção, transdução e amplificação do sinal gerado a partir da reação com o substrato (VISWANATHAN *et al*, 2009). É considerado biocomponente todo o elemento vivo ou derivado de um agente vivo capaz de ser imobilizado em contato íntimo com a superfície de um sensor, de forma a reconhecer determinada espécie de interesse quantitativo (LEE *et al*, 2008). O transdutor é o elemento que recebe as perturbações do processo biocatalítico geradas pela interação receptor-analito e converte-as em um sinal que pode ser eletronicamente visualizado, amplificado e armazenado (GRIESHABER *et al*, 2008). A unidade processadora de sinal funciona como um detector que filtra, amplifica e analisa o sinal traduzido, transferindo-o para um monitor ou armazenando-o em algum dispositivo (PATHAK *et al*, 2007).

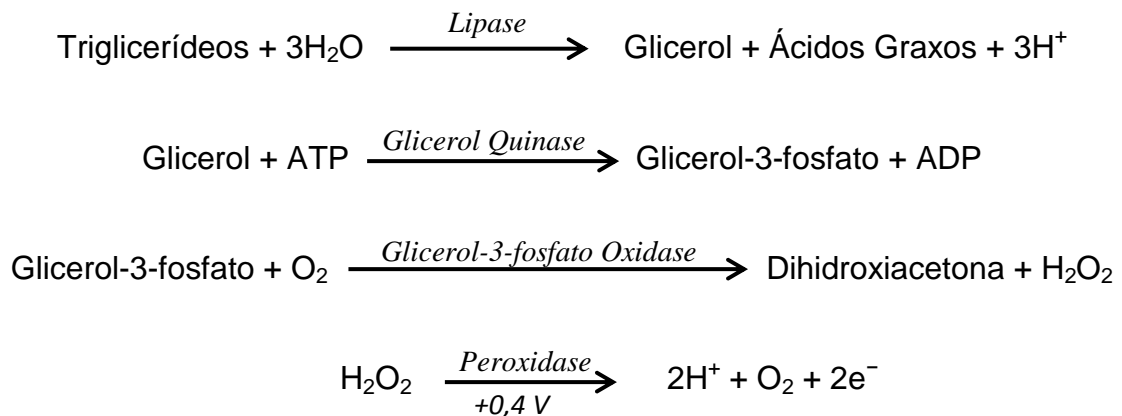
A aplicabilidade dos biossensores está relacionada às suas vantagens, podendo-se destacar: seletividade, sensibilidade, respostas rápidas, baixo custo, detecção de baixas concentrações do analito, número variável de enzimas disponíveis comercialmente, além de uma variedade de metodologias empregadas na construção destes sensores biológicos (ARYA *et al*, 2008)

A seletividade, habilidade para discriminar um entre diferentes substratos, que é uma das características mais importantes de um biossensor, é uma função principalmente do componente biológico (CASERO *et al*, 2013). Há pesquisas dos mais diversos tipos de elementos de reconhecimento biológico, como receptores (RICCI *et al*, 2012), anticorpos (PIMENTA-MARTINS *et al*, 2012), ácidos nucleicos (CHAMBERS, *et al*, 2008), microrganismos (SU *et al*, 2011) e enzimas (SASSOLAS *et al*, 2012), que apresentam maior potencial, devido sua especificidade e propriedade catalítica (GAO *et al*, 2012).

Uma enzima bastante utilizada na confecção de biossensores é a peroxidase, por ser termoestável e poder ter sua atividade catalítica regenerada após tratamento térmico (VIEIRA *et al*, 2003). Esta enzima pode ser encontrada em vários vegetais, (ZERAİK *et al*, 2008) e catalisa a oxidação de alguns substratos doadores de prótons, como peróxidos, polifenóis e outros (OLIVEIRA e VIEIRA, 2006). Diversos trabalhos utilizando tecidos vegetais como fonte de peroxidase para a construção de biossensores são citados na literatura (ZERAİK *et al*, 2008; ZANATTA *et al*, 2007; FATIBELLO-FILHO e VIEIRA, 2002). Um vegetal que se

destaca devido a grande concentração de peroxidase é a abobrinha (VIEIRA et al, 2003).

Várias pesquisas utilizam biossensores envolvendo a enzima peroxidase para a determinação de triglicerídeos em diversas matrizes, como o plasma sanguíneo (PUNDIR *et al*, 2010), alimentos (PRODRONIDIS e KARAYANNIS, 2002) e mais recentemente no controle de qualidade do biodiesel (LUETKMEYER et al, 2009). Em geral, os triglicerídeos presentes na amostra sofrem hidrólise, formando proporcionalmente peróxido de hidrogênio (MOINO *et al*, 2012) que é quantificado através da oxidação a oxigênio, catalisada pela enzima (PÊGAS *et al*, 2010), como descrito nas reações a seguir de acordo com Narang et al, 2010:



O desempenho dos biossensores depende dos materiais empregados na sua elaboração. Depende também das características físico-químicas do material empregado para a construção do transdutor e dos materiais usados para a imobilização do componente biológico, de estabilizadores e mediadores (SOTIROPOULOU *et al*, 2003). Devido seu baixo custo, baixa capacidade de adsorção de oxigênio, baixa concentração de impurezas e possuir distribuição granulométrica uniforme, o pó de grafite é bastante utilizado para a elaboração de biossensores (ANTIOCHIA e GORTON, 2007).

Com vista a contribuir para o crescimento desta área de estudo, desenvolveu-se, neste trabalho, um procedimento eletroanalítico alternativo utilizando um biossensor para a determinação de glicerídeos em amostras de biodiesel utilizando a técnica de amperometria.

CAPÍTULO 2: REVISÃO DE LITERATURA

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 BIODIESEL

O biodiesel surge como um substituto natural ao diesel de petróleo. Por ser oriundo de fontes renováveis é considerado um combustível ecologicamente correto, pois reduz de maneira significativa a emissão de poluentes como os hidrocarbonetos provenientes de combustão incompleta e é praticamente isento de enxofre e substâncias aromáticas cancerígenas comuns aos derivados de petróleo (PIVOTTO et al, 2011).

Segundo a RESOLUÇÃO ANP Nº 14, DE 11.5.2012 - DOU 18.5.2012, o biodiesel é um combustível composto de alquil ésteres de ácidos carboxílicos de cadeia longa, produzido a partir da transesterificação e ou/esterificação de matérias graxas, de gorduras de origem vegetal ou animal, e que atenda a especificação contida no Regulamento Técnico nº 4/2012. Esta reação produz um sistema bifásico com uma fase não polar de ésteres de ácidos graxos e outra mais densa constituída por glicerol e outros componentes residuais do processo (VALDEZ et al, 2012).

A compatibilidade do biodiesel com o diesel de petróleo o caracteriza como uma alternativa capaz de atender à maior parte da frota de veículos a diesel já existente no mercado, sem necessidade de investimentos tecnológicos no desenvolvimento dos motores (ATADASHI et al, 2008). O biodiesel é miscível e físico-quimicamente semelhante ao óleo diesel mineral, podendo ser utilizado puro ou misturado em quaisquer proporções (CHOI et al, 2014).

O biodiesel foi implementado na matriz energética brasileira a partir de 1º de julho de 2008, quando todo óleo diesel comercializado em todo o Brasil deveria conter, obrigatoriamente, 2% em volume de biodiesel. Atualmente o diesel comercializado nos postos pelo Brasil possui 5% de biodiesel e 95% de diesel. Em julho de 2014 esse percentual aumentará para 6% e em novembro de 2014 para 7% (BIODIESELBR, 2014).

As misturas de biodiesel e óleo diesel de petróleo são designadas pela abreviação BX, onde X é a porcentagem de biodiesel na mistura. Por exemplo, B5 é uma mistura cuja porcentagem de biodiesel é igual a 5%, sendo B100 o biodiesel puro (GARCEZ e VIANNA, 2009).

Para ser comercializado, o biodiesel deve obedecer as especificações estabelecidas por lei, conforme a legislação de cada país. No Brasil, a Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis (ANP), é responsável por fiscalizar as atividades relativas à produção, controle de qualidade, distribuição, revenda e comercialização do biodiesel assim como da mistura diesel-biodiesel. Os Estados Unidos seguem a norma da American Society for Testing and Materials (ASTM), e na Europa, a norma do European Committee for Standardization (CEN).

Os contaminantes presentes no biodiesel podem ser provenientes da matéria-prima, processos de produção, como triglicerídeos ou estocagem. Entre os contaminantes oriundos da matéria-prima podem ser citados fósforo, cálcio e magnésio. Relacionados ao processo de produção, podem estar presentes, glicerina livre, glicerídeos não reagidos, álcool residual, resíduos de catalisadores e água. Processos de degradação oxidativa e absorção de umidade estão relacionados principalmente ao processo de estocagem (MONTEIRO et al, 2008).

A tabela 1 apresenta os parâmetros de qualidade do biodiesel, assim como os métodos indicados para as análises especificados pela Resolução ANP Nº 14/2012.

Tabela 1: Especificações do biodiesel. Resolução ANP 14/2012

Característica	Unidade	Limite	Método		
			ABNT NBR	ASTM D	EN/ISO
Aspecto	-	LII(1)	-	-	-
Massa específica a 20° C	Kg/m ³	850 a 900	7148/14065	1298/4052	EN ISO 3675 / EN ISO 12185
Viscosidade Cinemática a 40°C	mm ² /s	3,0 a 6,0	10441	445	EN ISO 3104
Teor de água, máx.	mg/Kg	200	-	6304	EN ISO 12937
Contaminação Total, máx.	mg/Kg	24	-	-	EN ISO 12662

Ponto de fulgor, mín.	°C	100,0	14598	93	EN ISO 3679
Teor de éster, mín	% massa	96,5	15764	-	EN 14103
Resíduo de carbono, máx.	% massa	0,050	15586	4530	-
Cinzas sulfatadas, máx.	% massa	0,020	6294	874	EN ISO 3987
Enxofre total, máx.	mg/Kg	10	15867	5453	EN ISO 20846 / EN ISO 20884
Sódio + Potássio, máx.	mg/Kg	5	15554/15555 15553/15556	-	EN 14108 / EN 14109 / EN 14538
Cálcio + Magnésio, máx.	mg/Kg	5	15553/15556	-	EN 14538
Fósforo, máx.	mg/Kg	10	15553	4951	EN 14107
Corrosividade ao cobre, 3h a 50 °C, máx.	-	1	14359	130	EN ISO 2160
Número Cetano	-	Anotar	-	613 6890	EN ISO 5165
Ponto de entupimento de filtro a frio, máx.	°C	19	14747	6371	EN 116
Índice de acidez, máx.	mg KOH/g	0,50	14448	664	EN 14104
Glicerol livre, máx.	% massa	0,02	15341 15771	6584	EN 14105 / EN 14106
Glicerol total, máx.	% massa	0,25	15344/15908	6584	EN 14105
Monoacilglicerol, máx.	% massa	0,80	15342/15344 15908	6584	EN 14105
Diacilglicerol, máx.	% massa	0,20	15342/15344 15908	6584	EN 14105

Triacilglicerol, máx.	% massa	0,20	15342/15344 15908	6584	EN 14105
Metanol e/ou Etanol, máx.	% massa	0,20	15343	-	EN 14110
Índice de Iodo	g/100g	Anotar	-	-	EN 14111
Estabilidade à oxidação a 110°C, mín.	H	6	-	-	EN 14112 EN 15751

(1) Límpido e isento de impurezas, com anotação da temperatura de ensaio.

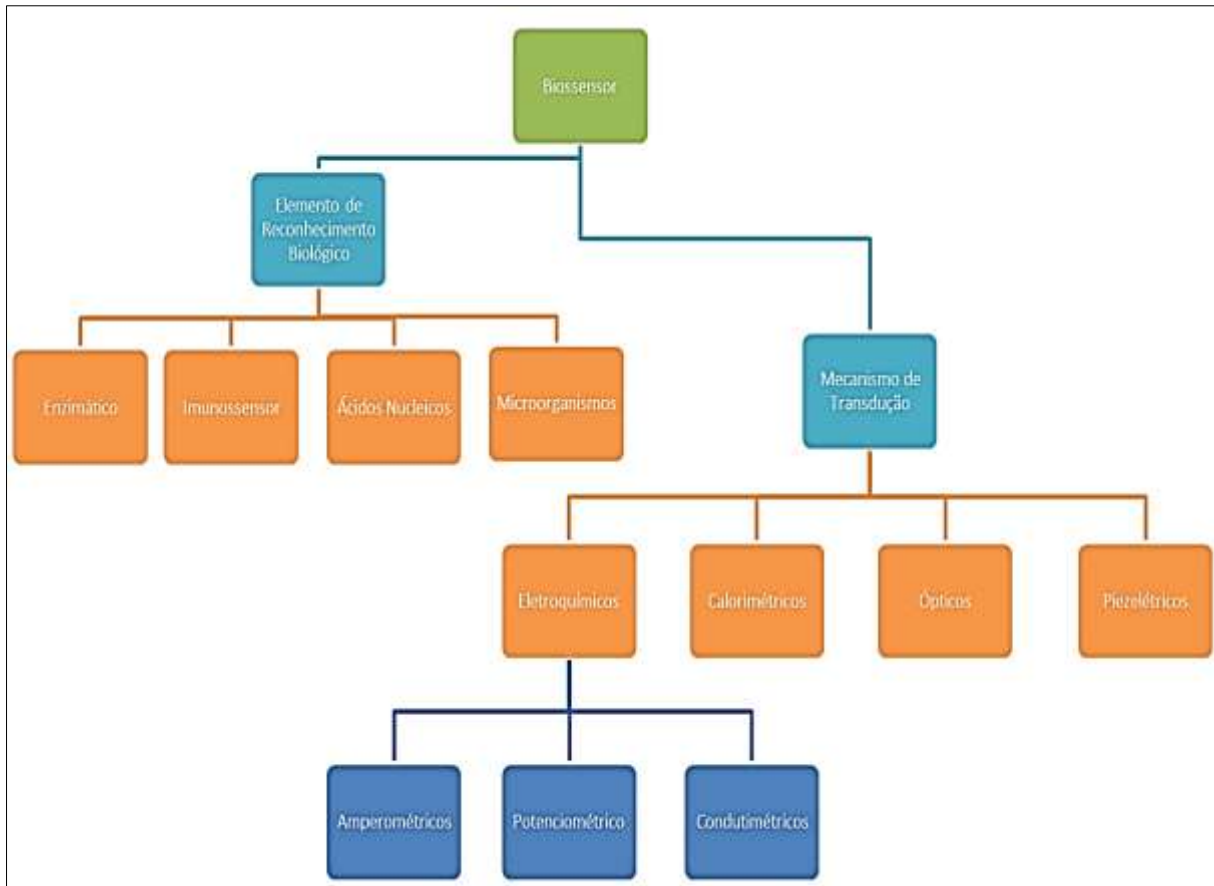
2.2 BIOSSENSORES

Pesquisas sobre biossensores podem ser encontradas em diversos periódicos científicos, visto a multidisciplinaridade do tema (MARQUES e YAMANAKA, 2008). O desenvolvimento desta área iniciou-se a partir da década de 60, quando Clark e Lions desenvolveram o primeiro biossensor. Esse biossensor utilizava a enzima *glicose oxidase* imobilizada em um eletrodo de platina e baseava-se na oxidação da glicose envolvendo consumo de oxigênio, que era proporcional a concentração de glicose (SOARES, 2011).

A principal característica de um biossensor é a capacidade de combinar a atividade seletiva de um elemento de reconhecimento biológico, sensível a um analito de interesse e um transdutor (VISWANATHAN *et al*, 2009), que converte o sinal biológico em elétrico, podendo assim observar diferenças de concentração do analito, que estão relacionadas às mudanças de massa, absorção ou emissão de luz, temperatura ou estado de oxidação (ARYA *et al*, 2008).

De acordo com as recomendações da IUPAC para definição, classificação e nomenclatura de biossensores, estes podem ser classificados de acordo com o elemento de reconhecimento biológico, pelo meio de transdução do sinal, ou por uma combinação dos dois (THÉVENOT *et al*, 2001), como ilustra a figura 1.

Figura 1: Classificação dos biossensores



Fonte: Elaborado pelo autor

É considerado biocomponente todo o elemento vivo ou derivado de um agente vivo capaz de ser imobilizado em contato íntimo com a superfície de um sensor, de forma a reconhecer determinada espécie de interesse quantitativo (LEE *et al*, 2008). O transdutor é o elemento que recebe as perturbações do processo biocatalítico geradas pela interação receptor-analito e converte-as em um sinal que pode ser eletronicamente visualizado, amplificado e armazenado (GRIESHABER *et al*, 2008). A unidade processadora de sinal funciona como um detector que filtra, amplifica e analisa o sinal traduzido, transferindo-o para um monitor ou armazenando-o em algum dispositivo (PATHAK *et al*, 2007).

A seletividade, habilidade para discriminar um entre diferentes substratos, que é uma das características mais importantes de um biossensor, é uma função principalmente do componente biológico (DU *et al*, 2008). Há pesquisas dos mais diversos tipos de elementos de reconhecimento biológico, como receptores (RICH *et al*, 2011), anticorpos (PIMENTA-MARTINS *et al*, 2012), ácidos nucleicos

(CHAMBERS, *et al*, 2008), microrganismos (SU *et al*, 2011), enzimas (SASSOLAS *et al*, 2012), que apresentam maior potencial, devido sua especificidade e propriedade catalítica (GAO *et al*, 2012).

A maioria dos biossensores desenvolvidos utilizam enzimas como componente biológico. A vantagem do uso deste componente é que as enzimas são catalisadores biológicos altamente específicos e seletivos (REJEB *et al*, 2007). Estas propriedades únicas tornam as enzimas poderosas ferramentas para desenvolver dispositivos analíticos (GAO *et al*, 2012). Os biossensores enzimáticos são empregados atualmente na medição da taxa de glicose no sangue (YOO e LEE, 2010), uréia (LAKARD *et al*, 2011), ácido úrico (ARSLAN, 2008), triglicerídeos (NARANG *et al*, 2011), colesterol (HUANG *et al*, 2011), compostos fenólicos (CASERO *et al*, 2013) , peróxidos (SILVA *et al*, 2011), dentre outros. Embora largamente utilizadas, as enzimas possuem certas desvantagens que dificultam sua utilização a longo prazo, pois estas trabalham sob condições estreitas de temperatura, pressão e pH, além da natureza instável quando fora de seu meio natural (ANSARI e HUSAIN, 2012).

Existem diferentes transdutores que podem ser utilizados nos biossensores, a escolha deles dependerá do biocomponente imobilizado na superfície do sensor e das propriedades de cada amostra de interesse (FURTADO *et al*, 2008).

A transdução eletroquímica ocorre através dos movimentos de íons e difusão de espécies eletroativas (FURTADO *et al*, 2008). Essa classe de biossensores se destaca por serem, simples, sensíveis, confiáveis, de resposta rápida, necessitam de instrumentação de baixo custo (MONOŠÍK *et al*, 2012), operam em condições em que não é necessário um pré-tratamento da amostra e permitem efetuar determinações em uma ampla faixa de concentração (SONG *et al*, 2006). Baseado em seus princípios operacionais, os biossensores eletroquímicos se dividem em biossensores amperométricos, potenciométricos e condutimétricos (RONKAINEN *et al*, 2010).

Os biossensores amperométricos se baseiam na transferência de cargas que ocorre após a aplicação de um potencial ou rampa de potencial, provocando a oxidação ou redução de espécies eletroativas na superfície do eletrodo de trabalho e gerando uma corrente. Esta corrente é medida e o sinal gerado é diretamente proporcional à concentração das espécies eletroativa (NARANG *et al*, 2010). Este

biossensor é mais rápido e mais sensível, pois não é necessário esperar que o equilíbrio termodinâmico seja obtido e a resposta é linear em uma faixa relativamente ampla de concentração do analito (NARANG *et al*, 2013).

Os biossensores potenciométricos utilizam eletrodos íon-seletivos como meio de transdução da reação biológica em um sinal elétrico. Este sinal é quantificado através da diferença de potencial entre o eletrodo indicador e o de referência ou dois eletrodos de referência separados por uma membrana seletiva permeável, em que não há fluxo de corrente significativa entre eles (FERNANDEZ *et al*, 2009). Os eletrodos de íons seletivos apresentam as vantagens de serem rápidos, sensíveis, de baixo custo e apresentarem simplicidade na medição (BAKKER *et al*, 2008).

Os transdutores condutimétricos são empregados quando a interação do analito de interesse com o elemento de reconhecimento biológico produz mudanças na condutividade elétrica da solução, devido ao consumo ou produção de espécies iônicas (OLIVEIRA *et al*, 2013). As principais vantagens dos biossensores condutimétricos são: simplicidade de operação e o baixo custo dos detectores. Como principais desvantagens, encontram-se a baixa sensibilidade e a dependência da condutividade com a temperatura (WANG *et al*, 2008).

O desempenho dos biossensores depende dos materiais empregados na sua elaboração. Depende também das características físico-químicas do material empregado para a construção do transdutor e dos materiais usados para a imobilização do componente biológico, de estabilizadores e mediadores (SOTIROPOULOU *et al*, 2003).

Atualmente, a área encontra-se em plena etapa de expansão comercial, devido a sua aplicação em um vasto número de procedimentos analíticos e como sensores específicos que permitem o monitoramento e o controle de processos bioquímicos, sendo hoje motivo de diversas patentes publicadas (KARIM e FAKHRUDDIN, 2012).

2.3 METODOLOGIAS ANALITICAS PARA A DETERMINAÇÃO DE TRIGLICERIDEOS

A determinação de glicerídeos é um dos itens oficialmente requeridos nas especificações do biodiesel pela resolução da ANP 14/2012. Segundo esta

resolução, a metodologia empregada para a determinação deste contaminante é a cromatografia a gás, entretanto, alguns pesquisadores propuseram um método alternativo para a determinação do mesmo.

Luetkmeyer et al, 2009, desenvolveram um eletrodo tipo Clark com duas enzimas imobilizadas para a determinação de glicerol livre e total em amostras de biodiesel. A concentração de glicerol foi determinada amperometricamente através do consumo de oxigênio ocorrido na conversão enzimática do glicerol presente na amostra. O método proposto apresentou um bom coeficiente de correlação linear ($R=0,9990$) com uma resposta linear na faixa de concentração de $6,25 \times 10^{-5}$ a $6,25 \times 10^{-4}$ % (m/v) e os limites de detecção e quantificação de $1,0 \times 10^{-5}$ % e $3,0 \times 10^{-5}$ % (m/v), respectivamente.

Pêgas et al, 2010, utilizaram um microeletrodo de platina com duas enzimas imobilizadas para a determinação de glicerol livre em amostras de biodiesel. O método proposto apresentou um bom coeficiente de correlação linear ($R=0,9894$), com uma resposta linear na faixa de concentração de $8,2 \times 10^{-5}$ a $5,7 \times 10^{-4}$ % (m/m) e um limite de detecção de $6,0 \times 10^{-5}$ % (m/m).

Valdez et al, 2012, propuseram um método enzimático com detecção colorimétrica para a determinação de glicerol livre e total em amostras de biodiesel. O método consiste na conversão do glicerol em peróxido de hidrogênio, que na presença de uma peroxidase e 4-aminoantipirina, formam a água e um composto colorido. O método proposto apresentou bom coeficiente de correlação ($R=0,9937$) na faixa de concentração de $4,95 \times 10^{-5}$ a $3,96 \times 10^{-4}$ % (m/m) e limite de detecção e quantificação $7,10 \times 10^{-6}$ e $2,10 \times 10^{-5}$ % (m/m), respectivamente.

Mendes et al, 2014, desenvolveram um biossensor eletroquímico com extrato vegetal para a determinação de triglicerídeos em biodiesel. O método apresentou faixa de concentração linear de 5,5 a $55 \mu\text{mol.L}^{-1}$ e limite de detecção de $4,0 \times 10^{-8} \text{ mol.L}^{-1}$.

CAPÍTULO 3:

OBJETIVOS

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

- Desenvolver um biossensor para a determinação de glicerídeos em amostras de biocombustíveis.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Extrair a enzima peroxidase do vegetal abobrinha.
- Modificar o eletrodo de pasta de carbono com a enzima peroxidase obtida do extrato bruto enzimático;
- Testar a modificação do eletrodo de pasta de carbono com o extrato bruto enzimático;
- Otimizar as condições experimentais para aplicação do biossensor;
- Aplicar o biossensor em amostras de biodiesel.

CAPÍTULO 4:

PARTE EXPERIMENTAL

4 PARTE EXPERIMENTAL

4.1 REAGENTES

Os reagentes de grau analítico utilizados foram fosfato de sódio dibásico (Merck), fosfato de sódio monobásico monohidratado (Merck), peróxido de hidrogênio (CRQ), guaiacol (Merck), grafite (Aldrich), óleo mineral (União Química) e Hidroquinona (Merck).

4.2 INSTRUMENTAÇÃO

Os equipamentos utilizados foram pHmetro (Quimis), centrífuga 80-2b (Centríbio), espectrofotômetro UV-visível evolution 60s.

Para as medidas eletroquímicas foram utilizadas uma célula eletroquímica de 10 mL com eletrodo auxiliar de platina, eletrodo de referência de Ag/AgCl e o biossensor acoplado a um Potenciostato/Galvanostato PGSTAT Autolab utilizando um software (GPES, versão 4.9.006, Eco Chemie) para aquisição e tratamento de dados. As soluções foram purgadas com nitrogênio por 5 min antes de cada ensaio.

4.3 OBTENÇÃO DO EXTRATO BRUTO CONTENDO A ENZIMA PEROXIDASE

A abobrinha (*Cucurbita pepo*) foi adquirida em supermercados de São Luís. Após lavagem e secagem, 25 g de abobrinha e 100 mL de tampão fosfato 0,1 mol.L⁻¹ pH 6,5 foram homogeneizados em um liquidificador por 1 min. O extrato foi filtrado em quatro camadas de gazes e centrifugado a 3200 rpm por 30 min (VIEIRA *et al*, 2003). A solução sobrenadante foi armazenada em frasco âmbar, sob refrigeração e retirada apenas para análises posteriores.

4.4 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DO EXTRATO BRUTO

A atividade enzimática da peroxidase presente no homogenato da abobrinha foi determinada pelo método espectrofotométrico, de acordo com Vieira *et al*, 2003. Para tanto as medidas foram feitas em triplicata medindo-se a absorbância ($\lambda = 470 \text{ nm}$) do tetraguaicol formado na reação entre 0,20 mL da solução

sobrenadante contendo a enzima, 2,70 mL da solução de guaiacol $0,05 \text{ mol.L}^{-1}$ e 0,10 mL de peróxido de hidrogênio $10,3 \text{ mmol.L}^{-1}$ em tampão fosfato $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ pH 6,5 num período de 1 minuto. A atividade enzimática (U.mL^{-1}) é definida como a quantidade de enzima que causa o aumento de 0,001 unidades de absorvância por minuto e determinada pela equação a seguir de acordo com Garcia (2010):

$$A (\text{U.mL}^{-1}) = \frac{\text{Abs} \cdot 1000}{t \cdot v}$$

Onde:

A: Atividade enzimática (U.mL^{-1})

Abs: Absorvância ($\lambda = 470 \text{ nm}$)

V: volume de homogenato (mL)

t: tempo (min)

4.5 PREPARO DO ELETRODO

O método de imobilização da enzima foi adaptado do procedimento descrito por Vieira *et al* (2003). Assim, a pasta de carbono foi obtida com a homogeneização de 100 μL do extrato enzimático (212 U) e 0,075 g de pó de grafite em um vidro de relógio por 20 minutos. Em seguida foram adicionados 0,025 g de óleo mineral e homogeneizado novamente. A pasta foi embutida em tubo adaptado, fazendo-se contato elétrico com um fio de cobre.

4.6 PREPARO DA AMOSTRA

A amostra de biodiesel de soja, cedida pelo LAPQAP, foi previamente analisada por cromatografia a gás em testes interlaboratoriais, seguindo os procedimentos das normas ASTM D6584 e EN ISO 14105. O triglicerídeo da amostra foi extraído a partir de uma adaptação do procedimento descrito por Valdez (2012), onde foram adicionados 0,4 mL de biodiesel em uma mistura de 0,8 mL de

etanol absoluto, 0,8 mL de água destilada e 1,6 mL de heptano. Esta mistura foi agitada por 1 minuto e separada em centrifuga por 2 min.

Após a separação das fases, uma alíquota de 1 mL do reativo enzimático contendo Lipase Lipoprotéica 2500 U/L, Glicerol Quinase > 1500 U/L, ATP 1,5 mmol/L e Glicerol-3-Fosfato Oxidase > 4000 U/L foi adicionado em uma alíquota de 0,3 mL da fase orgânica para a conversão do triglicerídeo em peróxido de hidrogênio, como apresentado previamente. O peróxido de hidrogênio formado foi extraído usando 6 mL de solução de tampão fosfato $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ pH 6,5 e 9 mL de clorofórmio. Esta etapa foi realizada 3 vezes para garantir que todo o peróxido havia sido extraído.

Esta etapa foi realizada 3 vezes para garantir que todo o peróxido havia sido extraído. Em seguida, o mediador hidroquinona foi adicionado à solução e medido a concentração de peróxido de hidrogênio presente na amostra em triplicata.

CAPÍTULO 5: RESULTADOS E DISCUSSÃO

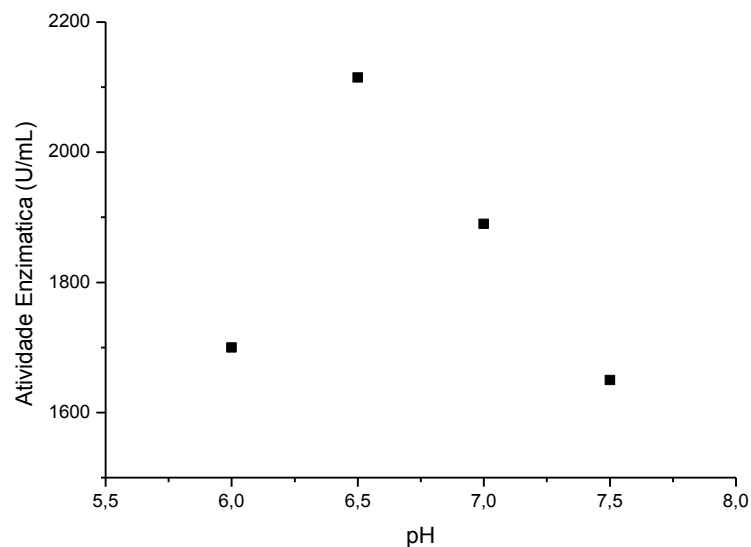
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 ESTUDO DA INFLUÊNCIA DO pH NA OBTENÇÃO DO EXTRATO BRUTO DE PEROXIDASE

O pH é um parâmetro importante a ser estudado, uma vez que as enzimas são muito sensíveis a variações de pH e possuem atividade em faixas limitadas de pH (ANSARI e HUSAIN, 2012).

Sendo assim, a atividade enzimática foi medida pelo em diversos valores de pH (6,0; 6,5; 7,0; 7,5) para determinar a influência do pH na estabilidade da enzima peroxidase e os valores obtidos estão apresentados na Figura 2.

Figura 2: Influência do pH na atividade enzimática do extrato bruto de peroxidase

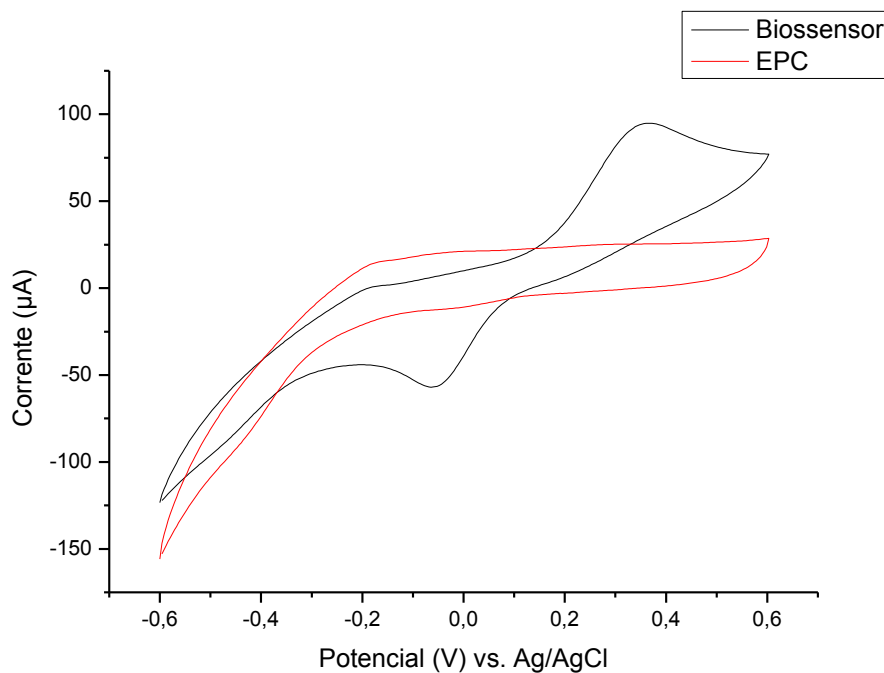


Observa-se o aumento da atividade enzimática com o aumento do pH até adquirir um valor máximo em pH 6,5. Este valor será adotado em estudos posteriores. Os mesmos valores foram encontrados por Fatibello-Filho e colaboradores (2002), Vieira e colaboradores (2003), Zeraik e colaboradores (2008) na determinação da atividade enzimática de peroxidase extraída da abobrinha (*Cucurbita pepo*).

5.2 ESTUDO DA RESPOSTA DO BIOSENSOR

Foi realizado um estudo preliminar para avaliar a resposta do eletrodo modificado com o extrato bruto de peroxidase (biossensor) e do eletrodo de pasta de carbono (EPC). A Figura 3 indica os voltamogramas cíclicos para o eletrodo de pasta de carbono e o biossensor em tampão fosfato $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ pH 6,5 contendo hidroquinona $5,0 \times 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ como mediador e $0,15 \text{ mol.L}^{-1}$ de peróxido de hidrogênio.

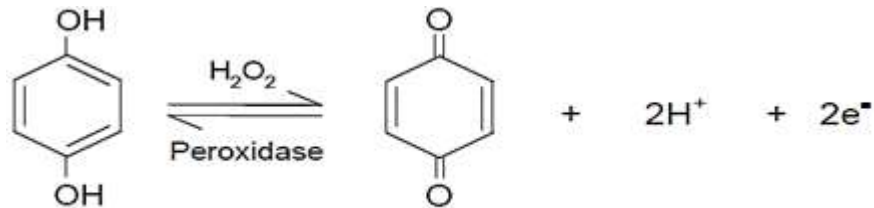
Figura 3: Voltamogramas cíclicos para avaliar a resposta do eletrodo de pasta de carbono (EPC) e eletrodo modificado com extrato bruto de peroxidase (biossensor) em tampão fosfato $0,10 \text{ mol.L}^{-1}$ pH 6,5 contendo hidroquinona $5,0 \times 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ como mediador e $0,15 \text{ mol.L}^{-1}$ de peróxido de hidrogênio. Velocidade de varredura: 50 mV.s^{-1}



No voltamograma cíclico para o EPC, percebe-se que não há presença de picos, indicando que a resposta observada é oriunda da modificação com a enzima. No biossensor, observa-se um comportamento semi-reversível, com um pico de oxidação, em torno de $0,35 \text{ V vs Ag/AgCl}$, correspondente à oxidação enzimática da hidroquinona para p-quinona e um pico de redução em torno de $-0,1 \text{ V}$ relativo à redução eletroquímica da p-quinona, regenerando a hidroquinona (Fatibello-Filho e

Vieira, 2000). A Figura 4 mostra uma representação esquemática da reação entre as espécies.

Figura 4: Representação esquemática da reação entre hidroquinona, peróxido de hidrogênio e peroxidase

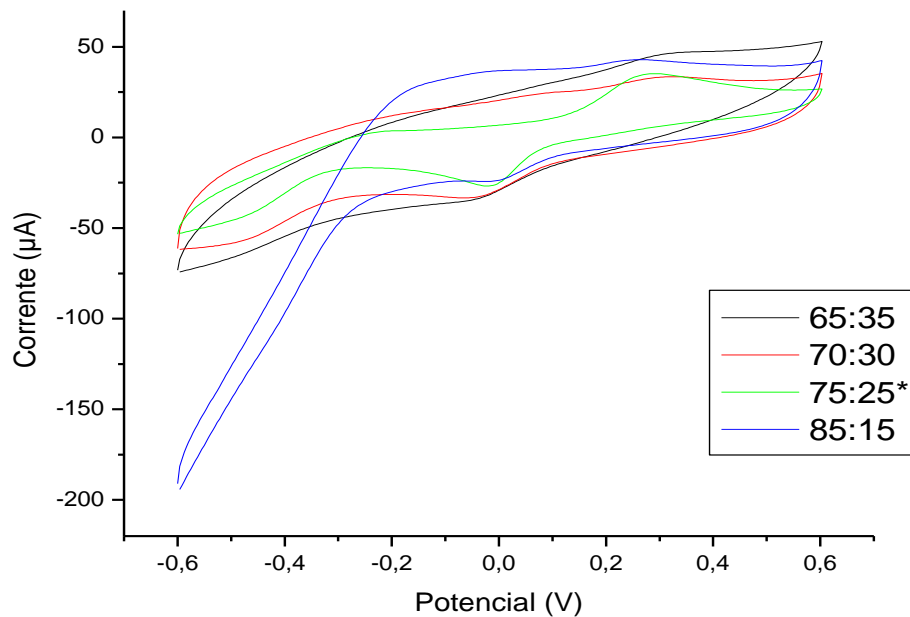


5.3 ESTUDO DA INFLUÊNCIA DA PROPORÇÃO GRAFITE:ÓLEO MINERAL NA RESPOSTA DO BIOSENSOR

Foi realizado um estudo para averiguar a influência da composição da pasta de carbono, mantendo constante a concentração da enzima no eletrodo. Este estudo é importante, por que muito material aglutinante torna a pasta pouco consistente e impede que a mesma seja embutida eficientemente no tubo no eletrodo, entretanto baixas concentrações tornam a pasta quebradiça e podendo facilmente ocorrer a lixiviação do eletrodo para a solução. Além disso, baixos teores de grafite não permitem boa condução, interferindo diretamente no sinal analítico (MOINO et al, 2012).

Foram construídos 4 biossensores em diversas proporções de grafite:óleo mineral (65:35; 70:30; 75:25; 85:15). A figura 5 mostra voltamogramas cíclicos para cada um destes biossensores em tampão fosfato contendo $5,0 \times 10^{-4}$ mol.L⁻¹ de hidroquinona e 0,15 mol.L⁻¹ de peróxido de hidrogênio. Velocidade de varredura: 50 mV.s⁻¹. A proporção 75:25 (grafite:óleo) foi escolhida para estudos posteriores por apresentar maior pico de redução e por apresentar melhor consistência da pasta.

Figura 5: Voltamogramas cíclicos obtidos para avaliar a influência da proporção pó de grafite:óleo mineral na resposta do biossensor em tampão fosfato $0,10 \text{ mol.L}^{-1}$ pH 6,5 contendo hidroquinona $5,0 \times 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ como mediador e $0,15 \text{ mol.L}^{-1}$ de peróxido de hidrogênio. Velocidade de varredura: 50 mV.s^{-1}



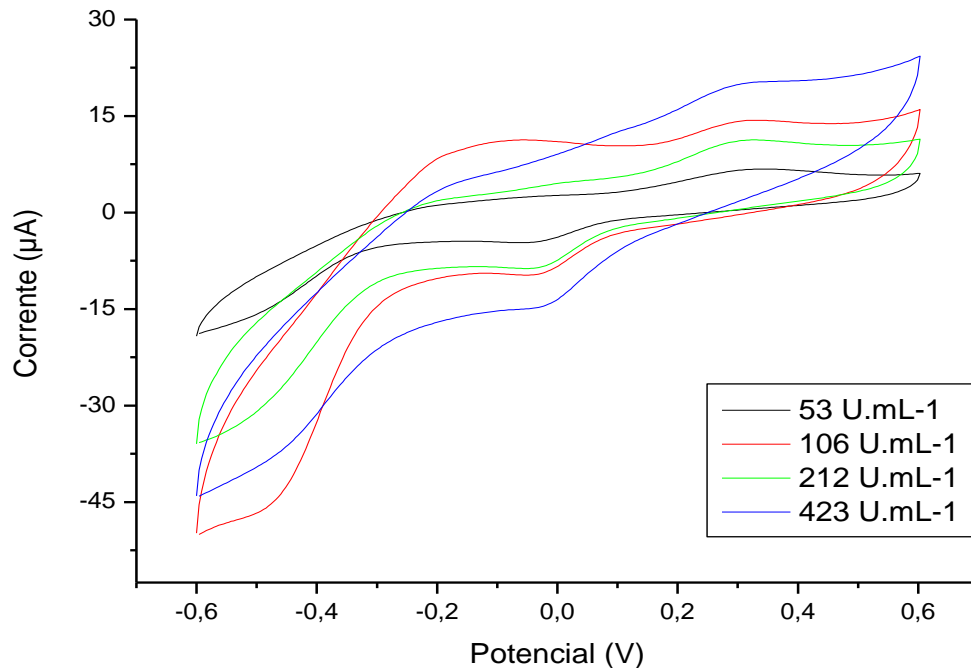
*Multiplicado por 1,5

5.4 ESTUDO DA INFLUÊNCIA DA CONCENTRAÇÃO DE PEROXIDASE NA RESPOSTA DO BIOSSENSOR

Um estudo foi realizado para avaliar a influencia da concentração de enzimas no preparo do eletrodo, tendo em vista que baixas concentrações de enzima não são suficientes para catalisar de forma eficaz a reação enzimática e altas concentrações podem causar problemas na estabilidade do biossensor (MOINO et al, 2012). Foram preparados 4 biossensores com concentrações diversas de peroxidase (53 , 106 , 212 e 423 U.mL^{-1}).

A Figura 6 apresenta voltamogramas cíclicos para cada um dos biossensores em tampão fosfato $0,10 \text{ mol.L}^{-1}$ pH 6,5 contendo $5,0 \times 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ de hidroquinona e $0,15 \text{ mol.L}^{-1}$. Velocidade de varredura: 50 mV.s^{-1} . A concentração enzimática 212 U.mL^{-1} além de apresentar maior pico de redução, apresentou melhor textura da pasta, facilitando o preparo do eletrodo.

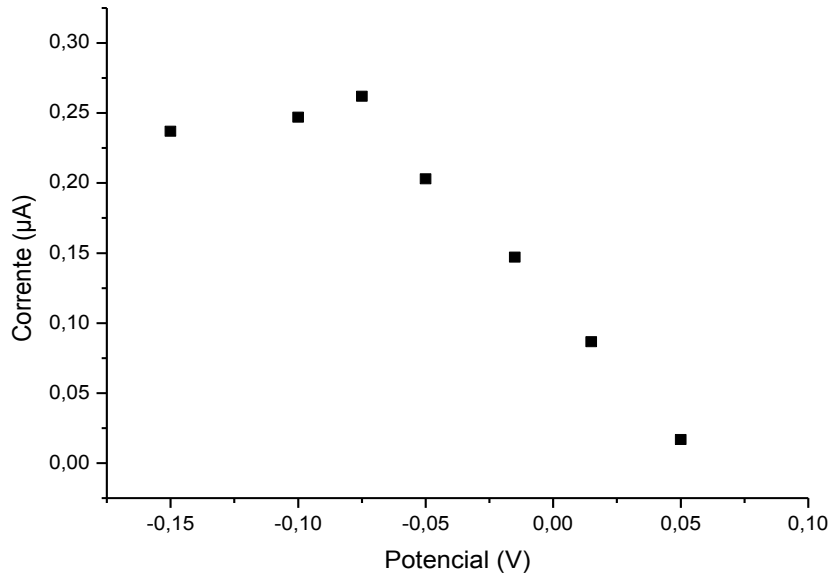
Figura 6: Voltamogramas cíclicos obtidos para avaliar a influência da concentração de peroxidase na resposta do biossensor em tampão fosfato $0,10 \text{ mol.L}^{-1}$ pH 6,5 contendo hidroquinona $5,0 \times 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ como mediador e $0,15 \text{ mol.L}^{-1}$ de peróxido de hidrogênio. Velocidade de varredura: 50 mV.s^{-1}



5.5 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DE TRABALHO

Ensaio cronamperométricos foram realizados para avaliar a influência exercida pelo potencial aplicado. A Figura 7 mostra os ensaios amperométrico para avaliar o potencial de trabalho na resposta do biossensor, podendo-se observar que a corrente de redução aumentou à medida que o potencial variou de 0,05 V no potencial correspondente a $-0,075 \text{ V}$, com um pequeno decréscimo a partir deste ponto. Sendo assim, o potencial $-0,075 \text{ V}$ foi escolhido para estudos posteriores.

Figura 7: Ensaios amperométricos para avaliar o potencial de trabalho na resposta do biossensor em tampão fosfato $0,10 \text{ mol.L}^{-1}$ pH 6,5 contendo hidroquinona $5,0 \times 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ como mediador e $0,15 \text{ mol.L}^{-1}$ de peróxido de hidrogênio

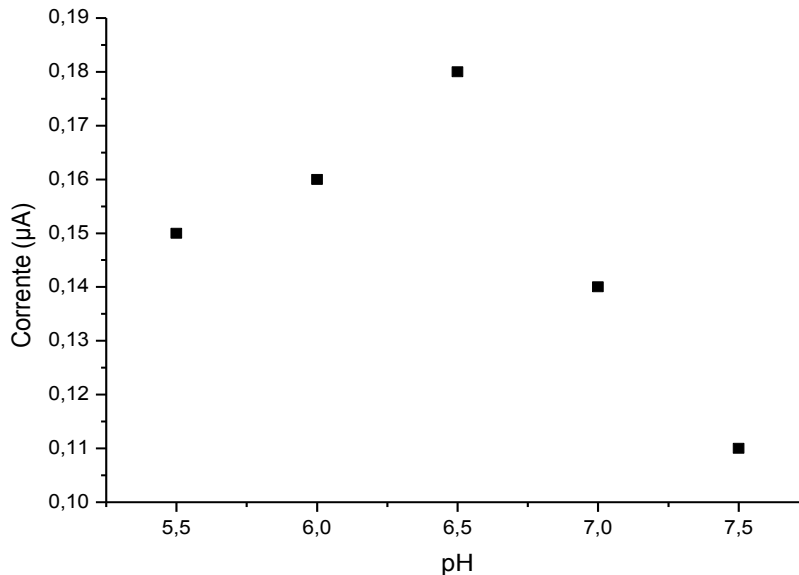


5.6 EFEITO DO PH SOBRE A RESPOSTA AMPEROMÉTRICA DO BIOSSENSOR

O pH exerce grande influência sobre as reações enzimáticas. As enzimas apresentam melhor pH quando a atividade e a velocidade das reações são máximas. Após imobilizadas, as enzimas podem apresentar maior estabilidade que as enzimas livres em solução, sendo menos sensíveis a variações de pH e em alguns casos pode ocorrer até o aumento da atividade enzimática (OLIVEIRA E VIEIRA, 2006).

Ensaios cronoamperométricos foram realizados para verificar a influencia do pH da solução em função da resposta do biossensor. A Figura 8 indica que a enzima imobilizada apresentou comportamento similar à enzima livre, com melhor resposta em pH 6,5.

Figura 8: *Estudo da influência do pH sobre a resposta amperométrica do biossensor em tampão fosfato 0,10 mol.L⁻¹ contendo hidroquinona 5,0x10⁻⁴ mol.L⁻¹ como mediador e 0,15 mol.L⁻¹ de peróxido de hidrogênio. Potencial de trabalho: -0.075 V*



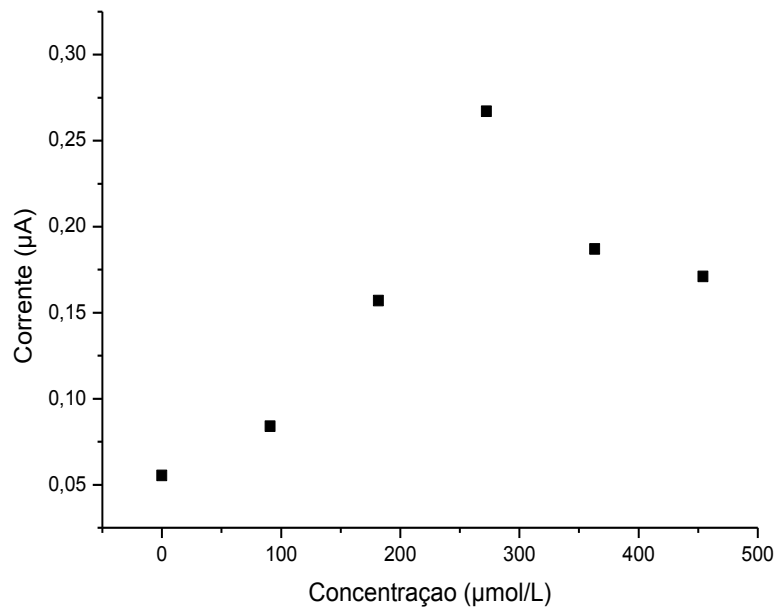
5.7 INFLUÊNCIA DA CONCENTRAÇÃO DO MEDIADOR NA RESPOSTA DO BIOSSENSOR

O peróxido de hidrogênio pode ser oxidado em eletrodo de carbono em potenciais entre 0,30 e 0,60 V vs Ag/AgCl, mas geralmente, esses potenciais relativamente altos são evitados para diminuir a probabilidade de outras espécies eletroativas em solução sofrerem processo oxirredutivo, interferindo na leitura eletroquímica (MATTOS et al, 2003). Sendo assim, faz-se necessário o uso de mediadores eletroquímicos, pois o potencial de trabalho do biossensor é determinado pelo potencial de oxirredução do mediador. (CAMACHO et al, 2007).

O estudo do efeito da concentração de hidroquinona sobre a resposta do biossensor usando peróxido de hidrogênio 0,15 mol.L⁻¹ em tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ (pH 6,5) foi avaliado.

A figura 9 mostra que a resposta analítica do biossensor aumenta até a concentração 272,4 µmol/L do mediador e a partir desse ponto começa a decair. Escolheu-se, portanto, esta concentração, para estudos posteriores.

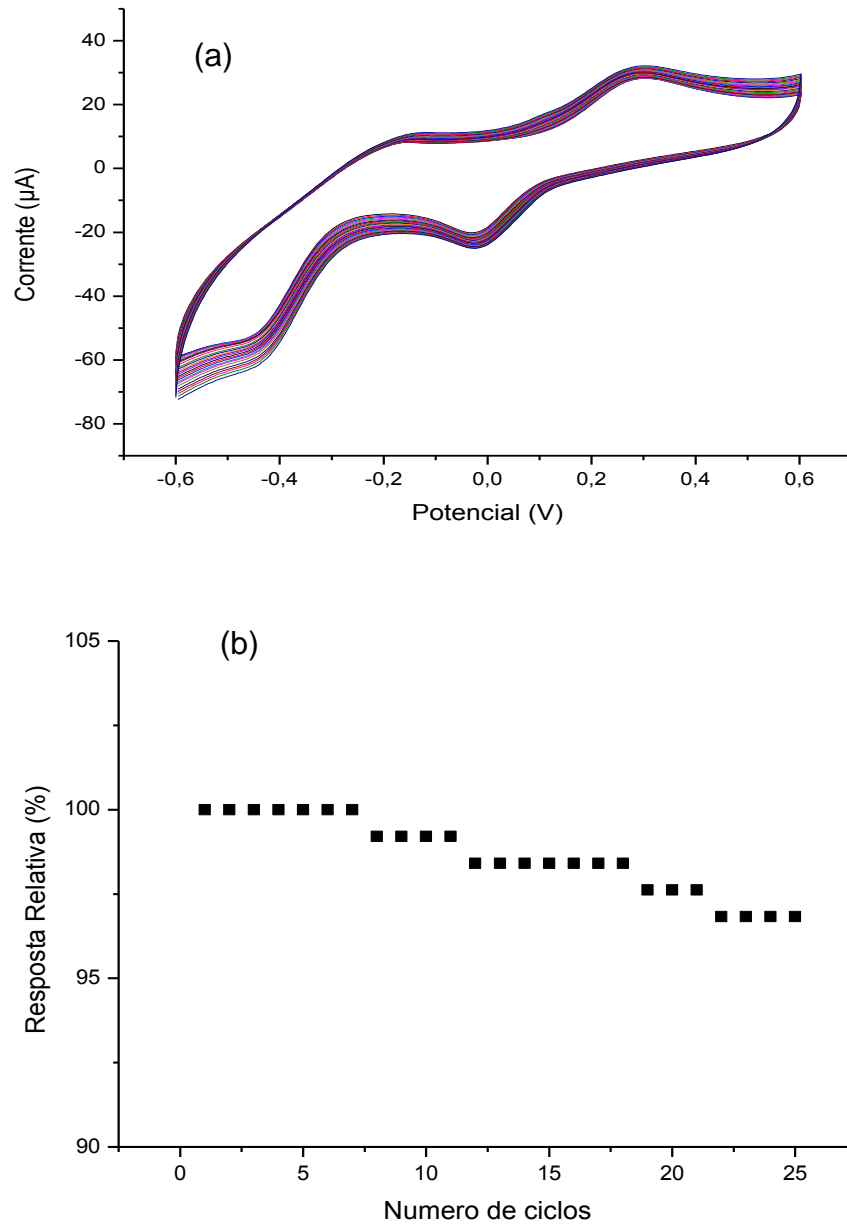
Figura 9: Ensaios amperométricos para avaliar a influencia da concentração do mediador em tampão fosfato $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ pH 6,5 e $0,15 \text{ mol.L}^{-1}$ de peróxido de hidrogênio. Potencial de trabalho: -0.075 V



5.8 REPETIBILIDADE DO BIOSENSOR

Foram realizados estudos para investigar a estabilidade do biossensor (figura 10a). Observou-se que o biossensor apresentou boa estabilidade em 25 medidas sucessivas. Após o 11º medida, notou-se que 99,21% da resposta inicial do biossensor foi mantida. Ao final de 25 medidas, a resposta correspondeu a 96,83% da inicial (figura 9b). A diminuição da resposta pode estar relacionada com a perda de unidades de enzimas que foram fracamente adsorvidas no processo de imobilização (SILVA et al, 2011)

Figura 10: Repetibilidade (a) e resposta relativa (b) do biossensor em tampão fosfato $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ contendo hidroquinona $2,72 \times 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ como mediador e $0,15 \text{ mol.L}^{-1}$ de peróxido de hidrogênio. Velocidade de varredura: 50 mV.s^{-1}

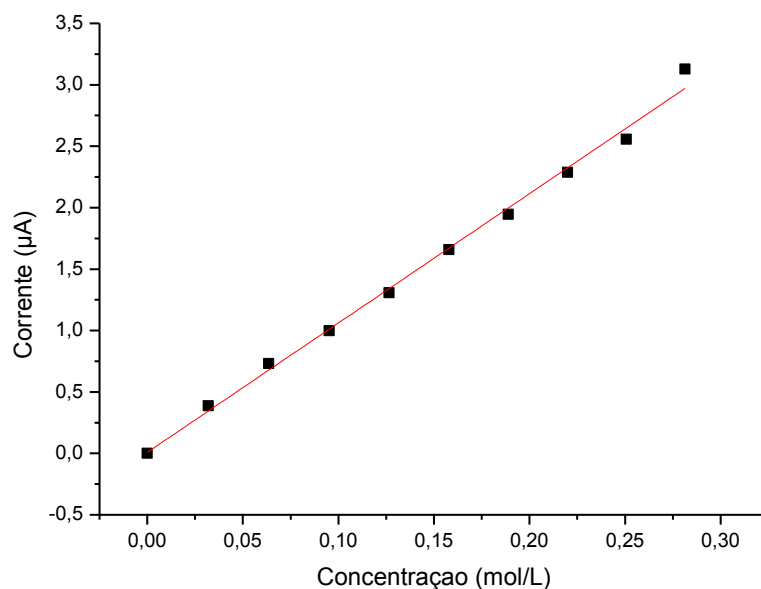


5.9 CURVA ANALÍTICA E APLICAÇÃO DO BIOSSENSOR

Após a otimização de todos os parâmetros operacionais, foram realizadas medidas amperométricas, contendo diversas concentrações do analito de interesse, com o objetivo de construir uma curva analítica.

A curva analítica (figura 11) apresentou boa linearidade no intervalo de concentração até 281 mmol.L^{-1} com coeficiente de linearidade (r) = 0,9976. O limite de detecção (LD) foi calculado como sendo três vezes o desvio padrão do branco dividido pelo coeficiente angular e o limite de quantificação (LQ) como sendo dez vezes o desvio padrão do branco dividido pelo coeficiente angular (SILVA et al, 2011). Os valores para o limite de detecção e quantificação encontrados foram $1,98 \times 10^{-9} \text{ mol.L}^{-1}$ e $5,93 \times 10^{-9} \text{ mol.L}^{-1}$ respectivamente.

Figura 11: Curva analítica do biossensor em tampão fosfato $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ contendo hidroquinona $2,72 \times 10^{-4} \text{ mol.L}^{-1}$ como mediador. Potencial de trabalho: $-0,075 \text{ V}$. (R) = 0,997; Equação da reta: $y = 0,0867 + 10,5282 x$



Por meio da curva acima foi possível obter a equação da reta: $y = 0,086 + 10,528x$, possibilitando a determinação da concentração de peróxido de hidrogênio e consequentemente de triglicerídeo presente na amostra de biodiesel de soja.

Considerando que o peso molecular de 1,0 mol de óleo de soja é de 884 g.mol⁻¹ e a densidade do biodiesel igual a 0,85 kg.L⁻¹ (MOINO, 2012) a concentração média de triglicerídeo para a amostra de biodiesel analisada foi 0,211% m/m enquanto que nos ensaios interlaboratoriais a concentração média encontrada foi 0,237% m/m.

A tabela 2 apresenta um resumo de todos os parâmetros otimizados para a aplicação do biossensor.

Tabela 2: Valores obtidos na otimização do método.

Parâmetros	Resultados obtidos
pH (extração da enzima)	6,5
Proporção grafite:óleo mineral	75:25
Concentração enzimática	212 U.mL ⁻¹
Potencial de trabalho	- 0,075 V
pH (meio)	6,5
Concentração do Mediador	272,4 µmol/L
coeficiente de linearidade (R)	0,998
Limite de detecção (LD)	1,98 x10 ⁻⁹ mol.L ⁻¹
Limite de quantificação (LQ)	5,93x10 ⁻⁹ mol.L ⁻¹

5.10 VALIDAÇÃO DO MÉTODO ATRAVÉS DO TESTE T DE STUDENT

A exatidão do método foi avaliada por meio da comparação dos resultados obtidos pelo biossensor e os valores obtidos pelo método oficial para determinação de triglicerídeos em biodiesel, cromatografia a gás (ASTM D 6584 e EN ISO 14105). A tabela 3 apresenta um comparativo dos valores obtidos pelo método proposto e o método oficial.

Tabela 3: Validação do método proposto através do Teste t de Student

	Biossensor	Cromatografia à Gás
X_{Média}	0,211	0,237
SD	0,011	0,007
CV%	5,21	2,953
N	3	3
Teste t de Student		
	 t_{cal} 	4,10
	t_{tab}	4,30
	Relação t_{cal} e t_{tab}	t _{cal} < t _{tab}

Os resultados obtidos pelo Teste t de Student para o biossensor e para a cromatografia foram estatisticamente concordantes para determinação do teor de triglicerídeo na amostra de biodiesel de soja. O valor de t_{cal} obtido foi menor que t_{tab} para um nível de confiança de 95%, indicando que os métodos são estatisticamente equivalentes.

CAPÍTULO 6: CONCLUSÕES

6. CONCLUSÕES

O biossensor desenvolvido neste trabalho foi capaz de determinar os triglicerídeos presentes na amostra de biodiesel após as otimizações das condições experimentais.

O dispositivo mostrou-se como uma alternativa de baixo custo, de simples construção e utilização para a determinação deste contaminante no biocombustível.

De acordo com o teste t de Student, o biossensor apresentou boa exatidão, quando comparado com a técnica oficial (Cromatografia à Gás).

CAPÍTULO 7: REFERÊNCIAS

7. REFERÊNCIAS

Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis, Resolução ANP n.14, de 11.5.2012 - DOU 18.5.2012

ANSARI, S. A.; HUSAIN, Q.; *Biotech. Adv.*, **2012**, 30, 512

ANTIOCHIA, R.; GORTON, L. *Biosens. Bioelectron.*, **2007**, 22, 2611

ARSLAN, F. *Sensors*, **2008**. 8, 9, 5492

ARYA, S. K.; DATTA, M.; MALHOTRA, B. D. *Biosens. Bioelectron.*, **2008**, 23,1083

ATADASHI, I. M.; AROUA, M. K.; AZIZ, A. A. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, **2010**, 14, 1999

CAMACHO, C.; MATÍAS, J. C.; CHICO, B.; CAO, R.; GÓMEZ, L.; SIMPSON, B.K; VILLALONGA, R. *Electroanalysis*, **2007**, 19, 2538

CASERO, E.; PETIT-DOMÍNGUEZ, M. D.; RAMÍREZ-ASPERILLA, I.; PARRA-ALFAMBRA, A. M.; PARIENTE, F.; LORENZO, E. *Talanta*. **2013**, 115, 15, 401

CHAMBERS, J. P.; ARULANANDAM, B. P.; MATTA, L. L. WEISS, A.; VALDES, J. J.; *Curr. Issues Mol. Biol.*, **2008**, 10, 1

CHOI, O.K.; SONG, J.S.; CHA, D.K.; LEE, J.W. *Bioresource Technology*, **2014**, 166, 51

DERMIBAS, A.; *Energy Conversion and Management*, **2008**, 49, 2106

FATIBELLO-FILHO, O.; VIEIRA, I. C.; *J. Braz. Chem. Soc.*, **2000**, 11, 4, 412

FATIBELLO-FILHO, O. VIEIRA, I. C.; *Quim. Nova*, **2002**, 25, 3, 455

FERNANDEZ, R.E; HAREESH, V.; BHATTACHARYA, E.; CHADHA, A. *Biosensors and Bioelectronics*, **2009**, 24, 1276

FURTADO, R, F.; DUTRA, R. A. F.; ALVES, C. R.; PIMENTA, M. G. R. GUEDES, M. I. F. *Embrapa Agroindústria Tropical*. **2008**, 117

GAO, X.; TANG, G.; SU, X.; *Biosens. Bioelectron.* **2012**, 36, 1, 75

GARCEZ, C. A. G.; VIANNA, J. N. S. *Energy*, **2009**, 34, 645

GRIESHABER, D.; MACKENZIE, R.; VÖRÖS, J.; REIMHULT, E. *Sensors*, **2008**, 8, 1400

HUANG, Q.; AN, Y.; TANG, L.; JIANG, X.; CHEN, H.; BI, W.; WANG, Z.; ZHANG, W. *Analytica Chimica Acta*. **2011**, 30, 1, 135

KARIM, F.; FAKHRUDDIN, A. N. M. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, **2012**, 11, 3, 261

LAKARD, B.; MAGNIN, D.; DESCHAUME, O. VANLANCKER, G.; GLINEL, K. CHAMPAGNE, S. D.; NYSTEN, B.; JONAS, A. M.; BERTRAND, P.; YUNUS, S. *Biosensors and Bioelectronics*, **2011**, 26, 4139

LEE, J. O.; SO, H. M.; JEON, E. K.; CHANG, H.; WON, K.; KIM, Y. H. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. **2008**, 390, 4, 1023

LOBO, I. P.; FERREIRA, S. L. C.; CRUZ, R. S.; *Quim. Nova*, **2009**, 32, 6, 1596

LUETKMEYER, T.; SANTOS, R. M.; SILVA, A.B.; AMADO, R.S.; VIEIRA, E.C.; D'ELIA, E. *Electroanalysis*, **2010**, 22, 9, 995

MARQUES, P. R. B. O.; YAMANAKA, H. *Quím. Nova*, **2008**, 31, 7, 1791

MATTOS, I. L.; SHIRAISHI, K. A.; BRAZ, A. D.; FERNANDES, J. R.; *Quim. Nova.* **2003**, 26, 3, 373

MENDES, R. K.; MOINO, B. P.; GUILHERME, J. P. P.; NOGUEIRA, A. B. *Revista Virtual Química*, **2014**, no prelo

MOINO, B. P.; VALENTE, R. K. M. *Anais do II Encontro de Iniciação em Desenvolvimento Tecnológico e Inovação*. Campinas, Brasil, **2012**

MONOŠÍK, R.; STRED'ANSKÝ, M.; STURDÍK, E.. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*. **2012**, 26, 22

MONTEIRO, M.R.; AMBROZIN, A.R.P.; LIÃO, L.M.; FERREIRA, A.G.F. *Talanta* **2008**, 77, 593

NARANG, J.; MINAKSHI; BHAMBI, M.; PUNDIR, C. S. *Analytical Letters*, **2010**, 43, 1

NARANG, J.; PUNDIR, C. S. *International Journal of Biological Macromolecules*. **2011**, 49, 4, 707

NARANG, J.; CHAUHAN, N.; RANI, P.; PUNDIR, C. S. *Bioprocess and Biosystem Engineering*, **2013**, 36, 425

OLIVEIRA, I. R. W. Z.; VIEIRA, I. C.; *Quim. Nova*, **2006**, 29, 5, 932

OLIVEIRA, J. E.; CONSOLIN-FILHO, N.; PATERNO, L. G.; MATTOSO, L. H. C.; MEDEIROS, E.S. *Revista Eletrônica de Materiais e Processos*. **2013**, 8, 1, 1

PATHAK, P.; KATIYAR, V. K.; GIRI, S. *Azozono Journal of Nanotechnology Online*, 2007, 3

PÊGAS, M. M.; AMADO, R. S.; CASTRO, E. V.; D'ELIA, E.; *Journal of Applied Electrochemical*. **2010**, 40

PIMENTA-MARTINS, M. G. R.; FURTADO, R. F.; BORGES, M. F.; HENEINE, L. G. D.; MATTOSO, L. H. C.; HERRMANN, P. S. P.; OLIVEIRA, J. E.; ALVES, C. R. *Embrapa Agroindústria Tropical*. **2012**

PIVOTTO, F.; LAMANO, M. F.; NASCIMENTO, L. F. A. P. *Exacta*, **2011**, 9, 3, 293

PRODROMIDIS, M. I.; KARAYANNIS, M. I.; *Electroanalysis*, **2002**, 14, 4, 2002

PUNDIR, C. S.; SINGH, B. S.; NARANG, J.; *Clinical Biochemistry*. **2010**, 43, 467

QUADROS, D. P. C.; CHAVES, E. S.; SILVA, J. S. A.; TEIXEIRA, L. S. G.; CURTIUS, A. J.; PEREIRA, P. A. P. *Revista. Virtual Química*, **2011**, 3, 5, 376

REJEB, I. B.; ARDUINI, F.; AMINE, A.; GARGOURI, M.; PALLESCHI, G. *Analytica Chimica Acta*, **2007**, 594, 1, 8

RICCI, F.; ADORNETTO, G.; PALLESCHI, G. *Electrochimica Acta*, **2012**, 84, 74

RONKAINEN, N. J.; HALSALL, H. B.; HEINEMAN, W.R. *Chemical Society Reviews*. **2010**, 39, 5, 1747

SASSOLAS, A.; BLUM, L. J.; LECA-BOUVIER, B. D. *Biotechnology Advances*, **2012**, 30, 3, 489

SILVA, V. P. A.; ALVES, C. R.; DUTRA, R. F.; OLIVEIRA, J. E.; RONDINA, D.; FURTADO, R. F. *Eclat. Quim*, **2011**, 36, 2

SOARES, J. C. Tese (Doutorado em Ciências) – Escola de Engenharia de São Carlos, Instituto de Física de São Carlos, Instituto de Química de São Carlos, Instituto de Engenharia de São Carlos. Universidade de São Paulo, São Carlos, **2011**

SONG, S.; XU, H.; FAN, C. *International Journal of Nanomedicine*, **2006**, 1, .4, 433

SOTIROPOULOU, S.; GAVALAS, V.; VAMVAKAKI, V.; CHANIOTAKIS, N. A.; *Biosens. Bioelectron.*, **2003**, 18, 211

SOUSA, R. A.; RIBEIRO, C. *Quim. Nova*, **2012**, 35, 1, 51

STRADIOTTO, N. R.; LOURENÇO, L. M.; *Talanta*; **2009**, 79, 92

SU, L.; JIA, W.; HOU, C.; LEI, Y. *Biosens. Bioelectron.*, **2011**, 26, 5, 1788

THÉVENOT, D. R.; TOTH, K.; DURST, R. A.; WILSON, G. S. *Biosens. Bioelectronic*. **2001**, 16, 121

VALDEZ, H. C.; AMADO, R.S.; SOUZA, F.C.; D'ELIA, E.; *Quim. Nova*, **2012**, 35, 3, 601

VIEIRA, I. C.; LUPETTI, K. O.; FATIBELLO-FILHO, O. *Quim. Nova*, **2003**, 26, 1,39

VISWANATHAN, S.; RADECKA, H.; RADECKI, J.; *Monatsh Chem.*, **2009**, 140, 891

YOO, E. H.; LEE, S. Y.; *Sensors*. **2010**, 10, 4558

ZANNATA, C. L.; ZOTARELLI, M. F.; CLEMENTE, E.; *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, **2006**, 26, 3, 705

ZERAIK, A. E.; SOUSA, F. S.; FATIBELLO-FILHO, O.; *Quim. Nova*, **2008**, 31, 4, 731

Leal, Romario Cardoso

Desenvolvimento de um biossensor amperométrico para determinação de triglicerídeos em biodiesel /Romario Cardoso Leal. São Luis, 2014.

54f.

Impresso por computador (fotocópia).

Orientador: Edmar Pereira Marques.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Maranhão, Programa de Pós-Graduação em Química, 2014.

1. Biodiesel – triglicerídeos. 2. Biossensor amperométrico. 3. Amperometria. I. Título.

CDU 662756.3:681.586