

DESENVOLVIMENTO DE UM BIOSSENSOR POTENCIOMÉTRICO PARA CONTROLE DE QUALIDADE DE ÓLEO DE GERGELIM COMESTÍVEL

E. F. MAURICIO¹, L. M. C. SILVA¹, A. M. SALGADO¹ e F. L. P. PESSOA²

¹ Universidade Federal do Rio de Janeiro, Departamento de Engenharia Bioquímica

² Universidade Federal do Rio de Janeiro, Departamento de Engenharia Química

E-mail para contato: andrea@eq.ufrj.br

RESUMO – Um biossensor enzimático para detectar o nível de degradação de amostras de óleos vegetais, permitindo um controle mais direto da sua qualidade, foi desenvolvido no presente trabalho. Para sua construção, foi utilizada a enzima comercial lipase obtida de *Candida rugosa* tipo VII como biocomponente, na forma imobilizada, em conjunto com um eletrodo íon-seletivo a hidrogênio para soluções não aquosas (transdutor). Os testes foram realizados com amostras de óleo de gergelim. O sistema (enzima/eletrodo) apresentou resposta ótima durante o tempo reacional de 15 minutos, nas condições de pH 8,75 e temperatura de 37°C. A resposta do transdutor (mV) foi proporcional à concentração do éster na faixa de 10 a 50% (v/v) de ácidos graxos livres. A curva de calibração do instrumento, com fator de correlação igual a 0,979, mostrou boa correlação entre as variáveis estudadas - concentração do óleo e resposta do transdutor, indicando seu bom desempenho para a detecção potenciométrica de triglicerídeos em amostras de óleo de gergelim. Assim, os resultados mostraram uma boa resposta e sensibilidade de detecção, além de uma ótima aplicabilidade do biossensor desenvolvido.

1. INTRODUÇÃO

A qualidade do óleo de gergelim pode variar de acordo com a atividade enzimática, a presença de microrganismos, umidade e auto e foto-oxidação, ocorrendo a deterioração oxidativa dos óleos que é responsável pela formação de sabores estranhos e reduzem a vida de prateleira dos mesmos. Além disso, ocorre a produção de compostos com implicações nutricionais, como hidroperóxidos e aldeídos, que também provoca degeneração hepática e renal, alterações nos sistemas enzimáticos do metabolismo de xenobióticos e distúrbios nos níveis séricos de diversas enzimas (Ferrari, 1998). Houve enfoque neste óleo, devido ao crescente aumento de conhecimento dos benefícios a saúde, gerando maior demanda de mercado do óleo.

A avaliação da estabilidade oxidativa de óleos é realizada por testes de oxidação acelerada, índice de peróxido e determinação de dienos conjugados. No entanto, todos esses métodos necessitam de altas temperaturas apresentando valores questionáveis, pois os peróxidos se decompõem rapidamente, além de não refletirem a estabilidade ou qualidade do óleo em condições normais de

estocagem. Outro método utilizado é a análise sensorial sendo um método mais útil e sensível, porém requer treinamento da equipe e os resultados variam muito de uma equipe para outra (Frankel, 1993).

Neste contexto, a aplicação de um biossensor (Figura 1) se torna promissora. Trata-se de uma classe de instrumentos que apresenta como vantagens: poder ser automatizado e colocado *in line*, assim como, apresentar elevada especificidade, uma vez que tem a capacidade de combinar a seletividade de um componente bioativo com o analito de interesse, com a sensibilidade de um transdutor capaz de converter o sinal biológico em um sinal elétrico proporcional à concentração do analito analisado (Thévenot et al., 1999). Ademais, estes instrumentos são capazes de fornecer resultados rápidos, facilidade no processamento de dados, baixo custo e, muitas vezes, serem portáteis. Na literatura, é possível observar biossensores em diversas áreas, como: área ambiental na detecção de fenol (Silva et al., 2011a), controle de qualidade de biodiesel (Mauricio et al., 2013a) e controle de qualidade de óleos comestíveis (Mauricio et al., 2013b).

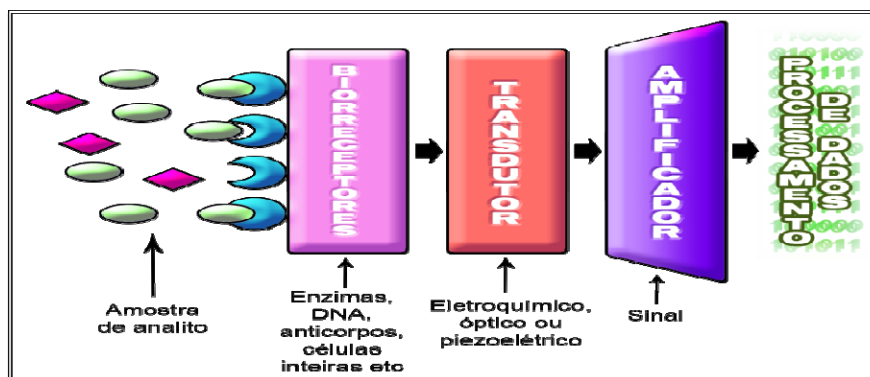


Figura 1 – Esquema de um biossensor.

Fonte: arte gráfica de Melo, 2012.

O biossensor proposto apresenta como sistema enzima/eletrodo a lipase comercial de *Candida rugosa* tipo VII em conjunto com um eletrodo íon-seletivo a hidrogênio para soluções não aquosas, dando continuidade ao trabalho de Melo (2012). A lipase, sendo utilizada como o componente bioativo, promove especificidade ao biossensor que é um fator de máxima importância. Esta enzima ao reagir com os óleos gera produtos similares àqueles produzidos por catálise química, porém com menor grau de termo degradação, devido à temperatura na biocatálise ser bem inferior (Castro et al., 2004).

Portanto, o desenvolvimento de biossensores enzimáticos utilizando a lipase para detectar a qualidade de óleos, objetivo geral deste trabalho, pode ser uma alternativa para minimizar tais problemas relacionados às dificuldades em realizar os testes necessários para o controle da qualidade do óleo, além de ser um método inovador para a indústria de alimentos.

2. MATERIAS E MÉTODOS

2.1. Preparação da Emulsão

Para o desenvolvimento do biossensor, inicialmente, foi necessária a preparação de emulsões utilizando solução tampão fosfato de sódio (100 mM, pH 8,75), o reagente Tween 80% (v/v) e o óleo de gergelim. A mistura foi homogeneizada com um mixer (marca Kika® Werke eurostar Power control-visc) por 5 minutos a 1500 rpm. A concentração do óleo na emulsão variou de 10 a 50% (v/v). Para as análises realizadas foram utilizadas 9,0 mL desta emulsão.

2.2. Biocomponente (Lipase Comercial)

Para os testes, utilizou-se a lipase comercial de *Candida rugosa* tipo VII (marca Sigma-Aldrich). Utilizou-se 1g da enzima imobilizada.

2.3. Processo de Imobilização da Lipase

A imobilização utilizada neste trabalho consistiu na ligação covalente entre a lipase e o suporte vítreo (pérolas de vidro aminopropil com tamanho de poro de 700 Å/ 80-120µm) (marca Sigma-Aldrich) mostrado na Figura 2. O suporte selecionado sofreu o processo de silanização com 3-amino-propiltriétoxissilano (APTS) e a ativação com glutaraldeído.



Figura 2 – Suporte vítreo utilizado.

Fonte: Melo, 2008.

Inicialmente, o suporte foi protonado utilizando solução de ácido nítrico 10% (v/v) durante 30 minutos a temperatura ambiente ($24 \pm 1^\circ\text{C}$) na proporção de 30mL de solução por grama de suporte. Posteriormente, o suporte foi lavado com água ultra pura e em sequência com soluções aquosas de acetona a 25%, 50%, 75% e 100% (v/v) sequencialmente, na proporção de 10mL por grama de suporte. Finalmente, o suporte foi colocado na estufa, a 40°C , por 1 hora. A silanização foi realizada com solução de 3-amino-propiltriétoxissilano (APTS) na concentração de 0,5% (v/v) a 75°C por 3 horas, na proporção de 12 mL de solução por grama de suporte. Após este tempo, o suporte foi lavado e secado novamente, como descrito anteriormente, e submetido ao processo de ativação com solução de glutaraldeído a 2,5% (v/v) em solução tampão fosfato de sódio (100mM, pH 7,0) por 60 minutos a 23°C , na proporção de 12,5mL de solução por grama de suporte. Com o suporte pré-ativado, foi adicionada a solução de lipase, utilizando lipase comercial (1g) em 100 mL de solução tampão fosfato

de potássio (50mM, pH 7,0), e incubados a 20°C por 24 horas.

2.4. Determinação da Atividade Lipásica

Para as análises de atividade enzimática, foi utilizado o método de titulação, segundo o procedimento descrito por Soares et al. (1999), utilizando 9mL de emulsão (óleo de gergelim + Tween + solução tampão fosfato de potássio 100mM, pH 8,75) e 1mL ou 1g de enzima. O ensaio é realizado utilizando agitação magnética, a 37°C durante 15 minutos. Após este tempo, a reação foi paralisada pela adição de 10mL de uma mistura de água, acetona e etanol (1:1:1, v/v/v), conforme esquema mostrado na Figura 3.

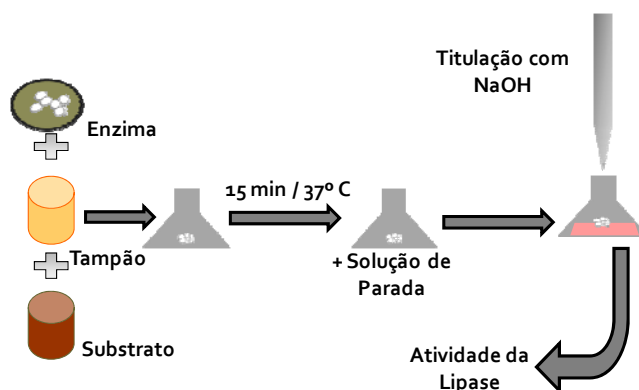


Figura 3 – Esquema da medida da atividade enzimática.

Este método consiste no princípio de que os ácidos graxos formados pela hidrólise dos triacilgliceróis presentes na emulsão serão quantificados por meio da titulação utilizando hidróxido de sódio na concentração de 0,05M e fenolftaleína como indicador. No branco, a mistura que cessa a reação enzimática foi adicionada antes dos outros componentes utilizados no método.

A atividade enzimática varia de acordo com as concentrações das amostras, sendo representada em unidade de atividade enzimática (U). Definiu-se que 1U corresponde à quantidade de enzima que produz 1μmol de ácido graxo por minuto nas condições da análise.

2.5. Estrutura do Sistema do Biossensor

A estrutura do sistema do biossensor montado é mostrado na Figura 4. O sistema (Figura 4) é formado por uma bomba peristáltica (1) como elemento propulsor para o transporte das soluções padrão, amostras e solução de limpeza- solução de Tween 0,5% (v/v) através do sistema de análise; uma câmara reacional (2) com capacidade de 10mL, onde a lipase imobilizada foi acondicionada e diretamente ligada ao eletrodo íon-seletivo de hidrogênio (3), imerso na câmara por um orifício de diâmetro de 1,7cm; e o sistema de transdução (4), ligado ao eletrodo íon seletivo, que apresenta o valor do sinal, em mV, referente as variações detectadas pelo mesmo. O volume total do sistema foi de 15mL e foram usadas mangueiras de silicone para conexão com diâmetro interno de 0,3mm e com 105cm de comprimento.

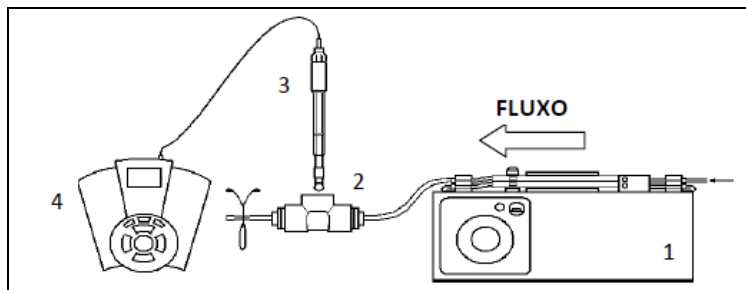


Figura 4 – Esquema da análise potenciométrica.

Fonte: Adaptado de Melo, 2012.

Considerando que os óleos são triglicerídeos, ao sofrer degradação, rompem-se as ligações presentes e com isso diminui-se o substrato para que as lipases possam agir e formar glicerol e ácido graxo livre como visto na Figura 5. Portanto, quanto maior a variação potenciométrica maior é a qualidade do óleo, pois há mais ligações intactas.

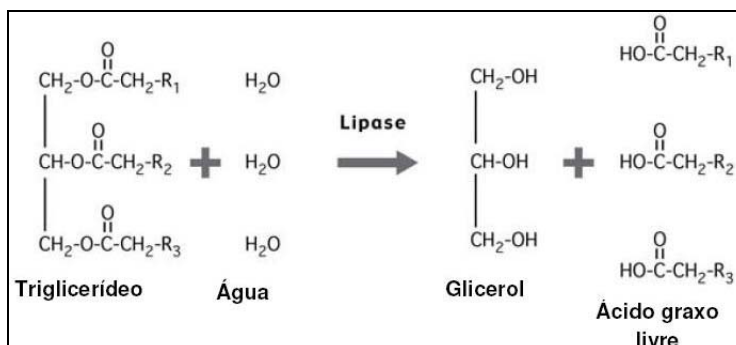


Figura 5 – Esquema da reação que ocorre pela ação da lipase em um éster.

Fonte: Melo, 2008.

3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

3.1. Construção da Curva de Calibração do Biossensor Enzimático

Visando adaptar o sistema biossensor ao que se espera da configuração real deste instrumento, componente biológico ligado diretamente ao sistema transdutor, testes foram realizados usando a enzima imobilizada visando ainda que esta fosse adaptada ao sistema transdutor (eletrodo e transdutor íon-seletivo de hidrogênio).

Além disso, a realização de ensaios com o biocomponente na forma imobilizada permitiria também a sua reutilização, visto que a enzima é o constituinte mais caro do instrumento desenvolvido. Assim, como visto na literatura, a utilização de enzimas imobilizadas favorece a manutenção de suas

propriedades catalíticas por maior tempo, podendo ser reutilizadas em um maior número de análises. Assim, quanto maior a estabilidade operacional do biocomponente imobilizado, maior é seu tempo de uso produtivo, tornando a análise mais barata e simples (Rosatto et al., 2001; Silva, 2011b).

A partir da Figura 6, foi possível observar que a variação de potencial se comportou também de forma logarítmica, com coeficiente de correlação $R=0,979$, em função da atividade da enzima, onde há liberação de íons H^+ , em relação à concentração do substrato (óleo de gergelim), variado na faixa de 10 a 50% (v/v).

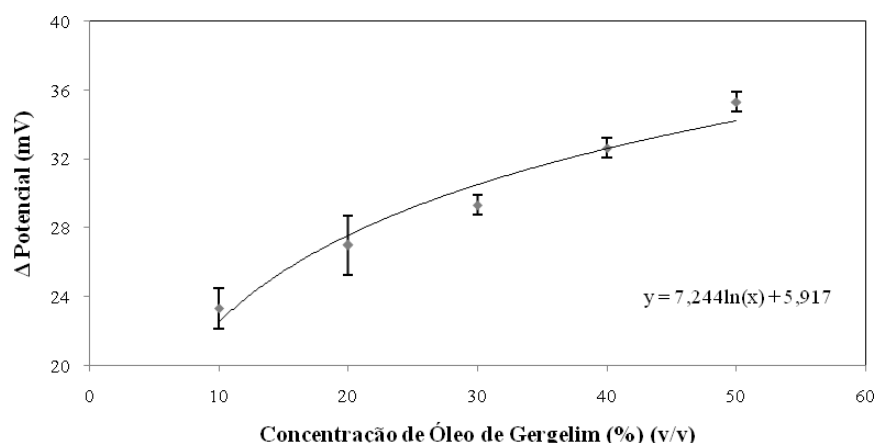


Figura 6 – Variação do potencial (mV) de acordo com a variação da concentração do óleo de gergelim comercial utilizando a enzima na forma imobilizada.

A fim de garantir que a variação potenciométrica crescente observada na Figura 6 se deu pela ação da enzima lipase, também foi avaliada a atividade enzimática com as mesmas variações de substrato gerando uma resposta positiva com o esperado. Como observado na Figura 7, ao se aumentar a concentração do substrato, houve acréscimo da atividade lipásica. Ambas as análises foram desenvolvidas com as mesmas condições: 37°C, 15 minutos e 1g de enzima imobilizada.

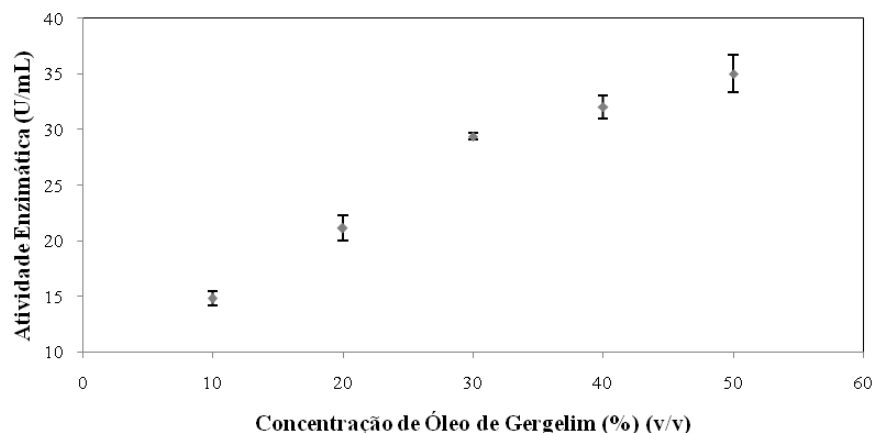


Figura 7 – Atividade enzimática (U/mL) de acordo com a variação da concentração do óleo de gergelim comercial utilizando a enzima na forma imobilizada.

Devido aos bons resultados, a curva mostrada na Figura 6 foi utilizada como a curva de calibração do biossensor enzimático para o óleo de gergelim comercial utilizando a enzima imobilizada.

3.2. Avaliação do Comportamento das Curvas Ascendente e Descendente de Calibração do Biossensor Enzimático

A fim de verificar se a enzima na forma imobilizada teria sensibilidade suficiente para detectar as variações de concentração do analito (óleo de gergelim), e se o eletrodo íon-seletivo hidrogênio não ficaria saturado (existência de histerese), foram realizadas curvas de calibração na forma ascendente e descendente das concentrações do óleo de gergelim comercial analisadas. Observou-se que o eletrodo foi capaz de detectar as mudanças de concentração do óleo de gergelim gerando uma curva de variação potenciométrica coerente com os dados obtidos anteriormente (Figura 8).

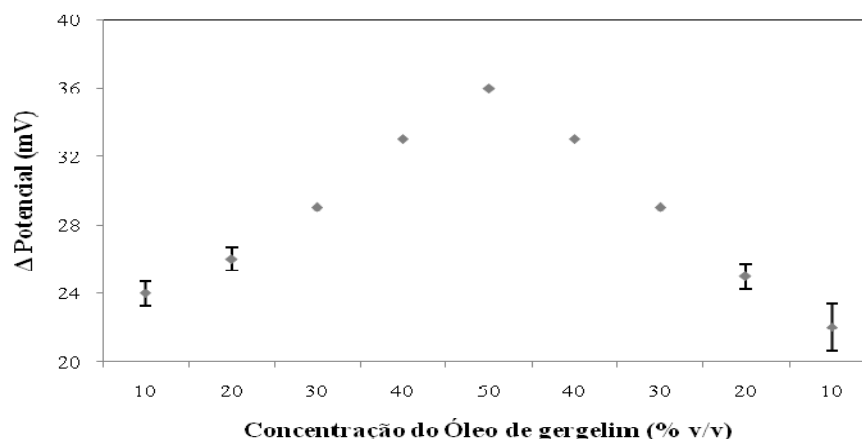


Figura 8 – Variação do potencial (mV) de acordo com o crescimento e decréscimo da variação de concentração do óleo de gergelim utilizando enzima imobilizada, nas condições reacionais definidas no trabalho.

4. CONCLUSÕES

O sistema biossensor proposto mostrou uma boa resposta com a forma de utilização da enzima imobilizada, apresentando uma resposta com perfil logarítmico - resposta do transdutor em diferença de potencial com o aumento da concentração da amostra (óleo de gergelim), na faixa de 10 a 50% (v/v). As análises de atividade lipásica confirmaram que as variações de diferença de potencial encontradas foram decorrentes de reação do biocomponente com o substrato. A curva de calibração do biossensor apresentou coeficiente de correlação de 0,979, mostrando boa sensibilidade do

instrumento. Além disso, o biossensor proposto também apresentou uma boa detecção tanto para concentrações crescentes quanto para decrescentes do substrato, não apresentando saturação enzimática e nem histerese do transdutor.

Diante dos resultados encontrados durante o trabalho, pode-se concluir que o biossensor enzimático desenvolvido tem se mostrado bem promissor para a determinação da degradação de óleo de gergelim. Assim, os ensaios futuros serão com amostras reais, a fim de validar a sua real eficiência.

5. REFERÊNCIAS

- CASTRO, H. F. de; MENDES, A. A.; SANTOS, J. C. dos. Modificação de óleos e gorduras por biotransformação. *Revista Química Nova*, Vol. 27, No. 1, 146-156, 2004.
- FERRARI, C. K. B. Oxidação Lipídica em Alimentos e Sistemas Biológicos: Mecanismos Gerais e Implicações Nutricionais e Patológicas. *Nutr., Campinas*, 11(1): 3-14, jan./jun., 1998
- FRANKEL, E. N. In search of better methods to evaluate natural antioxidants and oxidative stability in food lipids. *Trends in Food Scien. & Technology*, v.4, n.7, p.220-225, 1993.
- MAURICÍO, E. F.; MELO, A. F.; SANTOS, R.; SALGADO, A. M.; PESSOA, F. L. P. Development of an Enzymatic Potentiometric Biosensor to Monitor the Quality of Biodiesel. *35rd Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals*, USA, 2013a.
- MAURICIO, E. F.; SILVA, L. M. C.; MELO, A. F.; SALGADO, A. M.; PESSOA, F. L. P. Desenvolvimento de um Biossensor Enzimático para Degradação de Óleos Comestíveis. *XXXV Jornada Giulio Massarani de Iniciação Científica, Artística e Cultural da UFRJ*, Rio de Janeiro – RJ, 2013b.
- MELO, A. F. Desenvolvimento preliminar de um biossensor enzimático para determinação de taninos hidrolisáveis. *Dissestação de mestrado*, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2008.
- MELO, A. F. Produção e aplicação de lipase no desenvolvimento de um biossensor potenciométrico. *Tese de doutorado*, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2012.
- ROSATTO, S.S. et al. Biossensores amperométricos para determinação de compostos fenólicos em amostras de interesse ambiental. *Química Nova*, v. 24, n. 1, p. 77-86, 2001.
- SILVA, L.M.C.; SALGADO, A.M.; COELHO, M.A.Z. Development of an amperometric biosensor for phenol detection. *Environm. Technology*, v. 32, n. 5, p. 493 – 497, 2011a.
- SILVA, L. M. C. Desenvolvimento de Biossensores Eletroquímicos para Fenol e Uréia com Foco na Aplicação Ambiental, *Tese de Doutorado*, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2011b.
- SOARES, C. F. M.; de CASTRO, M. F.; de MORAES, F. F.; ZANIN, G. M. Characterization and utilization of *Candida rugosa* Lipase Immobilized on Controlled Pore Silica. *Applied Biochem. and Biotec.*, 77/79, 1999.
- THÉVENOT, D. R., TOTH K.; DURST R. A.; WILSON G. S. Electrochemical biosensors: recommended definitions and classification. *Pure and Applied Chemistry*, 71, 2333-2348, 1999.