

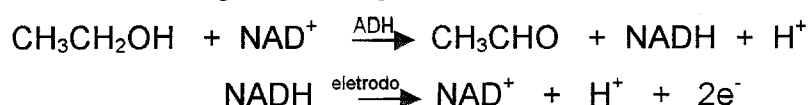
“NOVO BIOSENSOR AMPEROMÉTRICO ALTAMENTE EFICIENTE PARA DETERMINAÇÃO DE ÁLCOOIS”

Atualmente a determinação rápida e confiável de etanol numa grande variedade de amostras tem recebido muita atenção, principalmente porque este composto possui um papel muito importante em vários processos de interesse biológico, clínico e industrial. O etanol é uma das substâncias tóxicas mais amplamente utilizadas. Seu uso de forma abusiva leva a mudanças psicomotoras que estão correlacionadas com uma grande variedade de acidentes. Os efeitos farmacológicos são geralmente observados a partir de 10 mmol de etanol por litro de sangue, podendo ser letal para concentrações 10 vezes maiores que este valor (Liden e col., *J. Pharm. Biomed. Anal.* 17 (1998) 1111; Rang e col., *Pharmacology* 1984). Do ponto de vista econômico, a determinação de etanol é extremamente importante no controle de processos de fermentação, principalmente nas indústrias de polpação, alimentos e bebidas. A determinação de etanol é particularmente relevante para um efetivo controle de qualidade de bebidas alcoólicas, como cervejas, vinhos e destilados (Boujita e col., *Biosens. Bioelectron.* 15 (2000) 257; Patel e col., *Sens. Actuators B* 75 (2001) 101). Além disso, a quantidade de etanol deve ser controlada para fins de classificação e taxaço das bebidas alcoólicas.

Vários métodos têm sido descritos para a determinação de etanol, com destaque para os métodos cromatográficos, espectrométricos e os que envolvem a destilação da amostra para posterior determinação de etanol medindo-se a densidade e/ou o índice de refração do destilado (Lazarova e col., *Acta Biotechnol.* 7 (1987) 97; Sutter, *Chimia* 56 (2002) 59). Apesar de muito empregados, estes métodos são caros, lentos, complexos e requerem uma série de etapas de pré-tratamento, que podem comprometer a integridade das amostras. Tais limitações têm tornado estes métodos pouco atraentes para serem aplicados em análises de rotina. Deste modo, existe uma crescente demanda por metodologias que permitam a determinação de etanol de forma rápida, simples, confiável e com baixo custo. Neste sentido as técnicas eletroquímicas, especialmente as que empregam biossensores amperométricos, apresentam uma série de características favoráveis (tais como seletividade, sensibilidade, rapidez, portabilidade, potencial para

miniaturização, custo reduzido, etc.) que podem suprir as limitações apresentadas pelos demais métodos (Lobo e col., *Electroanalysis* 8 (1996) 932; Marko-Varga e col., *J. Chromatogr. A* 660 (1994) 153).

Biossensores amperométricos para a determinação de etanol têm sido desenvolvidos empregando-se as enzimas álcool oxidase (AOD) ou álcool dehidrogenase (ADH). Os biossensores a base de AOD monitoram o consumo de O₂ ou a formação de H₂O₂. No caso da ADH, a enzima catalisa a oxidação de etanol para acetaldeído na presença de nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD⁺), sendo que a forma reduzida do co-fator (NADH) pode ser detectada amperometricamente de acordo com as seguintes reações:



Esta última abordagem possui algumas características importantes para o monitoramento de etanol em amostras reais, principalmente por ser mais seletiva para etanol e não ser dependente da concentração de oxigênio dissolvido na amostra. Apesar disso, para que os biossensores a base de ADH possam empregados de forma efetiva na determinação de etanol, duas importantes limitações precisam ser superadas: primeiro a baixa estabilidade operacional deste tipo de biossensor e segundo, os altos potenciais necessários para a oxidação de NADH (Rebelo e col., *Anal. Lett.* 27 (1994) 3027; Moiroux e Elving, *J. Am. Chem. Soc.* 102 (1980) 6533). Estes altos potenciais podem permitir a interferência de outros compostos eletroativos que geralmente estão presentes em amostras reais. Além disso, os subprodutos intermediários formados durante a oxidação do NADH em potencial elevados podem levar a uma passivação da superfície do eletrodo (Elving e col., *Bioelectrochem. Bioenerg.* 9 (1982) 365). Assim, muitos esforços têm sido realizados visando diminuir o sobrepotencial de oxidação do NADH, e vários mediadores orgânicos e inorgânicos têm sido utilizados na construção de eletrodos quimicamente modificados buscando-se este objetivo.

Uma abordagem bastante promissora é a que emprega sílica gel modificada com óxido de metais e espécies mediadoras de transferência de elétrons imobilizadas em sua superfície (Gaillo e co., *J. Electroanal. Chem.* 347 (1993) 435;

Kubota e col., *Electrochim. Acta* 41 (1996) 1465). A versatilidade da sílica gel para imobilizar diferentes materiais, mantendo suas propriedades originais (como rigidez, porosidade, tamanho de partícula, alta área superficial e estabilidade química), tem mostrado características muito atraentes para o desenvolvimento de novos sensores e biossensores eletroquímicos (Gushikem e Rosatto, *J. Braz. Chem. Soc.* 12 (2001) 695). Mais especificamente, a imobilização de mediadores das classes fenoxazinas e fenotiazinas (Figura 1) sobre sílica gel modificada com óxido de metais tem apresentado um grande potencial para o desenvolvimento de novos sensores para NADH (Santos e col., *Electroanalysis* 14 (2002) 805; Santos e col., *Electrochim. Acta* 47 (2002) 3351). Por exemplo, quando adsorvido sobre sílica gel modificada com óxido de nióbio (SN), o azul de Meldola (MB) apresentou uma excelente estabilidade (devido a uma forte interação do mediador com a superfície da sílica modificada), melhorando a atividade eletroquímica com o deslocamento do potencial de oxidação do NADH para uma faixa de potencial mais favorável (ao redor de 0 V). Assim estes mediadores apresentaram características favoráveis (estabilidade e faixa ótima de potencial redox) que podem ser utilizadas para superar as limitações normalmente observadas nos biossensores à base de ADH.

Assim, este processo descreve o desenvolvimento de um biossensor amperométrico para etanol baseado nas propriedades eletrocatalíticas de mediadores fenoxazinas e/ou fenotiazina adsorvidos sobre sílica gel modificada com óxido de metais. A resposta do dispositivo proposto baseia-se na oxidação de NADH que é gerado a partir da reação entre NAD^+ e etanol catalisada pela ADH. Como as concentrações de NAD^+ e do mediador são constantes, o aumento na corrente eletrocatalítica depende somente da concentração de álcool (ou seja, formação de NADH), tal como demonstrado no esquema da Figura 2.

Os resultados ilustrativos aqui apresentados referem-se a um biossensor a base de azul de Meldola adsorvido sobre sílica gel modificada com óxido de nióbio, ressaltando-se que respostas similares podem ser obtidas empregando-se azul do Nilo ou azul de toluidina como mediadores de elétrons e sílica gel modificada com óxidos de outros metais (como por exemplo, zircônio e titânio). Também se utilizou um eletrodo de pasta de carbono, sendo que o mesmo princípio pode ser utilizado

para outros tipos de eletrodos a base de materiais compósitos, principalmente para eletrodos obtidos pela técnica de “screen printed”.

A ADH foi imobilizada sobre grafite usando-se os métodos de adsorção física ou ligação cruzada na presença de aditivos estabilizadores. O biossensor propriamente dito foi confeccionado misturando-se, em quantidades e proporções otimizadas, este grafite modificado com sílica gel recoberta, por exemplo, com óxido de nióbio e azul de Meldola (SNMB). A configuração do biossensor foi desenvolvida de modo a incorporar, na pasta de carbono, todos os reagentes necessários para a determinação de etanol. Esta característica é extremamente útil para aumentar a gama de aplicações práticas do sensor, especialmente as que visam o monitoramento *in situ* de etanol em amostras reais.

A Figura 3 mostra que biossensores construídos utilizando-se somente ADH e NAD^+ (a) ou ADH, NAD^+ e SN (b) não apresentam uma resposta significativa para etanol. Entretanto, com os biossensor a base de ADH/ NAD^+ /SNMB observou-se uma corrente catalítica bastante expressiva (c), conferindo a este biossensor uma excelente sensibilidade para etanol ($2,3 \mu\text{Acm}^{-2}\text{mmol}^{-1}\text{L}$). Estes resultados confirmam que o azul de Meldola é um eficiente mediador da transferência de elétrons na superfície do eletrodo.

A presença do cofator NAD^+ também possui um papel fundamental no mecanismo do biossensor proposto. Deste modo, o efeito sobre a resposta do biossensor usando-se NAD^+ incorporado na pasta de carbono ou livre em solução foi avaliado. Como pode ser observado na Figura 4, quando o NAD^+ está imobilizado na pasta modificada (a) obtém-se uma sensibilidade cerca de quatro vezes maior do que a obtida empregando-se o cofator livre em solução (b). Este resultado mostra que mesmo quando imobilizado na matriz de carbono, o NAD^+ ainda apresenta uma certa mobilidade, o que permite que ele difunda da pasta para a superfície do eletrodo e reaja com o etanol e a ADH.

Após avaliar e otimizar a resposta do biossensor em função do processo de imobilização, carga enzimática e quantidade de NAD^+ ; o comportamento do dispositivo proposto também foi investigado em termos da variação da resposta analítica em função do potencial de trabalho, pH, eletrólito suporte e força iônica.

Obteve-se uma resposta máxima usando-se o biossensor a base de ADH/NAD⁺/SNMB desenvolvido com o método de imobilização por ligação cruzada, a um potencial aplicado de 0.0 mV vs SCE e tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ a pH 7,8 como eletrólito suporte. A curva analítica mostrada na Figura 5 e todos os demais resultados apresentados neste processo foram obtidos utilizando-se estas condições.

A Figura 5 mostra que o biossensor a base de ADH/NAD⁺/SNMB possui uma excelente sensibilidade para etanol e uma ampla faixa linear de resposta (de 0,1 até 10 mmol L⁻¹). Esta figura também mostra que o biossensor possui uma resposta favorável frente a mudanças na concentração de etanol na ordem de 0,55 mmol L⁻¹. A curva analítica obtida foi ajustada pela equação: $j(\mu\text{Acm}^{-2}) = 0,06 (\pm 0,02) + 2,33 (\pm 0,03) (\mu\text{Acm}^{-2}\text{mol}^{-1}\text{L}) [\text{etanol}]$, $r^2 = 0,9996$ para $n = 21$. Limites de detecção ao redor de $8,0 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹ de etanol puderam ser estimados considerando-se 3 vezes o desvio padrão do branco. O biossensor proposto também apresentou uma excelente repetibilidade, com um desvio padrão relativo de apenas 2,1% para uma série de 8 medidas sucessivas de uma solução de etanol 0,5 mmol L⁻¹.

Além disso, o biossensor mostrou uma excelente estabilidade operacional, conforme mostra a Figura 6 que representa os dados de corrente obtidos a partir de repetidas análises de uma solução 0,5 mmol L⁻¹ de etanol, realizadas em intervalos de 10 minutos durante um prolongado período de tempo, sendo que cerca de 95% da atividade inicial foi mantida após 300 determinações. Quando estocado no refrigerador, o sensor manteve sua bioatividade durante aproximadamente três meses.

O biossensor a base de ADH/NAD⁺/SNMB apresentou um tempo de resposta curto, alcançando 95% de sua resposta máxima em apenas 0,6 segundo. Este tempo de resposta é muito bom, considerando-se que se trata de um eletrodo de pasta de carbono. Provavelmente, o método de construção e a configuração do biossensor contribuíram para dificultar a difusão da solução através da pasta, permitindo uma rápida resposta.

A faixa linear de resposta, sensibilidade e, especialmente, a estabilidade apresentadas pelo biossensor proposto foram muito superiores às obtidas pela

maioria dos biossensores amperométricos para determinação de etanol descritos na literatura (Lobo e col., *Electroanalysis* 8 (1996) 932; Boujita e col., *Biosens. Bioelectron.* 15 (2000) 257; Patel e col., *Sens. Actuators B* 75 (2001) 101; Gulce e col., *Biosens. Bioelectron.* 17 (2002) 517; Razumiene e col., *Electroanalysis* 14 (2002) 43). Estas características favoráveis permitiram a aplicação do dispositivo proposto no monitoramento direto de etanol em diferentes amostras reais de bebidas alcoólicas, tais como cerveja, vinho tinto, whisky, tequila e cachaça. As Tabelas 1 e 2 mostram, respectivamente, as concentrações e as taxas de recuperação obtidas com o biossensor. Tal como pode ser observado, os dados mostraram uma excelente correlação entre os resultados obtidos com o biossensor e os certificados pelos fornecedores. Além disso, o biossensor também apresentou taxas de recuperação muito boas, apesar dos potenciais interferentes que normalmente estão presentes em amostras reais.

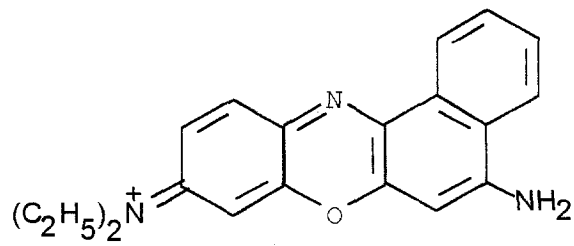
O uso do mediador azul de Meldola adsorvido sobre a superfície de sílica gel modificada com óxido de nióbio possibilitou uma abordagem simples e efetiva para o desenvolvimento de biossensores a base de ADH com boas propriedades electrocatalíticas (sensibilidade, seletividade e estabilidade). Os experimentos descritos neste processo ilustram a habilidade do biossensor proposto para ser empregado na detecção de etanol em amostras reais, sem a necessidade de adição de qualquer reagente, e apresentando boa sensibilidade, seletividade, rapidez e precisão. Estas características podem ser usadas para diminuir o tempo e o custo envolvidos em análises rotineiras de etanol em amostras de interesse biológico, clínico e industrial.

Tabela 1

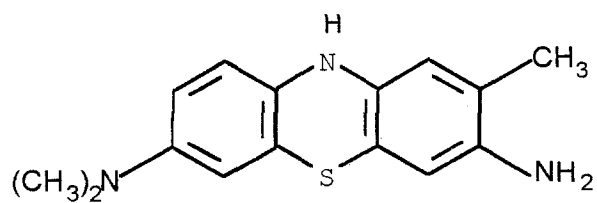
Amostra	[etanol] nominal (% , v/v)	[etanol] determinada usando o biossensor (% , v/v)
Vinho tinto	11 %	11,2 ± 0,3
Cerveja	4,7 %	4,7 ± 0,3
Whisky	40 %	39,9 ± 0,4
Tequila	39 %	38,5 ± 0,4
Cachaça	39 %	38,5 ± 0,4

Tabela 2

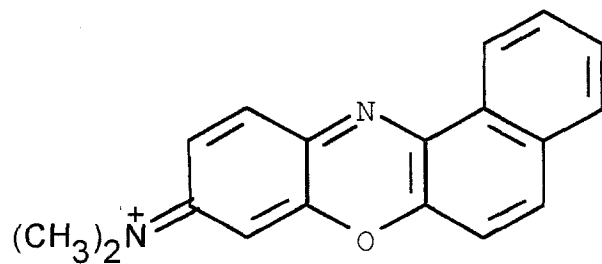
Amostra	[etanol] adicionada (mmol L ⁻¹)	Recuperação (%)
Vinho tinto	0,65	102 ± 3
	5,00	97 ± 3
Cerveja	0,65	99 ± 3
	5,00	96 ± 3
Whisky	0,65	99 ± 2
	5,00	99 ± 2
Tequila	0,65	101 ± 2
	5,00	99 ± 2
Cachaça	0,65	99 ± 2
	5,00	98 ± 2



Azul do Nilo (a)



Azul de Toluidina (b)



Azul de Meldola (c)

Figura 1

$E = 0 \text{ V vs SCE}$

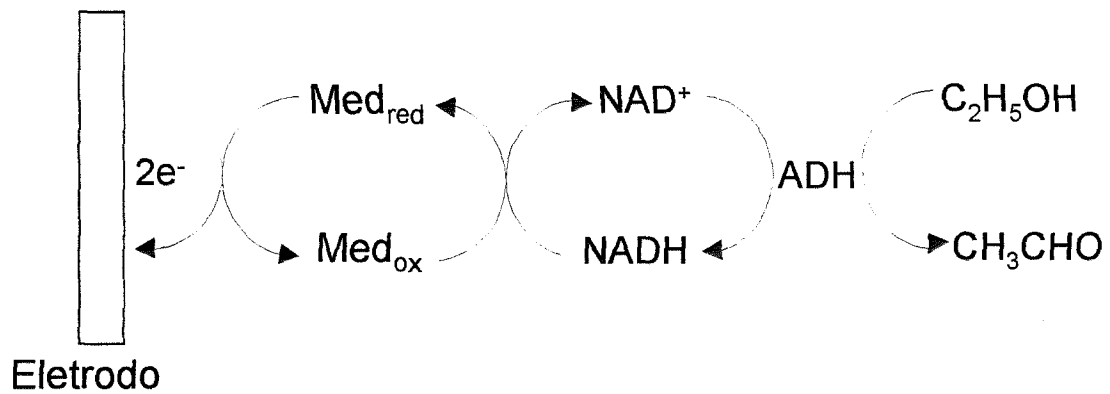


Figura 2

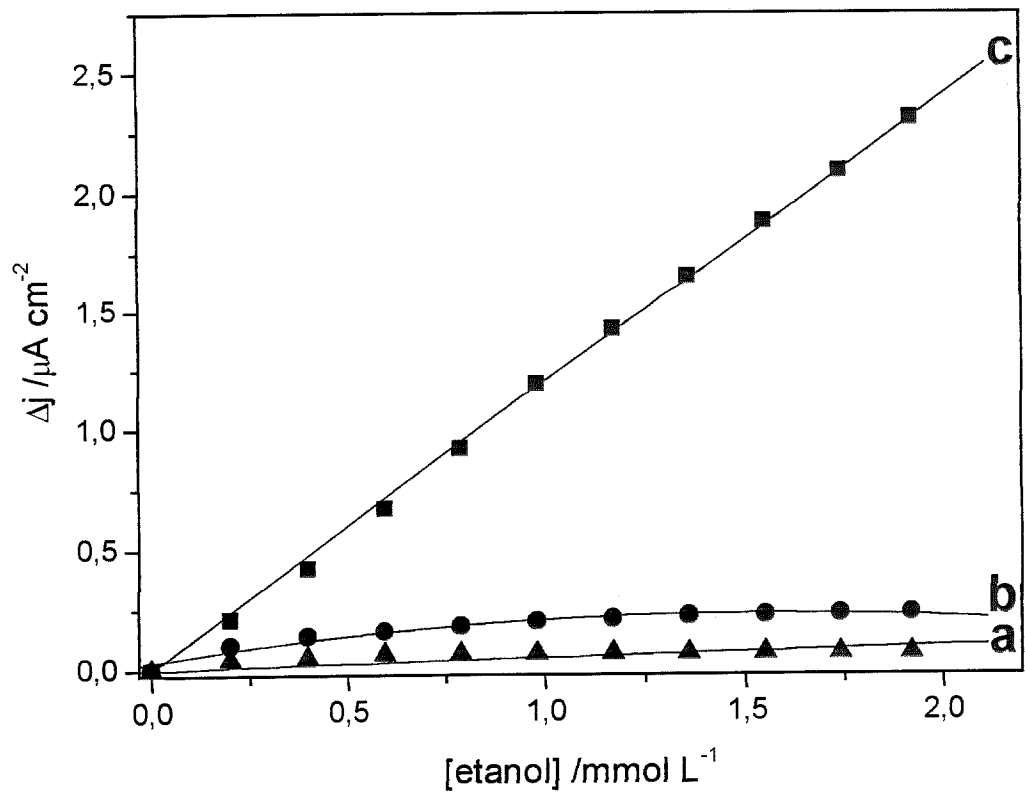


Figura 3

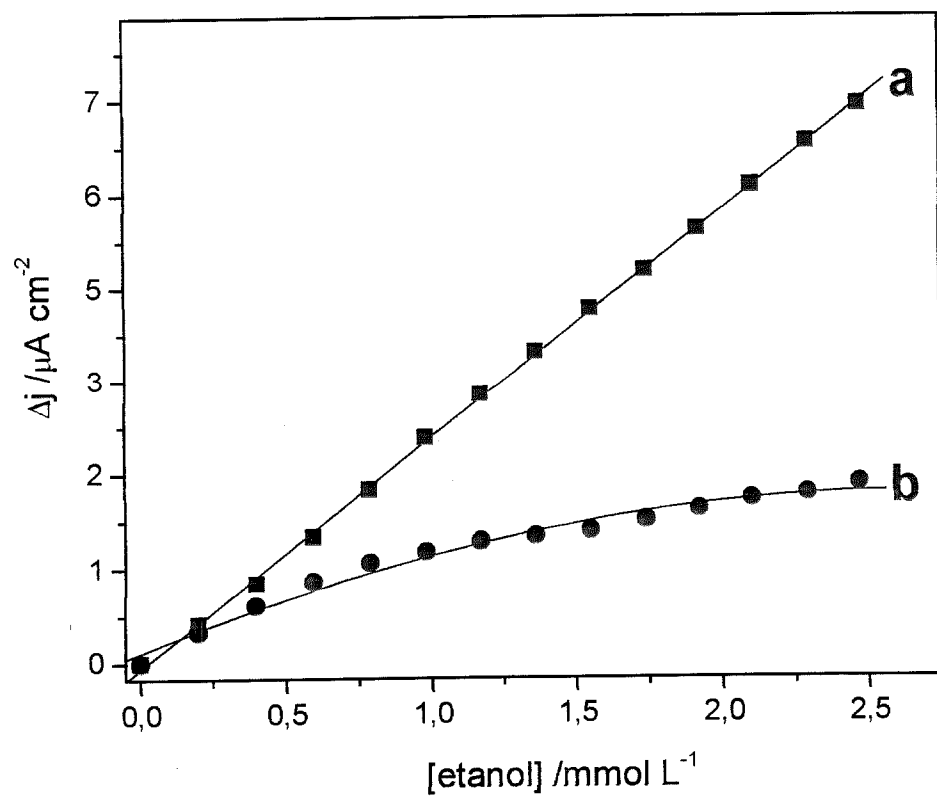


Figura 4

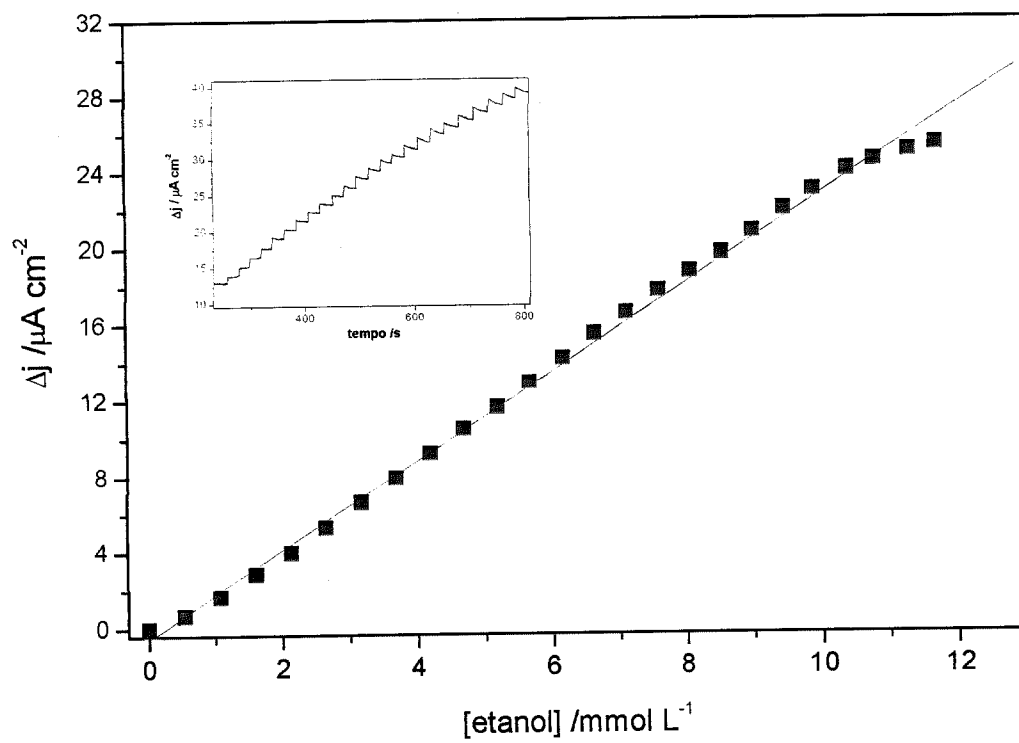


Figura 5

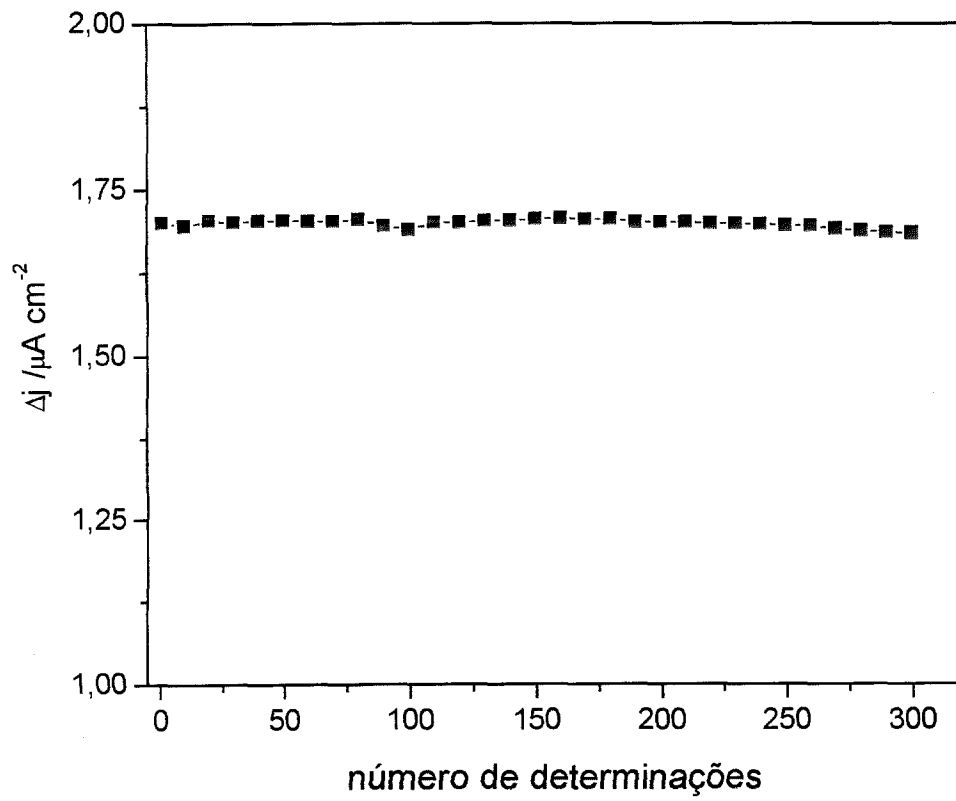


Figura 6

REIVINDICAÇÕES

1. **“NOVO BIOSENSOR AMPEROMÉTRICO ALTAMENTE EFICIENTE PARA DETERMINAÇÃO DE ÁLCOOIS”**, caracterizado por desenvolver, descrever, montar e otimizar um biossensor amperométrico capaz de determinar e quantificar etanol em matrizes complexas sem nenhuma etapa prévia de tratamento ou separação.

2. **“NOVO BIOSENSOR AMPEROMÉTRICO ALTAMENTE EFICIENTE PARA DETERMINAÇÃO DE ÁLCOOIS”**, caracterizado pela utilização da enzima álcool desidrogenase para o reconhecimento seletivo de etanol, e pela oxidação do co-fator NADH catalisada por mediadores do tipo fenoxazina (azul do Nilo, azul de toluidina) e/ou fenotiazina (azul de Meldola) adsorvidos sobre sílica gel modificada com óxidos de metais (nióbio, zircônio, titânio, etc).

3. **“NOVO BIOSENSOR AMPEROMÉTRICO ALTAMENTE EFICIENTE PARA DETERMINAÇÃO DE ÁLCOOIS”**, caracterizado por acoplar, num único dispositivo, todos os elementos necessários para a análise de etanol. Conferindo versatilidade e robustez ao sistema de detecção.

RESUMO

“NOVO BIOCSENSOR AMPEROMÉTRICO ALTAMENTE EFICIENTE PARA DETERMINAÇÃO DE ÁLCOOIS”

Este processo descreve o desenvolvimento de um biossensor de alto desempenho para a determinação eletroquímica de etanol em amostras de interesse clínico, biológico e industrial. O biossensor amperométrico para etanol proposto consiste de um eletrodo de pasta de carbono modificada com álcool desidrogenase (ADH), nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD^+) e mediadores do tipo fenoxazina e/ou fenotiazina adsorvidos sobre sílica gel recoberta com óxido de metais. A resposta eletroquímica do sensor está baseada nas propriedades electrocatalíticas dos mediadores para oxidar NADH, que é gerado durante a reação entre etanol e NAD^+ sob efeito catalítico da ADH. Ilustrativamente, apresenta-se neste processo as respostas obtidas empregando-se um biossensor a base de azul de Meldola adsorvido sobre sílica gel modificada com óxido de nióbio. O desempenho deste biossensor foi investigado quanto a sua dependência em relação a fatores críticos, tais como pH, força iônica, eletrólito suporte e potencial de trabalho. O biossensor proposto mostrou uma excelente estabilidade, sensibilidade e ampla faixa linear de resposta. Estas características favoráveis permitiram que o sensor fosse empregado na determinação direta de etanol em meios complexos, sem nenhum tipo de pré-tratamento das amostras. Esta habilidade foi explorada aplicando-se este novo dispositivo no monitoramento do teor de etanol em diferentes tipos de bebidas alcoólicas, tais como cerveja, vinho e destilados. A precisão e os dados de recuperação, obtidos com o biossensor nestes diferentes tipos de amostras, mostram que o sistema proposto pode ser empregado com eficiência na análise de etanol em amostras reais complexas.