

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS FÍSICAS E MATEMÁTICAS  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

**DESENVOLVIMENTO DE UM BIOSSENSOR DE TECIDO DE GENGIBRE  
(*Zingiber officinalis*) PARA DETERMINAÇÃO DE SULFITO EM  
SUCOS DE FRUTAS**

ALINE DE SOUZA GONÇALVES  
PROF<sup>a</sup>. DR<sup>a</sup>. IOLANDA DA CRUZ VIEIRA

FLORIANÓPOLIS / SC  
JUNHO/2005

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS FÍSICAS E MATEMÁTICAS  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

**DESENVOLVIMENTO DE UM BIOSSENSOR DE TECIDO DE GENGIBRE  
(*Zingiber officinalis*) PARA DETERMINAÇÃO DE SULFITO EM  
SUCOS DE FRUTAS**

ALINE DE SOUZA GONÇALVES

Trabalho de conclusão de curso apresentado à  
Universidade Federal de Santa Catarina, para  
obtenção do título de Bacharel em Química, sob a  
orientação da Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. IOLANDA DA CRUZ VIEIRA

FLORIANÓPOLIS / SC

JUNHO/2005

## AGRADECIMENTOS

A Deus por ter me dado forças e me iluminado para vencer mais este desafio.

À Professora Dr<sup>a</sup>. Iolanda C. Vieira pela orientação, incentivo, por disponibilizar tempo e atenção às minhas dúvidas durante o desenvolvimento deste trabalho, tornando possível o seu término.

À Inês pela coorientação, dedicação, auxílio na parte experimental e pela atenta revisão da parte escrita com valiosas sugestões.

A meus pais, Antonio e Juraci, que não mediram esforços para que eu pudesse realizar meus sonhos e que sempre estiveram do meu lado em todos os momentos apesar de minhas numerosas ausências e falhas.

A minhas irmãs Elaine e Elenice, meu cunhado Ilson, tios, primos e amigos da família, pelo apoio, incentivo e carinho.

A Tati, uma pessoa muito especial que, mais que amiga, uma irmã que muito me ensinou, incentivou e apoiou nos muitos momentos difíceis ao longo da caminhada, e a sua família que sempre me acolheu carinhosamente.

Aos amigos que convivi no decorrer do curso, aos que já concluíram e aos que vão concluir, em especial a Roberta.

Aos amigos da Indústria Farmacêutica Santa Terezinha, pelos ensinamentos, pelo incentivo e carinho que sempre me deram, em especial à Eliane que sempre estava pronta para me ensinar e ajudar.

Aos amigos do Grupo Qitech pelos momentos de descontração proporcionados.

Ao Prof Dr. Almir Spinelli pela cessão do Potenciostato.

Ao Nezi, técnico do laboratório de graduação de química quantitativa, pela boa vontade que possibilitou o irrestrito uso do Potenciostato.

E a todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

## SUMÁRIO

### Lista de Siglas, Símbolos e Abreviaturas

### Lista de Figuras

### Lista de Tabelas

### RESUMO

<b>I INTRODUÇÃO</b> .....	10
<b>1 ENZIMAS</b> .....	10
1.1 Histórico e Propriedades.....	10
1.2 Enzima Peroxidase.....	11
1.3 Inibidores Enzimáticos.....	13
1.4 Imobilização de Enzimas.....	14
1.5 Biossensores de Tecido Vegetal.....	15
1.6 Sulfito.....	17
1.7 Eletroanalítica: Voltametria Cíclica.....	18
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	21
<b>3 PARTE EXPERIMENTAL</b> .....	22
3.1 Equipamentos.....	22
3.2 Reagentes e Soluções.....	22
3.3 Enzima Peroxidase.....	23
3.4 Construção dos Biossensores.....	24
3.5 Preparo da Amostra e Determinação de Sulfito em Sucos de Frutas....	24
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	26
4.1 Construção dos Biossensores e Escolha do Inibidor.....	26
4.2 Estudo do Percentual do Tecido Vegetal.....	27
4.3 Estudo da Concentração de Peróxido de Hidrogênio.....	28
4.4 Estudo do pH.....	29
4.5 Estudo da Velocidade de Varredura e do Incremento.....	30
4.6 Curva Analítica da Hidroquinona.....	31

4.7 Efeito da Concentração da Hidroquinona na Curva Analítica do Sulfito.	32
4.8 Voltamograma Cíclico.....	34
4.9 Otimização dos Parâmetros.....	35
4.10 Estudos de Adição e Recuperação.....	36
4.11 Determinação de Sulfito em Suco de Frutas.....	37
<b>5 CONCLUSÃO.....</b>	<b>38</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>39</b>

## Lista de Siglas, Símbolos e Abreviaturas

Ag/AgCl – Eletrodo de referência de prata-cloreto de prata com solução interna de KCl 3 mol L<sup>-1</sup>

Anvisa – Agência de Vigilância Sanitária

AOAC – Official Methods of Analysis

E – Potencial do Eletrodo

E<sup>o</sup> - Potencial redox padrão (diferença de potencial versus eletrodo padrão de hidrogênio)

(E) – Enzima

ECS – Eletrodo de Calomelano saturado

E<sub>pa</sub> – Potencial de pico anódico

E<sub>pc</sub> – Potencial de pico catódico

I – Corrente elétrica

I<sub>pa</sub> – Corrente de pico anódica

I<sub>pc</sub> – Corrente de pico catódica

IUBMB – União Internacional de Bioquímica

S – Substrato

[S]\* - Sulfito

vs – Versus

## Lista de Figuras

Figura 1 – Modelo Chave – Fechadura.....	11
Figura 2 – Ciclo catalítico da enzima peroxidase (HRP). $R^+$ =radical protoporfirina.....	12
Figura 3 – Modelo de um inibidor de enzima: (A) Competitivo; (B) Não Competitivo.....	14
Figura 4 – Esquema da célula com três eletrodos: Eletrodo de trabalho; Eletrodo de referência e Contra eletrodo.....	19
Figura 5 –(A) Potencial linear e (B) Voltamograma cíclico.....	20
Figura 6 - (A) Biossensor/Pó: (—●—) para cisteína; (—■—) para sulfito; (B) Biossensor / Tecido: (—■—)para cisteína; (—■—) para sulfito .....	26
Figura 7 – Efeito da percentagem de tecido de gengibre nas concentrações de hidroquinona:(—■—) $9,71 \times 10^{-4}$ ; (—●—) $5,31 \times 10^{-3}$ ; (—▲—) $9,6 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ .....	27
Figura 8 – Representação esquemática da reação entre hidroquinona, peróxido de hidrogênio e peroxidase.....	28
Figura 9 – Efeito da concentração de peróxido de hidrogênio.....	29
Figura 10 – Efeito do pH (5,5 a 9,0) realizado em soluções de hidroquinona: (—■—) $9,71 \times 10^{-4}$ ; (—●—) $2,80 \times 10^{-3}$ e (—▲—) $5,31 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ .....	30
Figura 11 – A – variação do potencial com o aumento da velocidade; B – variação do incremento do aparelho potenciostato/galvanostato.....	31
Figura 12 – Curva analítica da hidroquinona.....	32
Figura 13 – Curva analítica do sulfito com concentrações: (—■—) $2,36 \times 10^{-3}$ ; (—●—) $8,26 \times 10^{-3}$ e (—▲—) $1,15 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ de hidroquinona.....	33
Figura 14 – Voltamograma cíclico obtido com o biossensor proposto na velocidade de varredura $100 \text{ mV s}^{-1}$ em.....	34

## Lista de Tabelas

Tabela 1 – Efeito das concentrações de hidroquinona sobre as curvas analíticas de sulfito.....	33
Tabela 2 – Otimização dos parâmetros.....	35
Tabela 3 – Estudo de adição e recuperação de sulfito em sucos de frutas.	36
Tabela 4 – Determinação de sulfito em sucos, usando o biossensor proposto.....	37



## RESUMO

O sulfito é um aditivo muito usado em produtos alimentícios e em bebidas como conservante, sendo abundantemente empregado na indústria de vinhos, sucos, vinagres, entre outros, para evitar o desenvolvimento microbiano.

Um biossensor baseado em pasta de carbono modificado com tecido vegetal de gengibre (*Zingiber officinalis*) como fonte de enzima peroxidase foi construído e usado para a determinação de sulfito em sucos de frutas. Esta enzima na presença de peróxido de hidrogênio catalisa a oxidação da hidroquinona a quinona, cuja redução eletroquímica à hidroquinona foi obtida em potencial de pico catódico de aproximadamente - 230 mV (vs Ag/AgCl). Assim, quando o sulfito é adicionado à solução, ocorre o decréscimo da corrente de pico catódico proporcional ao aumento da concentração do sulfito.

Utilizando a técnica de voltametria cíclica, realizou-se um estudo de inibição do substrato hidroquinona em presença de sulfito. Para esta, foram otimizados alguns parâmetros, tais como: faixa de potencial (que abrange a oxidação/redução da hidroquinona) + 600 a - 400 mV (vs Ag/AgCl), velocidade de varredura de 100 mV s<sup>-1</sup> e incremento, a cada intervalo de 2 mV, utilizando-se um Potenciostato-Galvanostato.

Foram obtidas melhores respostas para o biossensor com 15% de vegetal, nas condições: solução tampão fosfato 0,1 mol L<sup>-1</sup> (pH 6,8) e peróxido de hidrogênio 1,21x10<sup>-4</sup> mol L<sup>-1</sup>. A curva analítica da hidroquinona, foi obtida com linearidade no intervalo de concentração de 2,46x10<sup>-4</sup> a 1,70x10<sup>-2</sup> mol L<sup>-1</sup>, (I<sub>pc</sub> (μA) = 0,5316 - 7576,4 [Hidroquinona]) r=0,9992. A curva analítica do sulfito, foi obtida em 1,15x10<sup>-2</sup> mol L<sup>-1</sup> de hidroquinona, com linearidade no intervalo de concentração de 1,01x10<sup>-3</sup> a 5,90x10<sup>-3</sup> mol L<sup>-1</sup>, (I<sub>pc</sub> (μA) = 29,10 - 4195,80 [sulfito]) r=0,9992.

Depois dos parâmetros otimizados, realizou-se estudo de adição e recuperação para investigar possíveis interferentes, e finalmente, a determinação de sulfito em amostras de sucos. A recuperação de sulfito variou de 88 a 98%, evidenciando a ausência de interferentes e a

determinação de sulfito foi de 100,83 e 106,63 mg L<sup>-1</sup> para as amostras de suco de abacaxi e uva, respectivamente.

# I INTRODUÇÃO

## 1 ENZIMAS

### 1.1 Histórico e Propriedades

As enzimas são os catalisadores das reações que ocorrem no sistema biológico<sup>1</sup>. Elas têm eficiência catalítica extraordinária, em geral, muito maior que aquela de catalisadores sintéticos; têm um alto grau de especificidade por seus substratos, aceleram reações químicas específicas e ainda funcionam em soluções aquosas e em condições muito suaves de temperatura e pH. Com exceção de um pequeno grupo de moléculas de RNA com propriedades catalíticas todas as enzimas são proteínas. Consistem em longas cadeias de aminoácidos unidas por ligações peptídicas. As enzimas apresentam um formato geral muito semelhante a uma esfera, sendo por este motivo tratadas como proteínas globulares<sup>2</sup>. As reações catalisadas por enzimas há muito tempo vêm sendo usadas com diferentes propósitos como a determinação de atividades, inibidores e outros.

Por causa de sua alta seletividade (em alguns casos especificidade) e poder catalítico; possui capacidade de catalisar reações de substratos em baixas concentrações, apresenta um grande potencial de uso em química analítica bem como na medicina, agricultura, tecnologia de alimentos e estudos do meio ambiente<sup>3</sup>. Como cada enzima catalisa apenas uma reação, ou um grupo de reações estreitamente relacionadas, faz com que milhares de enzimas sejam necessárias para compensar esta especificidade<sup>4</sup>.

A descoberta das enzimas data do século XVIII, quando se iniciavam os estudos sobre digestão dos alimentos. Enzima (em grego, significa “em leveduras”), esta denominação foi dada por Khune em 1878. Enquanto Pasteur afirmava que a fermentação era inseparável da célula viva e estabelecia o conceito de que as enzimas fossem células vivas, Liebig dizia que a fermentação era provocada por substâncias químicas. Buchner, porém, acabou com a controvérsia entre Liebig e Pasteur, ao mostrar a possibilidade da fermentação na ausência de células vivas. Os trabalhos de purificação de

enzimas começaram depois de 1920 e a primeira enzima a ser cristalizada foi a *urease*, em 1926 por J. B. Sumner, obtida do feijão de soja<sup>1,3,5-10</sup>.

Toda enzima possui um centro ativo, também chamado de sítio ativo, local onde as reações com substratos específicos ocorrem. O sítio ativo é geralmente constituído de alguns resíduos de aminoácidos da cadeia de proteína.

Algumas enzimas dependem somente de sua própria estrutura como proteína para exercer sua atividade, enquanto outras necessitam também de um ou mais componentes não-protéicos chamados de cofatores, que podem ser íons metálicos ou moléculas orgânicas denominadas de coenzima. Algumas enzimas dependem de ambos. O complexo cataliticamente ativo enzima-cofator é denominado de haloenzima<sup>1,3,5-10</sup>.

A reação ocorre em duas etapas, na primeira, a molécula de enzima (E) se combina com a molécula de substrato (S), formando um complexo enzima-substrato (ES). Na segunda etapa ocorre a formação do produto e a liberação da enzima<sup>2</sup>, denominado “Teoria da Chave-Fechadura”, (Figura 1), formulado por Emil Fischer em 1894<sup>11</sup>. A enzima e o substrato são mantidos juntos por ligações de hidrogênio, forças de Van der Waals, etc.

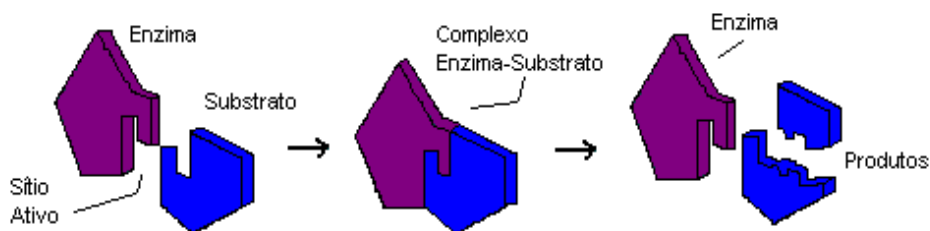


Figura 1 – Modelo Chave – Fechadura<sup>12</sup>.

## 1.2 Enzima Peroxidase

Segundo a União Internacional de Bioquímica (IUBMB), as enzimas são classificadas em seis grandes grupos, e estes, divididos em subclasses, de acordo com a reação envolvida<sup>2</sup>. São elas: oxidoredutases – reações de

óxido-redução; transferases – transferência de grupos funcionais; hidrolases – reações de hidrólise; liases – reações de grupos para formar duplas ligações; isomerases – reações de conversão de um composto ao seu isômero e ligases – reações de formação de ligações entre duas moléculas.

A peroxidase é uma subclasse das oxidoreduções e recebe esta denominação devido ao peróxido de hidrogênio ser o seu principal substrato<sup>13</sup>. Diversas são as fontes vegetais de peroxidase, como o gengibre (*Zingiber officinalis*), pêssego (*Prunus persica*), inhame (*Alocasia macrorrhiza*), mandioca (*Manihot utilissima*), batata doce (*Ipomea batatas (L.) Lam.*), abobrinha (*Cucurbita pepo*) entre outras<sup>14</sup>.

As peroxidases são hemoproteínas (sítio ativo: Fe<sup>3+</sup> protoporfirínico) com um ciclo catalítico comum<sup>13</sup>, conforme esquematizado na Figura 2.

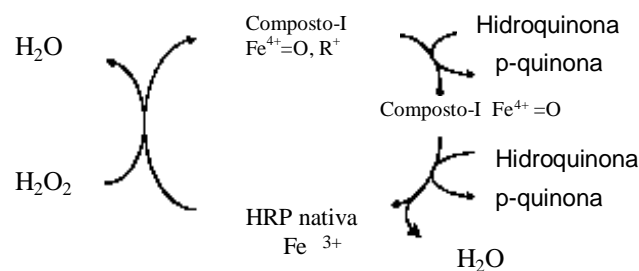


Figura 2 – Ciclo catalítico da enzima peroxidase (HRP). R<sup>+</sup> = radical protoporfirina.

A peroxidase de raiz forte (HRP, do inglês horseradish peroxidase) possui alta estabilidade à temperatura ambiente por longos períodos de tempo. A reação enzimática da peroxidase (HRP) ocorre em três etapas distintas, como mostram as equações 1 a 3<sup>13</sup>:



A enzima nativa é oxidada em uma única etapa envolvendo dois elétrons, a um composto intermediário (Composto-I)<sup>13</sup>. Para completar o ciclo catalítico, a enzima deve ser reduzida a sua forma nativa, este processo ocorre em duas etapas envolvendo um elétron por etapa e a formação de um composto intermediário (Composto-II).

Na presença de uma substância doadora de elétrons ( $AH_2$ ) a enzima é regenerada e as espécies  $AH^\cdot$  formadas são reduzidas eletroquimicamente no eletrodo, resultando em uma corrente de redução ( $I_{pc}$ ) proporcional à concentração da substância doadora<sup>13</sup>.

### 1.3 Inibidores Enzimáticos

Procedimentos baseados na inibição de enzimas são de grande interesse uma vez que eles usualmente podem apresentar alta sensibilidade e em alguns casos, seletividade. Um inibidor é um composto que causa um decréscimo na velocidade da reação da enzima, conforme outra reação com o grupo envolvido no sítio ativo da enzima, para formar um complexo enzima-inibidor ou conforme reação com um intermediário enzima-substrato para formar um complexo.

Muitos compostos têm a capacidade de se combinar com determinadas enzimas, tanto de maneira **reversível** como **irreversível**, inibindo a ação das enzimas, outros fatores são a mudança de temperatura e pH. Tais compostos são denominados inibidores e incluem medicamentos, antibióticos, antimetabólitos<sup>4</sup>, entre outros.

Na **inibição irreversível**, algumas substâncias se ligam covalentemente às enzimas deixando-as inativas. Na maioria dos casos a substância reage com o grupo funcional no sítio ativo bloqueando o local do substrato, deixando a enzima cataliticamente inativa. Estes inibidores podem ser extremamente seletivos, pois são semelhantes ao substrato. As inibições irreversíveis envolvem o equilíbrio entre a enzima e o inibidor.

Existem dois tipos de **inibição reversível**, a competitiva e a não competitiva:

**Inibição competitiva:** como mostra a Figura 3 (A), é causada por algum composto, que tem uma estrutura semelhante ao substrato em particular, competindo, portanto, com o substrato ao ligar ao sítio ativo da enzima<sup>2</sup>. Este

tipo de inibição depende das concentrações de substrato e de inibidor. O efeito é revertido aumentando-se a concentração do substrato.

**Inibição não competitiva:** mostrado na Figura 3 (B), ocorre quando uma molécula ou íon pode se ligar em um segundo local na superfície enzimática (não no sítio ativo). Isto pode distorcer a enzima levando a diminuição da sua capacidade de unir-se ao substrato. O inibidor não competitivo pode ser uma molécula que não se assemelha com o substrato, mas apresenta uma grande afinidade pela enzima. Este tipo de inibição depende apenas da concentração do inibidor.



Figura 3 – Modelo de um inibidor de enzima: (A) Competitivo; (B) Não Competitivo.

## 1.4 Imobilização de Enzimas

A partir do momento em que se tornou interessante o uso de enzimas purificadas para a realização de reações de alta seletividade, diante do custo elevado de tais reagentes, buscou-se uma condição de reutilização das enzimas (uma vez que são, como todo catalisador, regenerados no processo)<sup>15</sup>. Assim, a utilização de materiais imobilizados além de diminuir o custo por análise, aumenta a rapidez e exatidão do processo.

Algumas vantagens da imobilização de enzimas são:

a) Quantidade de material – necessita de pequenas quantidades de material biológico (massa) e pode ser utilizado para várias análises.

b) Aumento da estabilidade – a imobilização é uma das melhores maneiras de estabilizar enzimas. Isto acontece pela restrição aos movimentos da cadeia protéica. São mais resistentes ao tempo, mudanças de pH e elevação de temperatura<sup>15</sup>.

c) Seletividade – enzimas imobilizadas estão menos sujeitas aos ativadores ou inibidores que afetam as enzimas em solução<sup>15</sup>.

Vários métodos são utilizados na imobilização de enzimas no suporte para a construção de um biossensor, no entanto, a imobilização não deve desnaturar o sítio ativo da enzima. Entre eles, os mais utilizados são os métodos de adsorção, ligação covalente, ligação covalente cruzada com um reagente multifuncional e oclusão em géis ou membranas<sup>16</sup>.

O método de imobilização de enzimas utilizado neste trabalho é o de adsorção física. Consiste na adsorção das enzimas em suportes insolúveis, envolvendo forças de interação de baixa energia, tais como interações do tipo iônico, polar, ligações de hidrogênio. Os suportes utilizados geralmente possuem superfície ativa e funcionam como excelentes adsorventes. Entre os adsorventes mais usados têm-se alumina, sílica gel, quartzo, vidro, resina de troca iônica, bentonita, grafite e ágar-ágar<sup>17</sup>. O suporte utilizado para o desenvolvimento dos biossensores foi a pasta de carbono.

A grande vantagem deste método é sua simplicidade e a grande variedade de suportes que poderão ser utilizados. Por outro lado possui a desvantagem da enzima adsorvida ser extremamente dependente de fatores, tais como pH, solvente, substrato e temperatura, e por envolver interações relativamente fracas, que levam a uma dessorção progressiva das enzimas.

## **1.5 Biossensores de Tecido Vegetal**

Um biossensor pode ser definido como um sensor que utiliza um material biológico (enzimas, anticorpos, antígenos, organismos, tecidos animal e vegetal, células, organelas, etc) conectado a um transdutor (qualquer dispositivo capaz de transformar um tipo de sinal em outro) o qual converte um sinal biológico em sinal elétrico<sup>17</sup>. O primeiro biossensor foi proposto no final da década de 80 e desde então vários biossensores foram desenvolvidos usando diversos materiais biológicos<sup>17</sup>. Durante a última década,



biossensores têm despertado grande interesse e suas possíveis aplicações têm sido estudadas.

Um biossensor para ser empregado em análises químicas, deverá necessariamente possuir algumas propriedades tais como estabilidade, baixo limite de detecção, boa seletividade e exatidão.

A pasta de carbono é uma mistura de pó de grafite e aglutinante. O pó de grafite deve ter tamanho uniforme, alta pureza química e baixa capacidade de adsorção de oxigênio e impurezas eletroativas. O aglutinante é geralmente um líquido orgânico quimicamente inerte, de baixa volatilidade, livre de impurezas, eletroinativo, imiscível com a solução do analito e deve preencher os interstícios entre as partículas do grafite. O desenvolvimento do eletrodo de pasta de carbono modificado com enzimas (biossensor) possui a vantagem de diminuir o limite de detecção do analito de interesse e aumentar a seletividade das determinações. O procedimento é simples e a regeneração da superfície é feita através da renovação da pasta da ponta do biossensor<sup>14</sup>.

Atualmente vem aumentando o interesse da aplicação de extratos brutos e/ou tecidos vegetais no lugar de enzimas purificadas na construção de biossensores<sup>18</sup>, e/ou em métodos analíticos em fluxo, principalmente em países que possuem um número elevado de frutas e/ou vegetais, como é o caso do Brasil. O uso de extrato bruto e/ou tecidos vegetais pode apresentar em alguns casos certa desvantagem na seletividade do método analítico, mas por outro lado, são extremamente econômicos e geralmente possuem um tempo de vida superior àqueles métodos que utilizam enzimas purificadas, visto que estas enzimas naturalmente imobilizadas nas células destes materiais biológicos são muito mais estáveis<sup>19,20</sup>. Apoiar-se no argumento de que, próximas de sua condição natural, as enzimas têm maior estabilidade<sup>14</sup>. Além destas vantagens, esses procedimentos geralmente não necessitam de cofatores, pois os extratos brutos e/ou tecidos vegetais empregados normalmente já possuem cofatores naturais para a reação enzimática do analito de interesse.

Alguns parâmetros que afetam o tempo de resposta do biossensor, devem ser controlados, tais como: velocidade de agitação, concentração do substrato, concentração da enzima, pH e temperatura.

## 1.6 Sulfito

O sulfito ( $\text{SO}_3^{2-}$ ), bissulfito ( $\text{HSO}_3^-$ ), metabissulfito ( $\text{S}_2\text{O}_5^{2-}$ ) de sódio e potássio fazem parte de um importante grupo de aditivos utilizados há séculos em produtos alimentícios e bebidas como conservante<sup>21</sup>.

Conservantes, são substâncias adicionadas aos produtos alimentícios e em bebidas com a finalidade de conservar, aumentar a durabilidade do produto, permitindo que o consumidor tenha acesso a esse produto por um longo período de tempo ou fora da estação. São usados para evitar a ação dos microorganismos que agem na deterioração dos alimentos, prevenindo a oxidação, fazendo com que durem mais tempo sem estragar. São encontrados em refrigerantes, concentrados de frutas, sucos, frutas secas, vinhos e em milhares de outros alimentos industrializados.

Considerando a necessidade de constante aperfeiçoamento das ações de controle sanitário na área de alimentos e bebidas e visando a proteção à saúde da população, tornou-se indispensável o estabelecimento de regulamentos técnicos sobre aditivos em alimentos. Visto que o sulfito em altas concentrações é considerado prejudicial à saúde humana, especialmente para alguns indivíduos que têm deficiência de sulfito oxidase, um controle rigoroso da concentração deste agente em muitos produtos é necessário. A Anvisa (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) possui normas que limitam a quantidade de sulfito adicionado em produtos alimentícios e em bebidas, estabelecendo um limite de 0,004 g/100mL como  $\text{SO}_2$ <sup>22</sup>. Quantidades acima da permitida devem ser informadas no rótulo do produto.

Portanto, o desenvolvimento de métodos sensíveis, seletivos, simples, rápidos e de baixo custo para a determinação de sulfito são muito importantes para a garantia do controle de qualidade do alimento de consumo humano.

## 1.7 Eletroanalítica: Voltametria Cíclica

A química eletroanalítica compreende um conjunto de métodos analíticos quantitativos baseados nas propriedades elétricas de uma solução do analito quando ele está numa célula eletroquímica<sup>23</sup>. Técnicas eletroanalíticas são muito usadas por fornecerem baixos limites de detecção, por descreverem eletroquimicamente informações que incluem estequiometria e a velocidade de transferência de carga interfacial, velocidade de transferência de massa, extensão de adsorção e de quimissorção e as velocidades e constantes de equilíbrio de reações químicas<sup>23</sup>.

Alguns métodos analíticos comuns são: condutimetria, potenciometria, coulometria, eletrogravimetria e a voltametria. A voltametria cíclica é a técnica eletroanalítica de especial interesse e emprego para o desenvolvimento deste trabalho.

A voltametria compreende um grupo de métodos eletroanalíticos nos quais a informação sobre o analito é obtida através de medidas de corrente ( $I$ ) (durante uma varredura de potenciais aplicados aos eletrodos) em função do potencial ( $E$ ) aplicado em condições de completa polarização de um eletrodo indicador ou de trabalho<sup>23</sup>. Em potenciais de eletrodo constantes, deve existir uma relação linear entre a voltagem da célula e a corrente. Porém, desvios da linearidade são freqüentes, então, diz-se que a célula está polarizada.

O transporte de massa em voltametria pode ocorrer de três maneiras: transporte por difusão, migração ou convecção. Como resultado da difusão, os íons ou moléculas movem-se de uma região mais concentrada para uma mais diluída, migração consiste da transferência de íons sob a influência de um campo elétrico e convecção, quando a solução está sob agitação.

Em voltametria a célula é constituída por um sistema de três eletrodos, conforme Figura 4, imersos em uma solução contendo o analito e também um excesso de eletrólito não reativo chamado de eletrólito suporte. Um dos três eletrodos é o de trabalho, cujo potencial varia linearmente com o tempo, o segundo é o de referência prata/cloreto de prata ( $Ag/AgCl$ ), ou calomelano saturado (ECS), cujo potencial permanece constante durante o experimento e

um terceiro eletrodo, o contra-eletrodo (fio ou placa de platina) que conduz eletricidade da fonte de sinal através da solução para o eletrodo de trabalho<sup>23</sup>.

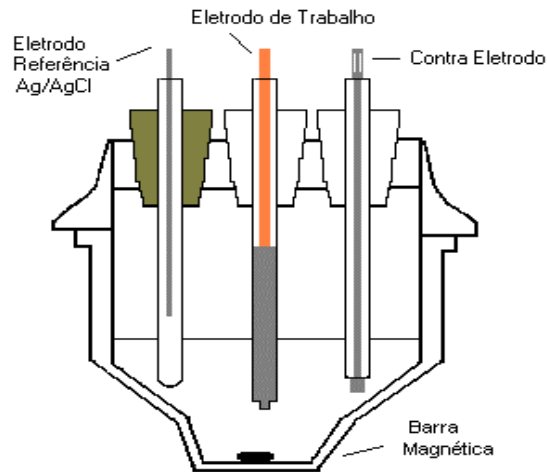


Figura 4 – Esquema da célula com três eletrodos: Eletrodo de trabalho; Eletrodo de referência e Contra eletrodo

Quando se trata de estudar um processo redox, a técnica especialmente rica em informações é a voltametria cíclica. Neste caso, após transpor a região de potenciais onde ocorre oxidação ou redução, o sentido da varredura é invertido permitindo obter informações sobre a reversibilidade do processo. Fácil de realizar, a voltametria cíclica tornou-se ferramenta imprescindível quando se trata de caracterizar processos que ocorrem na superfície do eletrodo.

O sinal de excitação para a voltametria cíclica é um potencial linear em forma de uma onda triangular<sup>24</sup> (Figura 5 A). Este sinal de excitação do potencial triangular faz uma varredura do potencial do eletrodo entre dois valores. O sinal de excitação causa um potencial primeiro explorado negativamente a partir de + 800 mV para - 200 mV (vs ECS), no qual é revertido causando um retorno para o potencial de + 800 mV.

Se o potencial for ciclado como mostra a Figura 5 (A), a corrente se comportará como mostra a Figura 5 (B), desde que haja uma espécie cujo  $E^0$  situe-se naquela região: voltametria cíclica<sup>15</sup>.

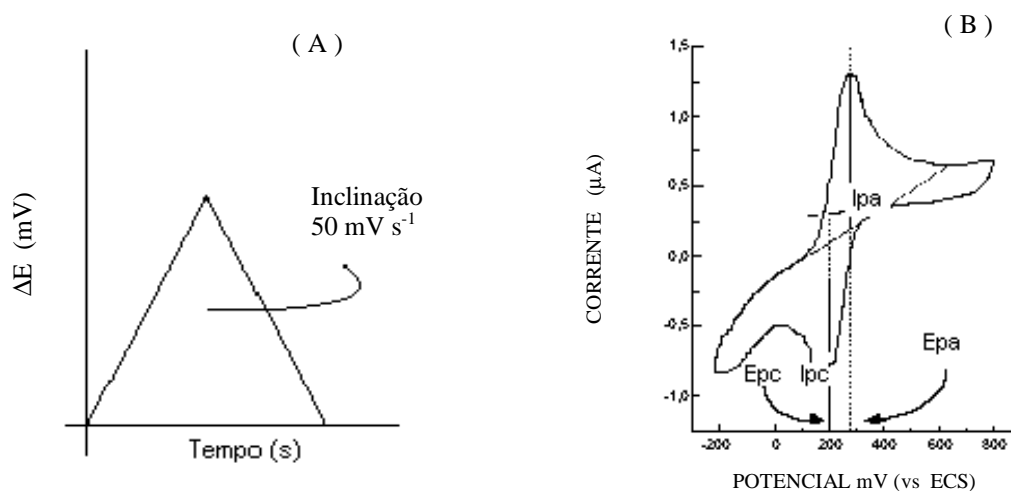


Figura 5 – ( A ) – Potencial linear e ( B ) Voltamograma Cíclico.

O voltamograma representa alguns parâmetros importantes, tais como: potencial de pico catódico ( $E_{pc}$ ), potencial de pico anódico ( $E_{pa}$ ), corrente de pico catódico ( $I_{pc}$ ) e corrente de pico anódico ( $I_{pa}$ )<sup>24</sup>.

## 2 OBJETIVOS

O presente trabalho tem como objetivo a construção de biossensores utilizando tecido vegetal de gengibre (*Zingiber officinalis*) fonte de enzima peroxidase, para o estudo do comportamento voltamétrico da redução da hidroquinona em solução tampão fosfato e peróxido de hidrogênio, visando estabelecer condições experimentais adequadas para a determinação de sulfito em sucos de frutas.

### 3 PARTE EXPERIMENTAL

#### 3.1 Equipamentos

Os eletrodos de trabalho utilizados foram os biossensores construídos a partir de pasta de carbono modificada com tecido e pó de gengibre (*Zingiber officinalis*) e embutidos em seringas com capacidade para 1mL. O contra-eletrodo usado foi de platina com área de 7 x 5 mm e o de referência de prata-cloreto de prata (Ag/AgCl) com solução interna de KCl 3 mol L<sup>-1</sup>.

As medidas ciclovoltamétricas foram feitas em uma célula de vidro sem compartimento divisório, com capacidade para 20 mL, com tampa de PVC com orifícios circulares para encaixe dos eletrodos e adição das soluções, utilizando-se um Potenciostato/Galvanostato, PAR modelo 263 EG & G.

Um agitador magnético da Hanna modelo HI 190 M foi utilizado para homogeneização das soluções a cada adição do analito, o tempo de agitação foi controlado com um cronômetro Tenlon.

Foi utilizado nas medidas de pH, um pHmetro da Micronal modelo B-474, com um eletrodo de vidro combinado Micronal contendo solução interna KCl 3 mol L<sup>-1</sup> saturada com AgCl.

Um liqüidificador Black & Decker foi utilizado para obtenção do pó de gengibre, a partir da polpa do vegetal desidratado.

#### 3.2 Reagentes e Soluções

Reagentes de grau analítico foram usados para preparar as soluções tampão e de referência. Os reagentes utilizados foram: tampão fosfato (K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) (Vetec), ácido acético (CH<sub>3</sub>COOH) (Synth), tampão tris-(hidroximetil) amino metano (Synth), peróxido de hidrogênio (Vetec), hidroquinona (Reagen), sulfito (Synth) e cisteína (Sigma).

Solução tampão fosfato  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  (pH 6,8) foi preparada dissolvendo 13,611 g de fosfato de potássio monobásico e 17,369 g de fosfato de potássio dibásico em um balão volumétrico de 1 L, completando seu volume com água destilada.

Solução tampão acetato  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  foi preparada pela diluição de 1,15 mL de ácido acético em um balão volumétrico de 200 mL, completando seu volume com água destilada e ajustado com NaOH para pH 5,5. Solução tampão fosfato  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  ajustado com HCl para pH 6,0 e NaOH para pH 8,0. Também foi preparada solução tampão TRIS-  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  (pH 9,0), dissolvendo 2,423 g deste reagente em um balão volumétrico de 200 mL, completando seu volume com água destilada.

Solução de peróxido de hidrogênio  $0,1282 \text{ mol L}^{-1}$  foi preparada pela diluição de 1 mL deste reagente (Vetec;  $d = 1,463 \text{ g mL}^{-1}$ ; 30% m/m) em um balão volumétrico de 100 mL. Desta solução, foram preparadas diariamente pela diluição de 1,0 mL desse reagente, em balão volumétrico de 10,0 mL e completou-se o volume com tampão fosfato  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  (pH 6,8).

Solução de hidroquinona  $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ , foi preparada diariamente pela dissolução de 0,1376 g deste reagente (Reagen) em balão volumétrico de 25 mL com tampão fosfato  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  (pH 6,8).

Soluções de sulfito (Synth) e cisteína (Sigma)  $2,5 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$  foram preparadas diariamente a partir das dissoluções de 0,0788 g e 0,1098 g destas substâncias, respectivamente em balão volumétrico de 25 mL e os volumes foram completados com tampão fosfato  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  (pH 6,8).

### 3.3 Enzima Peroxidase

A enzima peroxidase utilizada para desenvolvimento desse trabalho foi obtida a partir do vegetal gengibre (*Zingiber officinalis*) na forma de tecido “in natura” e na forma de pó.

Os vegetais foram adquiridos em supermercados da região de Florianópolis. Após lavagem e secagem, o gengibre foi descascado e diferentes massas da polpa foram usadas para construção dos biossensores.



O pó desse vegetal foi obtido da polpa após a secagem a temperatura ambiente. Em seguida, foi transferido para um liquidificador; um pó fino foi obtido e finalmente foi transferido para uma peneira de granulometria < 100 µm. Esse material foi estocado a temperatura ambiente e usado como fonte da enzima peroxidase.

### **3.4 Construção dos biossensores**

Para construção dos biossensores foi usado pó de grafite (Acheson-38) da Fisher, óleo mineral (Nujol) da Aldrich, pó e tecido do gengibre (*Zingiber officinalis*).

Os biossensores foram obtidos homogeneizando-se 0,14 g de pó de grafite (70%) e diferentes massas de tecido (0,02; 0,03; 0,04; 0,05; 0,06 g), corresponde a variação de 10 a 30%, durante 20 minutos. Em seguida, foi adicionado nesta mistura, 0,03 g de Nujol (15%), sendo então homogeneizado por mais 20 minutos. Finalmente, estas pastas de carbono modificadas foram embutidas em seringas de 1 mL e o contato elétrico foi feito usando fio de cobre.

### **3.5 Preparo da Amostra e Determinação de Sulfito em Sucos de Frutas**

Foram utilizadas amostras de suco de abacaxi e de uva para fazer o estudo de adição e recuperação e determinação do teor de sulfito.

A determinação do sulfito foi baseada no sistema oxidação/redução da hidroquinona na faixa de potencial + 600 a – 400 mV (vs Ag/AgCl). A hidroquinona oxida espontaneamente na presença de peróxido de hidrogênio a quinona que é reduzida eletroquimicamente a hidroquinona na interface solução-eletrodo.

Em uma célula eletroquímica contendo 10 mL da solução tampão fosfato 0,1 mol L<sup>-1</sup> (pH 6,8), peróxido de hidrogênio 1,21x10<sup>-4</sup> mol L<sup>-1</sup> e

hidroquinona  $1,15 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ , foi adicionado 3 mL de suco, e concentrações conhecidas de sulfito. Curvas analíticas foram construídas e o estudo de adição e recuperação e determinação de sulfito nas amostras comerciais de suco de frutas foram obtidas.

Após cada adição de analito (sulfito) na célula, a solução foi agitada durante 1 minuto, a fim de homogeneizar a solução e em seguida a medida de potencial foi obtida.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Construção dos Biossensores e Escolha do Inibidor

Foram construídos e investigados biossensores contendo pó e tecido de gengibre. Os estudos foram realizados em solução tampão fosfato 0,1 mol L<sup>-1</sup> (pH 6,8), peróxido de hidrogênio 1,21x10<sup>-4</sup> mol L<sup>-1</sup>, hidroquinona 7,0x10<sup>-3</sup> mol L<sup>-1</sup> e adição de diferentes concentrações de sulfito e cisteína.

O biossensor contendo pó de gengibre em solução de hidroquinona, Figura 6 ( A ), apresentou maior corrente de pico catódica do que o biossensor de tecido. Quando realizado o estudo para a seleção do inibidor, o eletrodo de tecido vegetal apresentou maior estabilidade e linearidade, Figura 6 ( B ), e o biossensor contendo pó de gengibre apresentou instabilidade e o sulfito e cisteína causaram inibição após adição de grandes concentrações dessas substâncias.

A Figura 6 ( B ), mostra a resposta analítica do biossensor de tecido vegetal na presença da cisteína e do sulfito. O biossensor na presença da cisteína, apresentou faixa linear de 1,08x10<sup>-4</sup> a 1,53x10<sup>-3</sup> mol L<sup>-1</sup> com coeficiente de correlação de  $r = 0,9956$ ; na presença do sulfito, apresentou linearidade de 1,08x10<sup>-4</sup> a 2,90x10<sup>-3</sup> mol L<sup>-1</sup> com coeficiente de correlação de  $r = 0,9979$ .

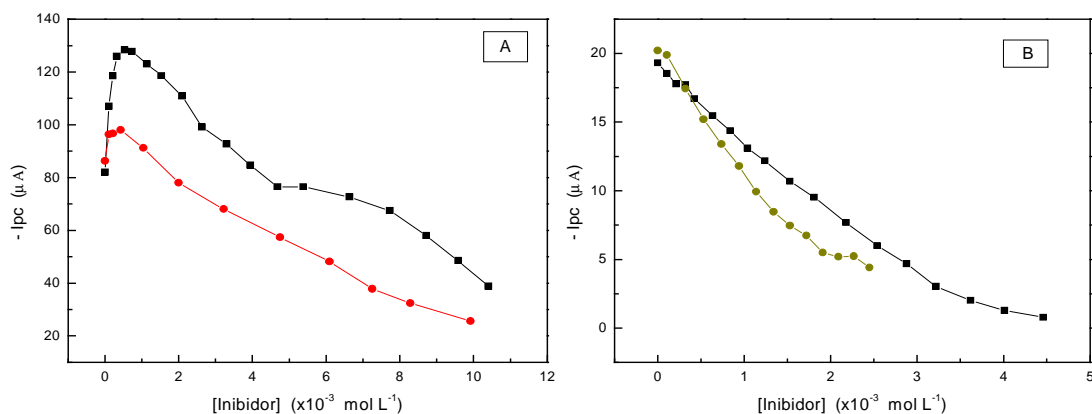


Figura 6 - ( A ) Biossensor / Pó: (—●—) para cisteína; (—■—) para sulfito; ( B ) Biossensor / Tecido : (—■—) para cisteína; (—■—) para sulfito.

O sulfito apresentou melhor resposta, faixa linear de concentração maior e desempenho analítico. Portanto, esse conservante foi escolhido para a determinação em sucos de frutas usando o biossensor contendo tecido “in natura” do gengibre como fonte de enzima peroxidase.

#### 4.2 Estudo do Percentual do Tecido Vegetal

O efeito da percentagem do tecido vegetal (10, 15, 20, 25 e 30%) fonte da enzima peroxidase na presença de pó de grafite/nujol (70:15% m/m) foi investigado.

Este estudo foi realizado em solução tampão fosfato 0,1 mol L<sup>-1</sup> (pH 6,8), peróxido de hidrogênio (1,21x10<sup>-4</sup> mol L<sup>-1</sup>), utilizando três concentrações de hidroquinona: 9,71x10<sup>-4</sup>; 5,31x10<sup>-3</sup> e 9,6x10<sup>-3</sup> mol L<sup>-1</sup>.

A Figura 7 mostra o desempenho dos biossensores construídos com diferentes percentuais de tecido de gengibre. Como pode ser observado, há um aumento de resposta até 15% de tecido, mantendo-se constante ou decrescendo em percentagem superior.

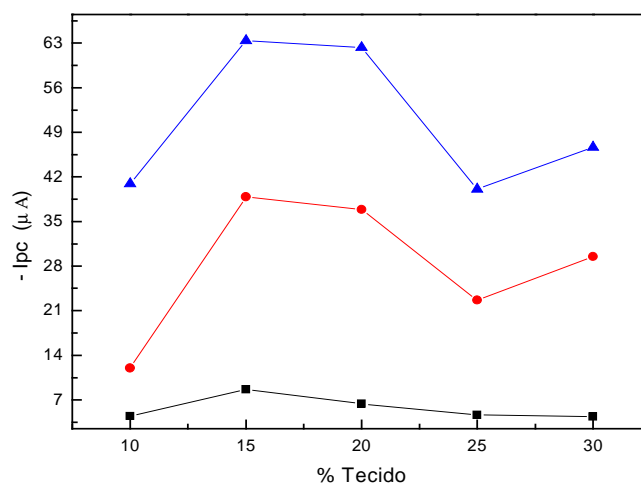


Figura 7 – Efeito da percentagem de tecido de gengibre nas concentrações de hidroquinona:(—■—) 9,71x10<sup>-4</sup>; (—●—) 5,31x10<sup>-3</sup>; (—▲—) 9,6x10<sup>-3</sup> mol L<sup>-1</sup>.

Esse comportamento deve-se ao fato de que nas concentrações superiores dessa enzima, há um aumento da resistência elétrica da pasta de carbono contida em cada eletrodo, dificultando assim o processo de transferência de elétrons no biossensor, levando a um decréscimo da corrente de pico catódico. Sendo assim, 15% de vegetal foi escolhido para construção dos biossensores e usado para o desenvolvimento deste trabalho.

### 4.3 Estudo da Concentração de Peróxido de Hidrogênio

A enzima peroxidase catalisa a reação de oxidação de substratos doadores de prótons (hidroquinona) na presença da solução de peróxido de hidrogênio, levando a formação de quinona. Em seguida, esse composto é reduzido eletroquimicamente ao substrato de partida, como apresentado na Figura 8.

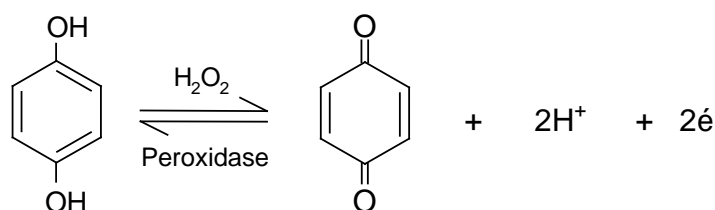


Figura 8 – Representação esquemática da reação entre hidroquinona, peróxido de hidrogênio e peroxidase.

O estudo do efeito da concentração de peróxido de hidrogênio variando de  $0,60 \times 10^{-4}$  a  $5,83 \times 10^{-4}$  mol L<sup>-1</sup> sobre a resposta do biossensor usando hidroquinona  $2,36 \times 10^{-3}$  mol L<sup>-1</sup> em tampão fosfato 0,1 mol L<sup>-1</sup> (pH 6,8) foi avaliado.

A Figura 9 mostra que a resposta analítica do biossensor aumenta até concentração de  $1,21 \times 10^{-4}$  mol L<sup>-1</sup>, mantendo-se praticamente constante em concentrações superiores. Escolheu-se, portanto, a concentração de  $1,21 \times 10^{-4}$  mol L<sup>-1</sup>, para o desenvolvimento deste trabalho.

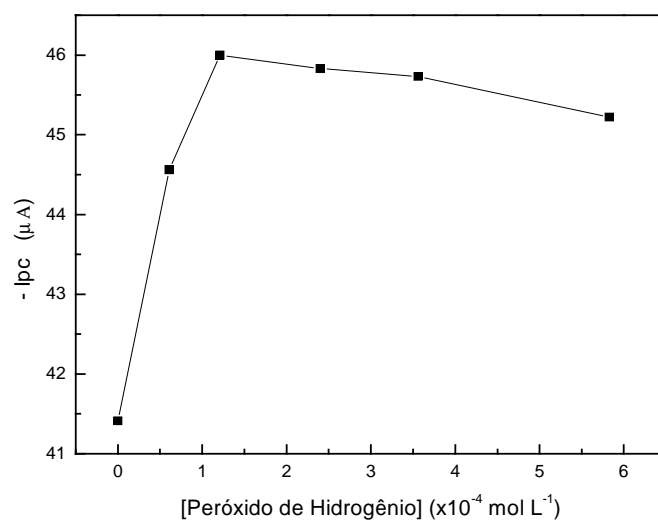


Figura 9 – Efeito da concentração de peróxido de hidrogênio.

#### 4.4 Estudo do pH

O pH exerce grande influência sobre as reações enzimáticas. As enzimas apresentam melhor pH quando a atividade e a velocidade das reações são máximas. Sendo assim, estudou-se a resposta do biossensor em pH 5,5; 6,0; 6,8; 8,0 e 9,0. Este estudo foi realizado em soluções de hidroquinona nas concentrações:  $9,71 \times 10^{-4}$ ;  $2,80 \times 10^{-3}$  e  $5,31 \times 10^{-3}$  mol L $^{-1}$ .

Conforme observado na Figura 10, a corrente de pico catódica aumenta com o aumento do pH de 5,5 a 6,8 mantendo-se constante até pH 8,0 e decrescendo em pH superior. Conseqüentemente, os estudos foram realizados em tampão fosfato 0,1 mol L $^{-1}$  (pH 6,8).

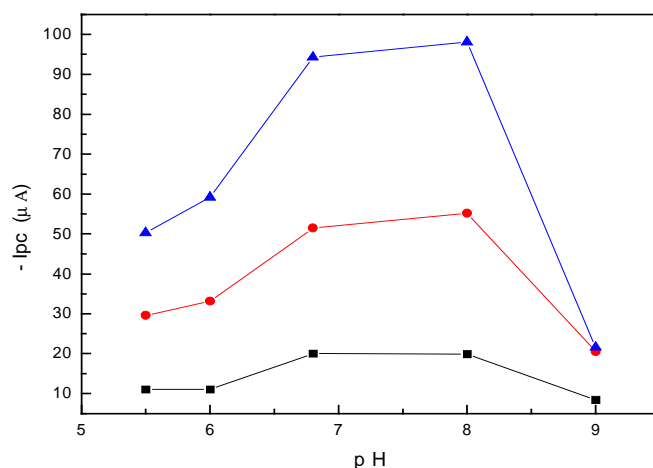


Figura 10 – Efeito do pH (5,5 a 9,0) realizado em soluções de hidroquinona: (—■—)  $9,71 \times 10^{-4}$ ; (—●—)  $2,80 \times 10^{-3}$  e (—▲—)  $5,31 \times 10^{-3}$  mol L<sup>-1</sup>.

#### 4.5 Estudo da Velocidade de Varredura e do Incremento

Um parâmetro importante no estudo da voltametria cíclica, é a velocidade de varredura. Pois esta precisa ser alta o suficiente para permitir a oxidação da hidroquinona e sua posterior redução na superfície do biossensor.

O estudo de velocidade de voltametria cíclica foi feito usando, 10 mL de tampão fosfato com peróxido de hidrogênio a  $1,21 \times 10^{-4}$  mol L<sup>-1</sup> e adicionado 0,5 mL de hidroquinona  $0,05$  mol L<sup>-1</sup>. A faixa de potencial que abrange a oxidação/redução da hidroquinona utilizada foi de + 600 a - 400 mV (vs Ag/AgCl).

As velocidades estudadas variaram de 10 a 160 mV s<sup>-1</sup>, conforme observa-se na Figura 11 ( A ). A velocidade de varredura escolhida para aplicar no estudo realizado foi de 100 mV s<sup>-1</sup>. A corrente de pico aumenta até a velocidade de 120 mV s<sup>-1</sup>. As velocidades acima desta apresentam ruídos, o que resulta em erros nas análises.

Foi realizado um estudo variando o incremento de 1 a 7 mV , mostrado na Figura 11 ( B ) para a velocidade escolhida. Percebeu-se que os incrementos de 1 e 2 mV estão constantes e ao aumentar a taxa, há um decréscimo brusco na resposta da corrente, logo foi otimizado um incremento de 2 mV. O incremento é a quantidade de pontos fornecida pelo equipamento a cada mV.

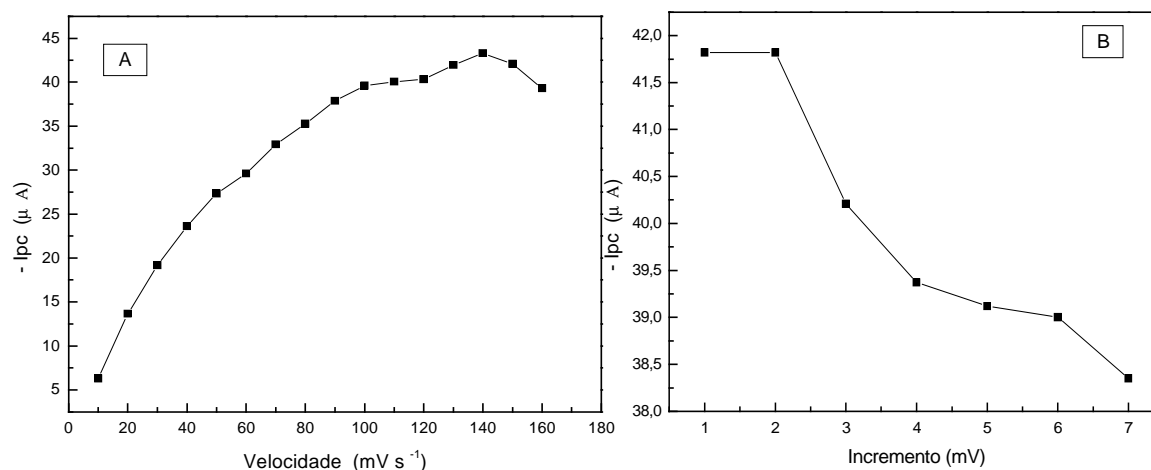


Figura 11 – A – variação do potencial com o aumento da velocidade; B – variação do incremento do aparelho potenciostato/galvanostato.

#### 4.6 Curva Analítica da Hidroquinona

A Figura 12 mostra a curva analítica obtida com solução de hidroquinona em tampão fosfato  $0,1 mol L^{-1}$  (pH 6,8), na presença de peróxido de hidrogênio  $1,21 \times 10^{-4} mol L^{-1}$ . O método possui linearidade no intervalo de concentração de hidroquinona de  $2,46 \times 10^{-4}$  a  $1,70 \times 10^{-2} mol L^{-1}$ , ( $I_{pc} (\mu A) = 0,5316 - 7576,4[Hidroquinona]$ )  $r = 0,9992$ .



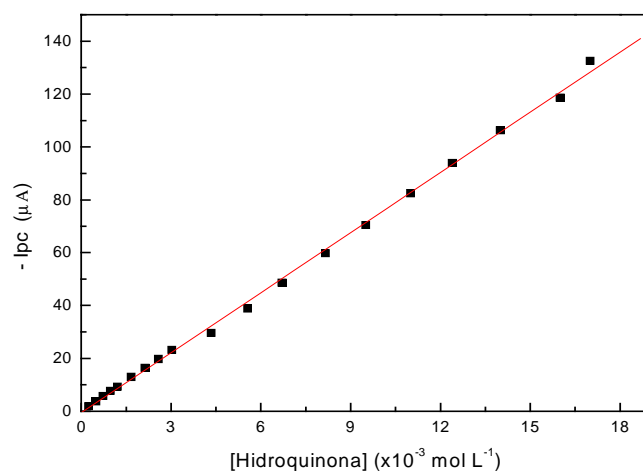


Figura 12 – Curva analítica da hidroquinona.

#### 4.7 Efeito da Concentração da Hidroquinona na Curva Analítica do Sulfito

A partir da curva analítica da hidroquinona (Figura 12), escolheu-se as concentrações de  $2,36 \times 10^{-3}$ ,  $8,26 \times 10^{-3}$  e  $1,15 \times 10^{-2}$  mol L $^{-1}$  de hidroquinona, para a construção das curvas analíticas do sulfito. Como pode ser observado na Figura 13, a faixa de linearidade do sulfito aumenta com o aumento da concentração da hidroquinona.

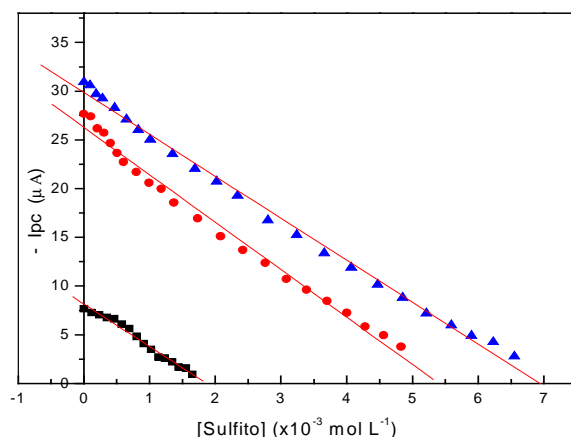


Figura 13 – Curva analítica do sulfito com concentrações: (—■—)  $2,36 \times 10^{-3}$ ; (—●—)  $8,26 \times 10^{-3}$  e (—▲—)  $1,15 \times 10^{-2}$  mol L<sup>-1</sup> de hidroquinona.

A Tabela 1, apresenta o efeito da concentração de hidroquinona sobre a linearidade, equação da reta e coeficiente de correlação. Como pode ser observado, a maior linearidade foi obtida com concentração de hidroquinona  $1,15 \times 10^{-2}$  mol L<sup>-1</sup>, com um coeficiente de correlação de 0,9992. Escolheu-se assim esta concentração de hidroquinona para desenvolvimento deste trabalho.

Tabela 1 – Efeito das concentrações de hidroquinona sobre as curvas analíticas de sulfito

[Hidroquinona] mol L <sup>-1</sup>	Faixa linear 10 <sup>-3</sup> mol L <sup>-1</sup>	Equação da reta ( Ipc (μA) = A - B[S]*)	Coeficiente correlação (r)
$2,36 \times 10^{-3}$	0,43 a 1,13	Ipc = 9,55 – 5953,60[S]	0,9970
$8,26 \times 10^{-3}$	0,60 a 3,70	Ipc = 25,21 – 4650,58[S]	0,9984
$1,15 \times 10^{-2}$	1,01 a 5,90	Ipc = 29,10 – 4195,80[S]	0,9992

[S]\* = Sulfito

## 4.8 Voltamograma Cíclico

A Figura 14 mostra os ciclovoltamogramas obtidos com o biossensor proposto, no estudo de inibição da hidroquinona com adição de sulfito, na faixa de potencial de + 600 a – 600 mV (vs Ag/AgCl), utilizando velocidade de varredura de  $100 \text{ mV s}^{-1}$ , em solução tampão fosfato  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  (pH 6,8), peróxido de hidrogênio  $1,21 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ , hidroquinona  $1,15 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$  e adicionadas três concentrações de sulfito:  $1,35 \times 10^{-3}$ ,  $3,24 \times 10^{-3}$  e  $5,21 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ .

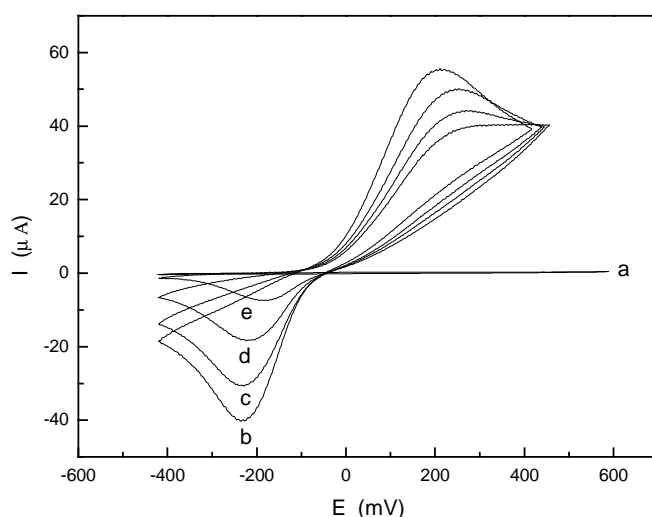


Figura 14 – Voltamograma cíclico obtido com o biossensor proposto na velocidade de varredura  $100 \text{ mV s}^{-1}$  em: ( a ) Tampão fosfato  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  + peróxido de hidrogênio  $1,21 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ ; ( b ) Hidroquinona  $1,15 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ ; adições de sulfito: ( c )  $1,35 \times 10^{-3}$ ; ( d )  $3,24 \times 10^{-3}$  e ( e )  $5,21 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ .

A Figura 14 ( a ) ilustra os voltamogramas cíclicos obtidos para tampão fosfato  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  (pH 6,8) e peróxido de hidrogênio  $1,21 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ , percebe-se praticamente uma reta (ausência de picos), evidenciando que o eletrólito suporte não interfere na reação.

Neste estudo de inibição, analisamos a redução da hidroquinona e esta se dá no sentido de potenciais para o negativo. O sentido da varredura é de potenciais positivos + 600 mV para potenciais negativos – 600 mV, em – 400

mV ocorre uma inversão e aparece o pico de oxidação (à direita do gráfico) no sentido dos potenciais positivos.

A Figura 14 ( b ) representa o voltamograma obtido quando adicionado hidroquinona  $1,15 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ . Em ( c ), ( d ) e ( e ), temos as representações das curvas quando adicionadas as respectivas concentrações de sulfito: 1,35; 3,24 e  $5,21 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ . Percebe-se que quanto maior a concentração de sulfito, menor a corrente de pico catódica apresentada. A corrente de pico catódica foi obtida em potencial de aproximadamente  $-230 \text{ mV}$ .

#### 4.9 Otimização dos Parâmetros

Vários estudos foram realizados para otimização do biossensor proposto. A Tabela 2 mostra a faixa estudada e os melhores parâmetros.

Tabela 2 – Otimização dos parâmetros.

Parâmetros	Faixa Estudada	Selecionada
Biossensor	Pó e Tecido	Tecido
% Tecido	10 a 30	15
$[\text{H}_2\text{O}_2]$ (mol L <sup>-1</sup> )	$0,6 \times 10^{-4}$ a $5,83 \times 10^{-4}$	$1,21 \times 10^{-4}$
pH	5,5 a 9,0	6,8
Velocidade (mV S <sup>-1</sup> )	10 a 160	100
Incremento (mV)	1 a 7	2
Curva Hidroquinona (mol L <sup>-1</sup> )	$2,46 \times 10^{-4}$ a $1,70 \times 10^{-2}$	$1,15 \times 10^{-2}$

#### 4.10 Estudos de Adição e Recuperação

O sulfito é muito usado em produtos alimentícios e em bebidas como conservante, sendo há muito tempo empregado em sucos para evitar o desenvolvimento microbiano. Além do sulfito, o benzoato de sódio e corantes artificiais estão presentes nessas amostras. Assim, o estudo de adição e recuperação foi realizado para investigar os possíveis interferentes.

Para este estudo foram adicionados em cada amostra, 156,3; 427,3; 645,1; 297,4; 545,7 e 752,5 mg L<sup>-1</sup> da solução de sulfito padrão, seguindo da determinação e do cálculo de percentagem de recuperação.

Os resultados obtidos neste estudo estão apresentados na Tabela 3, e como pode ser observado a recuperação de sulfito nestas amostras variou de 88,21 a 98,61%, indicando que o procedimento analítico proposto não sofre interferências da matriz da amostra.

Tabela 3– Estudo de adição e recuperação de sulfito em sucos de frutas.

Amostra	Sulfito (mg L <sup>-1</sup> )		
	Adicionado	Recuperado	Recuperação (%)
A	156,3	152,5	97,57
	427,3	453,7	93,82
	645,1	637,8	97,51
B	297,4	310,0	95,76
	545,7	553,3	98,61
	752,5	741,1	98,49
C	156,3	170,1	91,17
	427,3	376,9	88,21
	645,1	683,1	95,57
D	297,4	318,9	92,77
	545,7	515,5	94,46
	752,5	765,0	98,34

A e B = suco de abacaxi; C e D = suco de uva

#### 4.11 Determinação de Sulfito em Suco de Frutas

A fim de avaliar o desempenho do biossensor de tecido vegetal de gengibre (*Zingiber officinalis*), determinou-se o teor de sulfito ( $\text{mg L}^{-1}$ ) em amostras de suco de abacaxi e uva. Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 4.

Tabela 4 – Determinação de sulfito em sucos, usando o biossensor proposto.

Sulfito ( $\text{mg L}^{-1}$ )	
Amostras	Biossensor
Suco de Abacaxi	100,83
Suco de Uva	106,63

Os resultados obtidos com o biossensor proposto, estão dentro do limite permitido pela Anvisa, que é de  $400 \text{ mg L}^{-1}$ , para bebidas. Posteriormente, estes estudos serão continuados e confrontados com o método padrão de análise que consta na literatura AOAC (Official Methods of Analysis)<sup>25</sup>.

## 5 CONCLUSÃO

O biossensor desenvolvido neste trabalho apresentou eficiência na determinação de sulfito em amostras de sucos industrializados, através da inibição da hidroquinona em presença de peróxido de hidrogênio.

A utilização de biossensores em análises químicas vem aumentando devido à variedade de material biológico existente, facilidade de construção, regeneração da superfície (renovação da pasta da ponta), tempo de vida superior àqueles métodos que utilizam enzimas purificadas e baixo custo. Além disso, a metodologia proposta é simples e poderá ser uma alternativa aos métodos oficiais.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

1. PALMER, Trevor. **Understanding enzymes**. 2nd ed. New York: British Library, 1985, p. 17-26.
2. UIEARA, Marina. **Química Orgânica e Biológica**. 1ª ed. Florianópolis: LED/UFSC, 2001, p. 106-121.
3. DIXON, M.; WEBB. E. C. **Enzymes**. New York: Academic Press, 1979.
4. CONN, Eric E.; STUMPF, P.K. **Introdução à Bioquímica** – Tradução da 4ª ed americana. São Paulo: Edgard Blucher, 1980, p. 131-161.
5. WHITAKER, J. R. **Principles of Enzymology for the Food Sciences**. New York : Marcel Dekker, 1985, p. 592.
6. VOET, D.; VOET, J. G. **Biochemistry**. New York: Jonh Wiley & Sons, 1993, p. 332.
7. STRYER, L. **Biochemistry**. New York: W. H. Freeman and Company, 1995, p. 181.
8. LEHNINGER, A. L., **Princípios de Bioquímica**. São Paulo: Sarvier, 1986, p. 154.
9. BOBBIO, F. O.; ROBBIO, P. A. **Introdução à Química de Alimentos**. São Paulo: Varela, 1989, p. 109.
10. GAVA, A. J. **Princípios de Tecnologia de Alimentos**. São Paulo: Nobel, 1988, p. 95.
11. SOLOMONS, T. W. G.; FRYLE C. B. **Química orgânica**. 7ª ed. Rio de Janeiro: LTC, 2002, 2, p. 424.
12. Reis, A. Compostos nitrogenados. Disponível em: <<http://quimica.fe.usp.br/graduacao/edm431e2/material98/adriana/enzimas.htm>>. Acesso em 01 junho 2005.
13. ROSATTO, S. S.; FREIRE, R. S.; DURÁN, N.; KUBOTA, L. T. Biossensores amperométricos para determinação de compostos fenólicos em amostras de interesse ambiental . **Química Nova**, São Paulo, v. 24, n. 1, p. 77-86, 2001.
14. VIEIRA, I. C.; LUPETTI, K. O.; FATIBELLO-FILHO, O. Determinação de paracetamol em produtos farmacêuticos usando um biossensor de pasta



- de carbono modificado com extrato bruto de abobrinha (*Cucurbita pepo*). **Química Nova**, São Paulo, v. 26, n. 1, p. 39-43, 2003.
15. SILVA, R. C. **Quitosana como polímero modificador de eletrodos sólidos**. 2000. f 162. Tese (Doutorado em Química) – Centro de Ciências Físicas e Matemáticas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2000.
  16. ALFAYA, A. A. S.; KUBOTA, L. T. A utilização de materiais obtidos pelo processo de sol-gel na construção de biossensores. **Química Nova**, São Paulo, v. 25, n. 5, p. 835-841, 2002.
  17. FATIBELLO-FILHO, O.; CAPELATO, M. D. Biossensores – Revisão. **Química Nova**, São Paulo, v. 15, n. 1, p. 28-39, 1992.
  18. SIGNORI, C. A.; FATIBELLO-FILHO, O. Biossensor amperométrico para a determinação de fenóis usando um extrato bruto de inhame (*Alocasia macrorrhiza*). **Química Nova**, São Paulo, v. 17, n. 1, p. 38-42, 1994.
  19. KOBOS, R. K.; RECHNITZ, G. A. Regenerable bacterial – Membrane electrode for L-aspartate. **Analytical Letters**, New York, v. 10, n. 10, p. 751, 1977.
  20. BOTRÉ, C.; MAZZEI, F.; LANZI, M. Plant-tissue electrode for the determination of catechol. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 255, n. 1, p. 59-62, 1991.
  21. FATIBELLO-FILHO, O.; VIEIRA, I. C. Flow injection spectrophotometric determination of sulfite using a crude extract of sweet potato root (*Ipomea batatas* (L.) Lam.) as a source of polyphenol oxidase. **Analytica Chimica Acta**, USA, v. 354, p. 51-57, 1997.
  22. ANVISA – Aprova o “Regulamento técnico que aprova o uso de aditivos alimentares, estabelecendo suas funções e seus limites máximos para a categoria de alimentos 16: Bebidas – subcategoria 16.2.2 – Bebidas não alcoólicas Gaseificadas e não gaseificadas”. Resolução n. 389, de 5 de agosto de 1999. **Diário Oficial da União**, de 9 de agosto de 1999.
  23. SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; NIEMAN, T. A. **Princípios de Análise Instrumental**. 5ª Ed. São Paulo: Bookman, 2002, p. 566-593.
  24. SAWYER, D. T.; Heineman, W. R.; BEEB, J. M. **Chemistry experiments for instrumental methods**. Copyright ,1984. p. 79-85.

25. Official methods of analysis of **AOAC** international, 16<sup>th</sup> ed. Virgin: AOAC international Suite, 1995. V II, p. 27-34.