

## Artigo

## Desenvolvimento de um Biossensor Eletroquímico Obtido com Extrato Vegetal para a Determinação de Triglicerídeos em Biodiesel

Mendes, R. K.\* , Moino, B. P., Guilherme, J. P. P., Nogueira, A. B.

Rev. Virtual Quim., 2014, 6 (4), 1033-1046. Data de publicação na Web: 1 de maio de 2014

<http://www.uff.br/rvq>

### Development of a Electrochemical Biosensor Obtained from Vegetable Extract for the Triglycerides Determination in Biodiesel

**Abstract:** Biodiesel is a renewable energy source, alternative to fossil fuels, which has received much attention because it presents similar characteristics and, in some cases, even better than mineral diesel. However, to ensure the quality control of this biofuel, the National Petroleum Agency (ANP) has set appropriate limits to maintain their chemical and physical-chemical characteristics. In this context, a biosensor based on carbon peroxidase from turnip extract was used for the determination of unreacted triglycerides in samples of biodiesel. The device tested presented accuracy, simplicity and low cost. The results when compared with gas chromatography show a variation of 5.8 % in the triglycerides concentration and a linear region of 5.5 to 55  $\mu\text{mol L}^{-1}$  and a detection limit of  $4.0 \cdot 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$  (IUPAC method). Analyses performed by biosensors fall into the Green Analytical Chemistry because they use few reagents and generate a low level of waste.

**Keywords:** Enzymatic biosensor; triglyceride; peroxidase; biodiesel.

### Resumo

Uma fonte energética renovável, alternativa aos combustíveis fósseis, que tem recebido bastante atenção é o biodiesel, por apresentar características similares e, em alguns casos, até melhores que o diesel mineral. No entanto, para garantir o controle da qualidade deste biocombustível, a Agência Nacional do Petróleo e Biocombustíveis (ANP), estabelece limites considerados adequados para manter suas características químicas e físico-químicas. Neste contexto, um biossensor de pasta de carbono a base de peroxidase, proveniente de extrato de nabo, foi utilizado para a determinação de triglicerídeos não reagidos em amostras de biodiesel. O dispositivo apresentou precisão das medidas, além de simplicidade de utilização e baixo custo. Os resultados obtidos foram comparados com a cromatografia gasosa, obtendo-se uma variação de 3,37% nos teores, com uma região linear de 5,5 e 55  $\mu\text{mol L}^{-1}$  e limite de detecção de  $4,0 \cdot 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$  (método IUPAC). As análises com biossensores se enquadram na Química Analítica Verde, pois utilizam poucos reagentes e geram baixo índice de resíduos.

**Palavras-chave:** Biossensor enzimático; triglicerídeo; peroxidase; biodiesel.

\* Pontifícia Universidade Católica de Campinas, Faculdade de Química, 13082-970, Campinas, SP, Brasil.

✉ [renatavalente@puc-campinas.edu.br](mailto:renatavalente@puc-campinas.edu.br)

DOI: [10.5935/1984-6835.20140065](https://doi.org/10.5935/1984-6835.20140065)

## Desenvolvimento de um Biossensor Eletroquímico Obtido com Extrato Vegetal para a Determinação de Triglicerídeos em Biodiesel

Renata Kelly Mendes,\* Barbara P. Moino, João Pedro P. Guilherme, Alessandra B. Nogueira

Pontifícia Universidade Católica de Campinas, Faculdade de Química, 13082-970, Campinas, SP, Brasil..

\* [renatavalente@puc-campinas.edu.br](mailto:renatavalente@puc-campinas.edu.br)

*Recebido em 18 de dezembro de 2013. Aceito para publicação em 25 de abril de 2014*

1. Introdução
2. Parte Experimental
3. Resultados e Discussão
4. Conclusões

### 1. Introdução

---

O uso de óleos vegetais como uma alternativa de combustível tem sido proposto há mais de 100 anos. Especificamente, a produção de biodiesel é uma área moderna e de grande demanda devido ao aumento no preço do petróleo e as vantagens ambientais.<sup>1</sup> Esse combustível é utilizado para substituição do óleo diesel, em percentuais adicionados no óleo diesel ou integral, nos motores à combustão dos transportes rodoviários e nos motores utilizados para a geração de energia elétrica. O biodiesel compõe, junto com o etanol, importante oferta para o segmento de combustíveis. Ambos são denominados de biocombustíveis por serem derivados de biomassa (matéria orgânica de origem vegetal ou animal que pode ser utilizada para a produção de energia), contendo, no

entanto, menos compostos poluentes, além de serem sustentáveis.<sup>2</sup> A busca pelo aumento da capacidade de produção comercial de biodiesel vem sendo abastecida pelas expectativas no consumo crescente dos próximos anos.<sup>3</sup>

O biodiesel é uma mistura de monoalquil ésteres de ácidos graxos obtidos como resultado da esterificação de fontes biológicas renováveis, tais como óleos de plantas e gordura animal. Os principais componentes das gorduras animal e vegetal são os triglicerídeos, que podem variar na extensão da cadeia carbônica, no número, orientação e posição das ligações duplas.<sup>4</sup>

O Brasil é um país que contém grandes plantações de oleaginosas e, conseqüentemente, usufrui de uma diversidade de opções para produção de biodiesel a partir de plantas como palma, babaçu, soja, girassol, amendoim, mamona e

dendê. Em 13/9/2004, o Congresso Nacional aprovou a Medida Provisória 214, abrindo a possibilidade da adição de 5% (v/v) de biodiesel no diesel de petróleo comercializado. Desde então, os investimentos nesse setor de produção aumentaram, não somente por instituições governamentais, mas também empresas privadas da área.<sup>5</sup>

Para garantir a qualidade do biodiesel é necessário estabelecer padrões de qualidade, objetivando fixar teores limites dos contaminantes que não venham prejudicar a qualidade das emissões da queima, bem como o desempenho, a integridade do motor e a segurança no transporte e manuseio.<sup>6</sup> As análises dos teores de diversas substâncias presentes no biodiesel são necessárias e controladas por órgãos especializados. Uma destas análises envolve a determinação do teor de mono-, di- e triglicerídeos não reagidos. Este é um importante parâmetro que pode ser usado para avaliar a eficiência da conversão de óleos e gorduras em biodiesel.<sup>7</sup> Dependendo da concentração em que podem estar presentes no biodiesel, os glicerídeos não reagidos podem aumentar a viscosidade do combustível e, conseqüentemente, reduzir a eficiência da combustão, provocando desde entupimento no filtro de combustível até a formação de depósitos em pistões, válvulas e bico injetores.<sup>8</sup> A presença de glicerol livre (GL) e de glicerídeos, quantificados indiretamente pelo glicerol total (GT), no produto final pode, em níveis elevados, levar à formação de depósitos no motor, daí a necessidade de serem monitorados e controlados.<sup>9</sup>

Atualmente, a técnica utilizada para a análise acima descrita é realizada utilizando-se métodos cromatográficos. No entanto, é conhecido que métodos cromatográficos são bastante dispendiosos, consumindo valores elevados na compra e manutenção, necessitando ainda de mão de obra capacitada e treinada, o que aumenta o custo da análise. Uma metodologia que identificasse a presença destes contaminantes de modo eficaz e com menores custos, poderia evitar diminuição na

qualidade desses biocombustíveis.

Uma maneira bem eficiente e que se inclui na denominada “Química Analítica Verde”, para obtenção de parâmetros da qualidade de um determinado produto, é a utilização de biossensores, devido a sua facilidade de utilização, alta seletividade, utilização de pequena quantidade de amostras e reagentes, baixa geração de resíduos, associados à grande sensibilidade nos resultados.<sup>10,11</sup> Os biossensores são definidos<sup>12</sup> como um subgrupo dos sensores químicos capazes de proporcionar informação analítica quantitativa ou semi-quantitativa, usando um elemento de reconhecimento biológico (como enzimas, anticorpos, proteínas, tecidos, microorganismos) em contato a transdutores químicos ou físicos (como eletroquímicos, ópticos, térmicos, etc). Dentre as substâncias biológicas mais usadas, destacam-se as enzimas, que podem ser encontradas em sua forma purificada ou presentes em microorganismos ou em porções de tecido animal e vegetal. É conhecido na literatura que glicerídeos podem ser transformados em peróxidos de hidrogênio, por meio de reações enzimáticas.<sup>13</sup> O peróxido de hidrogênio faz parte do mecanismo de reação catalítica da enzima peroxidase. Neste contexto, uma vez que esta enzima é imobilizada na superfície do sensor, a mesma pode realizar leituras do peróxido, obtido como subproduto na degradação enzimática de triglicerídeos.

A peroxidase pode ser encontrada em tecidos de vegetais e catalisa a oxidação pelo peróxido de hidrogênio de alguns substratos como mono e difenóis, polifenóis, aminofenóis, entre outros. É conhecida como uma enzima termoestável que pode ter sua atividade regenerada após tratamento térmico. Diversas são as fontes dessa enzima como pêssego, tomate, soja, rabanete, abobrinha, nabo e aspargo.<sup>14</sup>

Neste contexto, este trabalho teve como objetivo o desenvolvimento de um biossensor de baixo custo, baseado em eletrodos de pasta de carbono contendo enzima peroxidase obtida de extratos

vegetais, para a determinação de glicerídeos não reagidos em biodiesel produzidos de óleo de soja.

(Metrohm).

## 2. Parte Experimental

### Equipamentos, materiais e reagentes utilizados

A solução guaiacol 2%, peróxido de hidrogênio P.A e ácido acético foram adquiridos da VETEC (Brasil). O clorofórmio e acetato de sódio anidro foram obtidos da Merck (Alemanha). O pó de grafite utilizado foi obtido da Aldrich (EUA). O óleo mineral usado foi adquirido pela Mantecorp (Brasil). Todas as soluções foram usadas a temperatura ambiente e diluídas, quando necessário, com água deionizada Milli-Q.

Para as análises eletroquímicas foi selecionada a técnica de voltametria cíclica, que é baseada na medida de corrente desenvolvida em um eletrodo (no caso, o biossensor) em condições nas quais existe a polarização por concentração, necessitando de um consumo mínimo de reagentes para a obtenção dos resultados. Em voltametria, um sinal de excitação de potencial variável é aplicado no biossensor produzindo uma resposta característica na forma de corrente (sinal de interesse) que é diretamente proporcional à concentração do analito investigado. Mais especificamente na voltametria cíclica, este sinal de excitação é na forma triangular (rampa de potencial é invertida no meio do ciclo), permitindo que sejam monitorados os resultados referentes à oxidação e a redução da espécie em um único voltamograma.<sup>15</sup>

As medidas eletroquímicas foram realizadas em células eletroquímicas com capacidade de 5 mL, contendo além do eletrodo de trabalho (biossensor), um eletrodo de referência de Ag/AgCl e um eletrodo de Pt como auxiliar, conectados a um potenciostato PG STAT 30 da Autolab

### Obtenção do extrato vegetal enzimático

O vegetal selecionado utilizado como fonte enzimática foi o nabo que foi adquirido em uma chácara da região de Campinas. Com a finalidade de usar o mesmo produto, foi selecionada uma área do plantio exclusivamente para retirada desse material biológico.

O vegetal foi lavado, descascado, picado e homogeneizado em um liquidificador com 100 mL de tampão fosfato 0,1 mol L<sup>-1</sup> (pH 7,0). Logo após, filtrou-se em 4 gazes e o extrato foi centrifugado durante 20 minutos a 1800 r.p.m. A solução sobrenadante foi armazenada em refrigerador a 4 °C e usada como fonte enzimática de peroxidase na construção dos biossensores.

### Determinação da atividade enzimática

A atividade da enzima peroxidase obtida do nabo foi determinada pelas medidas de absorvância no comprimento de onda de 470 nm durante 12 minutos, monitorando a formação do tetraguaicol, conforme metodologia descrita na literatura por Louzada *et al.*<sup>16</sup> Segundo a definição, uma unidade de atividade, U mL<sup>-1</sup> (unidade/mL), é definida como a quantidade de enzima que causa o aumento de 0,001 unidades de absorvância por minuto, nas condições acima mencionadas.

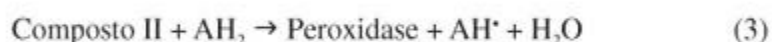
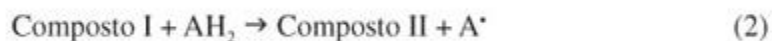
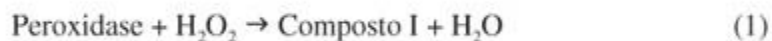
### Construção do biossensor de pasta de carbono

A pasta de carbono foi obtida homogeneizando 0,375 g de pó de grafite e 1950 unidades da concentração de enzima (unidades mL<sup>-1</sup>), que corresponde a 200 µL do extrato enzimático, em um almofariz com

pistilo durante 20 minutos. Em seguida, foi adicionado 0,1848 g de óleo mineral (aglutinante) e homogeneizada por mais 20 minutos. Logo após, esta pasta foi embutida em tubo de vidro de 3 mm de diâmetro com contato elétrico de fio de cobre para

realização das leituras.

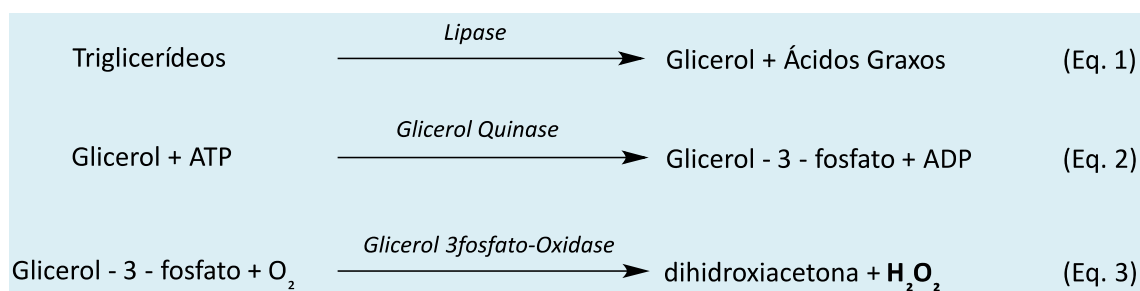
As reações que elucidam o mecanismo catalítico da enzima peroxidase é:



O processo catalítico da enzima se inicia com a reação de seu sítio ativo com o  $\text{H}_2\text{O}_2$ . O  $\text{H}_2\text{O}_2$  é reduzido produzindo o composto I, uma forma intermediária reativa. Numa segunda etapa, o composto I oxida uma molécula fenólica, neste caso o guaiacol, gerando um substrato radicalar e o composto II. Finalmente, o composto II é reduzido por uma segunda molécula de guaiacol, regenerando a peroxidase.<sup>17</sup>

O glicerídeo foi extraído do biodiesel utilizando-se o método de extração segundo Valdez *et al.*,<sup>13</sup> ou seja, 5,0 g de biodiesel foram colocados em um balão de separação e o glicerídeo foi extraído utilizando-se 2,0 mL de água destilada e 2,0 mL de heptano. A fase orgânica era aquela que continha o glicerídeo não reagido. Após separação das fases, foi adicionado o reativo enzimático presente no kit comercial da empresa Laborlab para análise de triglicerídeos. As reações que ocorrem são apresentadas abaixo:

#### Transformação dos glicerídeos em peróxido de hidrogênio



O reativo enzimático é composto por: lipase ( $5000 \text{ U L}^{-1}$ ); glicerol quinase ( $250 \text{ U L}^{-1}$ ); glicerol 3-fosfato oxidase ( $1500 \text{ U L}^{-1}$ ) e ATP (quantidade não informada). Após uso do kit, os glicerídeos presentes no biodiesel são convertidos a peróxido de hidrogênio e, posteriormente, analisados pelo biossensor contendo a enzima peroxidase imobilizada.

#### Medida de peróxido de hidrogênio no biodiesel utilizando-se o biossensor

Para esta análise, utilizou-se a solução de peróxido de hidrogênio formado após aplicação do kit reativo enzimático, conforme descrito anteriormente. O  $\text{H}_2\text{O}_2$  foi extraído da fase orgânica para a fase aquosa utilizando-se uma solução contendo 6 mL de

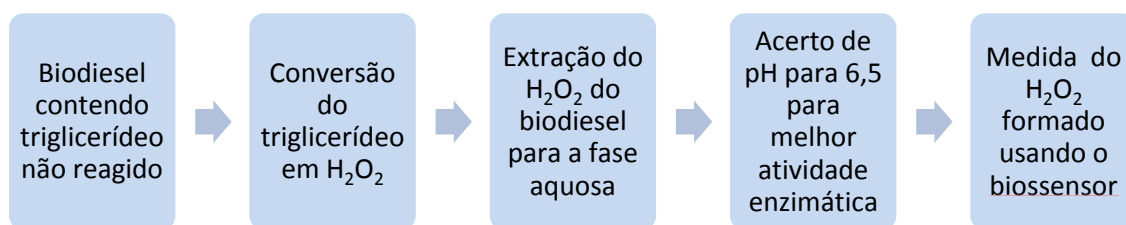
ácido acético  $0,01 \text{ mol L}^{-1}$  e 9 mL de clorofórmio. Foram necessárias quatro extrações para garantia de que todo peróxido havia sido extraído. Esta etapa foi necessária, pois o biossensor não conseguiria realizar as medidas na fase orgânica, pois poderia haver a lixiviação da pasta de carbono na solução e/ou dano do eletrodo de referência.

Como as extrações foram realizadas em meio ácido, o pH foi acertado para 6,5 com acetato de sódio para que ficasse mais próximo do pH ótimo da enzima. Após esta etapa, foi adicionado guaiacol à solução e

medida a corrente catódica produzida pela redução do peróxido de hidrogênio com o biossensor. O mecanismo da reação é o mesmo que o descrito por Uliana *et al.*<sup>18</sup>

Como a reação de formação do peróxido de hidrogênio a partir de triglicerídeo é 1:1, a quantidade de peróxido obtida corresponde estequiometricamente a quantidade de triglicerídeo presente no biodiesel.

A Figura 1 apresenta, na forma de um fluxograma, as etapas envolvidas na análise de triglicerídeos em biodiesel usando o biossensor proposto.



**Figura 1.** Fluxograma das etapas realizadas para determinação de triglicerídeo em amostras de biodiesel usando biossensor eletroquímico

Para comparação dos resultados, foi utilizado o método de cromatografia gasosa adaptado da norma da ABNT NBR 15344.<sup>19</sup> O cromatógrafo usado foi o HP – 5890, coluna HP-Ultra 2 (25 m x 0,20 mm x 0,33  $\mu\text{m}$ ). A rampa de temperatura foi 60 °C a 325 °C. O gás de arraste foi nitrogênio com vazão de 30 mL/min. A concentração do padrão e o método de extração usados foram similares aos descritos por Borin *et al.*<sup>20</sup>

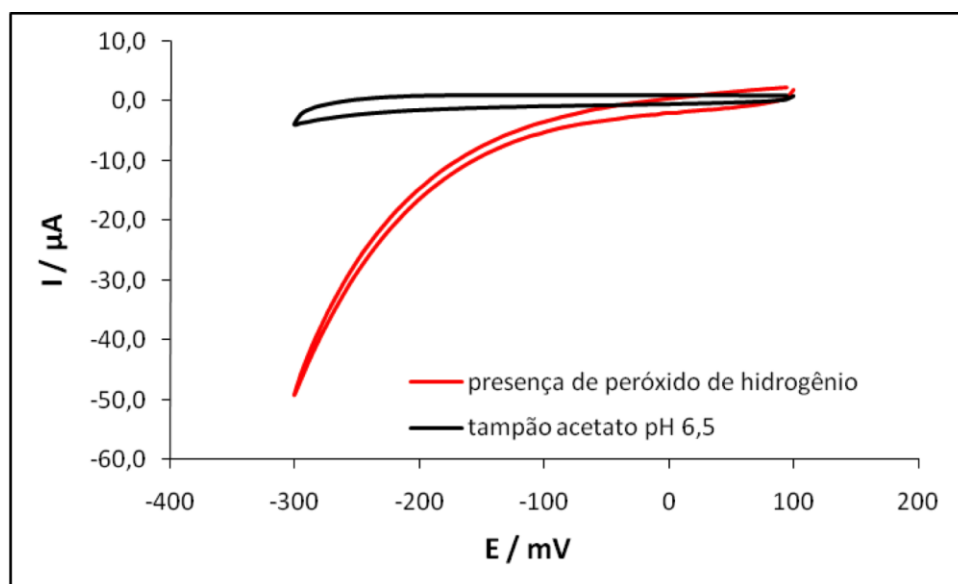
### 3. Resultados e Discussão

#### Comportamento do biossensor contendo extrato enzimático

Para verificar a eficiência do biossensor desenvolvido a partir de enzima obtida de

extrato vegetal, foram realizadas medidas voltamétricas do dispositivo apenas em solução tampão acetato  $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 6,5 e após adição de  $45 \text{ mmol L}^{-1}$  de peróxido de hidrogênio e  $36 \text{ mmol L}^{-1}$  de guaiacol no sistema. Figura 2 apresenta os resultados obtidos.

Na Figura 2, pode-se observar que há um aumento significativo dos valores de corrente quando o peróxido de hidrogênio é adicionado ao sistema. O biossensor, apenas em solução tampão fosfato, não apresenta resposta considerável, indicando que a extração enzimática foi realizada de forma eficiente e que a enzima preserva sua atividade catalítica quando imobilizada em suporte sólido.



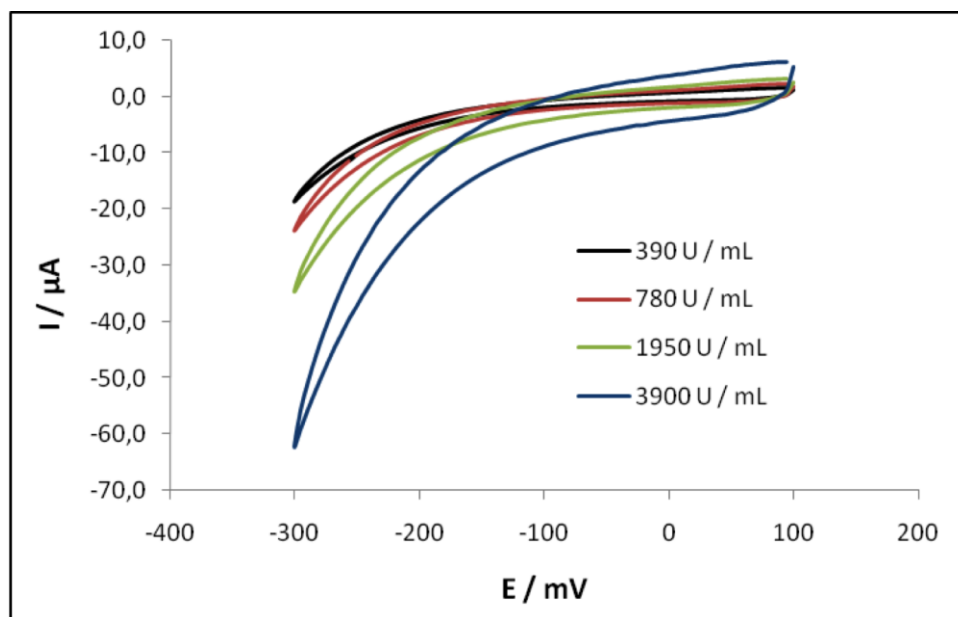
**Figura 2.** Voltamogramas cíclicos obtidos do comportamento do biossensor na ausência e na presença de peróxido de hidrogênio em solução tampão acetato  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  pH 6,5 contendo  $36 \text{ mmol L}^{-1}$  de guaiacol

#### Estudo da influência da concentração da enzima na resposta do biossensor

Este estudo inicia o processo de otimização das condições experimentais do sistema. A concentração da enzima peroxidase no desenvolvimento do dispositivo é um parâmetro importante. De maneira geral, baixas concentrações de enzima não são suficientes para completa reação eletroquímica. No entanto, altas concentrações podem causar problemas devido à saturação do sistema. Assim, foi realizado este estudo para verificação da quantidade de enzima que fornece o valor máximo de resposta, que será utilizada na construção dos biossensores nos estudos subsequentes.

Para isso, foram construídos quatro biossensores com concentrações distintas de enzima: 390, 780, 1950 e 3900  $\text{U mL}^{-1}$ . Os resultados dessa influência podem ser claramente observados na Figura 3, em medidas voltamétricas dos biossensores em solução tampão acetato  $0,01 \text{ mol L}^{-1}$  pH 6,5 contendo  $45 \text{ mmol L}^{-1}$  de peróxido de hidrogênio e  $36 \text{ mmol L}^{-1}$  de guaiacol.

Na Figura 3, observa-se que há um incremento da corrente catódica com o aumento da concentração da peroxidase no dispositivo. No entanto, embora a concentração de 3900  $\text{U mL}^{-1}$  de enzima tenha gerado uma resposta maior, verifica-se um aumento da contribuição da corrente capacitiva nestas condições. Por isso, a quantidade de 1950  $\text{U mL}^{-1}$  de enzima foi selecionada para os biossensores construídos posteriormente.



**Figura 3.** Resultados do estudo da influência da concentração da enzima na resposta do biossensor em solução tampão acetato  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  pH 6,5 contendo  $45 \text{ mmol L}^{-1}$  de peróxido de hidrogênio e  $36 \text{ mmol L}^{-1}$  de guaiacol

#### Estudo da influência da proporção pó de grafite/óleo mineral e do pH na resposta do biossensor

A proporção de pó de grafite e óleo mineral na construção de biossensor a base de pasta de carbono é um fator que influencia no desempenho do dispositivo. Isso porque muito material aglutinante torna a pasta fluida e impede que seja inserida de maneira eficiente no tubo de vidro. Além disso, o sistema é mais resistivo, o que diminui a sensibilidade do dispositivo. No entanto, baixas quantidades de óleo mineral tornam a pasta quebradiça, permitindo que sua permanência no tubo de vidro seja dificultada e, desta maneira, a pasta lixivia para a solução. Já o grafite é um material condutor e essencial para medidas eletroquímicas. Porém, baixos teores não permitem boa condução do sinal, interferindo de maneira direta na resposta do dispositivo.

A resposta dessa influência foi estudada para quatro biossensores contendo proporções distintas de pó de grafite/óleo

mineral (m/m): 90:10%, 75:25%, 50:50% e 45:65%, respectivamente. As medidas voltamétricas foram realizadas em solução tampão acetato  $0,01 \text{ mol L}^{-1}$  pH 6,5 contendo  $45 \text{ mmol L}^{-1}$  de peróxido de hidrogênio e  $36 \text{ mmol L}^{-1}$  de guaiacol. O melhor resultado obtido foi o contendo 90:10% (grafite:óleo mineral), no qual a concentração de grafite é máxima. No entanto, esta proporção não foi escolhida por causa da dificuldade de manuseio da mesma, já que a pasta esfalela por falta de aglutinante. Por isso a proporção selecionada para os estudos posteriores foi a de 75:25%, já que possui uma boa consistência e facilidade para manipulação.

A escolha do pH ótimo do biossensor é importante, pois é um fator que influencia no desempenho do dispositivo. Isso porque o pH muito ácido ou muito básico pode causar a perda da atividade enzimática, pois afeta os grupos ionizáveis da estrutura da enzima, influenciando na resposta eletrocatalítica do biossensor<sup>21</sup>. A resposta dessa influência foi estudada para o biossensor em solução tampão acetato/acetato de sódio  $0,01 \text{ mol L}^{-1}$  em pHs que variaram de 3,0 à 7,0. Os resultados obtidos podem ser observados na

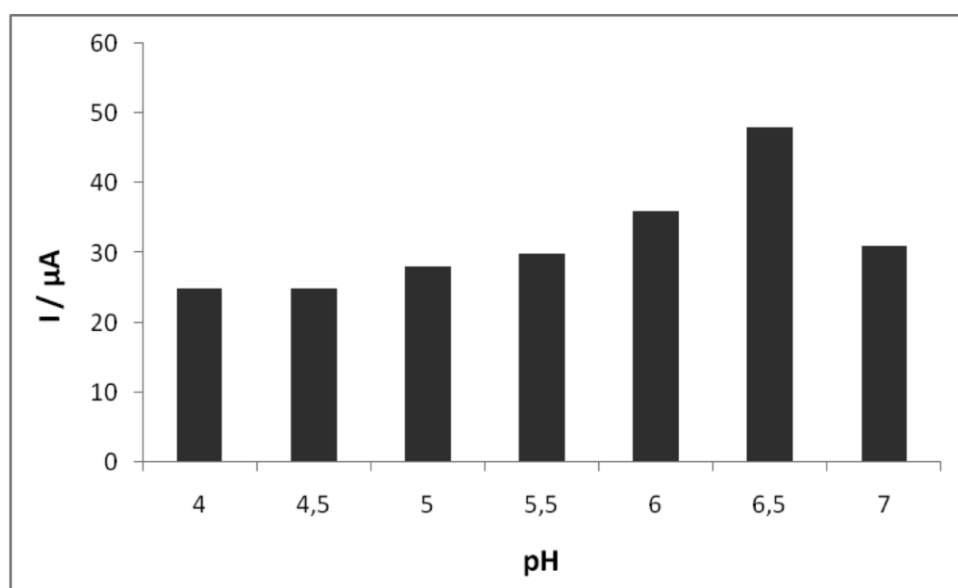


Figura 4 com medidas voltamétricas em solução contendo  $45 \text{ mmol L}^{-1}$  de peróxido de hidrogênio e  $36 \text{ mmol L}^{-1}$  de guaiacol.

Na Figura 4, pode-se observar que há um incremento na resposta voltamétrica com o aumento do pH do meio, até pH igual a 6,5, no qual o valor de corrente catódica é máxima. Embora na literatura seja encontrado trabalhos relatando o pH de 7,0 como o mais adequado para a enzima peroxidase usando-se tampão fosfato, o mesmo não foi obtido em tampão acetato, muito provavelmente porque, em pH 7,0,

esta solução perde a sua capacidade tamponante, uma vez que o  $\text{pK}_a$  do tampão é de 4,75. Assim, o pH de 6,5 foi escolhido para ser usado nos experimentos subsequentes.

Estudos também foram realizados para avaliar o efeito da concentração de guaiacol no meio, usando voltametria cíclica e mantendo-se a concentração de peróxido de hidrogênio constante. Os resultados demonstram (dados não apresentados) que a melhor resposta foi com a concentração de  $36 \text{ mmol L}^{-1}$  do composto fenólico e, por isso, foi selecionada nos experimentos.



**Figura 4.** Resultados do estudo da influência do pH na resposta eletroquímica do biossensor em solução tampão acetato  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  nos pHs de 3 a 7,0 contendo  $45 \text{ mmol L}^{-1}$  de peróxido de hidrogênio e  $36 \text{ mmol L}^{-1}$  de guaiacol

#### Estudo da repetibilidade e reprodutibilidade do biossensor

A repetibilidade de medida é uma característica importante para um instrumento de medição, tendo em vista que representa a capacidade que este possui de dar a mínima variação no valor do sinal, para

mais de uma medida, nas mesmas condições experimentais. A repetibilidade de medida do biossensor foi testada através da reprodução do experimento por cinco vezes nas mesmas condições: solução tampão acetato  $0,01 \text{ mol L}^{-1}$  pH 6,5 contendo  $45 \text{ mmol L}^{-1}$  de peróxido de hidrogênio e  $36 \text{ mmol L}^{-1}$  de guaiacol. Os resultados são apresentados na Tabela 1.

**Tabela 1.** Valores das correntes obtidas para um único biossensor e cinco medições em solução tampão acetato pH 6,5 contendo 45 mmol L<sup>-1</sup> de peróxido de hidrogênio e 36 mmol L<sup>-1</sup> de guaiacol

Medida	Corrente (μA)
1	20,0
2	19,8
3	19,3
4	19,2
5	19,5

O DPR dos valores obtidos neste estudo foi de 1,7%, considerado muito bom já que não ultrapassou 9%, que é comumente aceito para um biossensor construído a partir de extratos vegetais. Os resultados mostram que o biossensor apresentou excelente precisão nas suas medidas.

A reprodutibilidade é também uma característica importante, já que avalia se diferentes biossensores preparados nas mesmas condições experimentais fornecem a mesma resposta voltamétrica. É comum e insatisfatório que biossensores preparados

em dias diferentes forneçam respostas distintas nas mesmas condições de análise. A reprodutibilidade foi avaliada, analisando-se a resposta de 3 biossensores, construídos com o mesmo procedimento e nas mesmas soluções de medida, ou seja, tampão acetato 0,01 mol L<sup>-1</sup> pH 6,5 contendo 45 mmol L<sup>-1</sup> de peróxido de hidrogênio e 36 mmol L<sup>-1</sup> de guaiacol. Para este estudo foram consideradas fontes enzimáticas extraídas de nabos obtidos em dias diferentes. Os resultados são mostrados na Tabela 2.

**Tabela 2.** Valores das correntes medidas para cada biossensor em solução tampão acetato pH 6,5 contendo 45 mmol L<sup>-1</sup> de peróxido de hidrogênio e 36 mmol L<sup>-1</sup> de guaiacol

Biossensor	Corrente (μA)
1	20,022
2	20,019
3	20,011

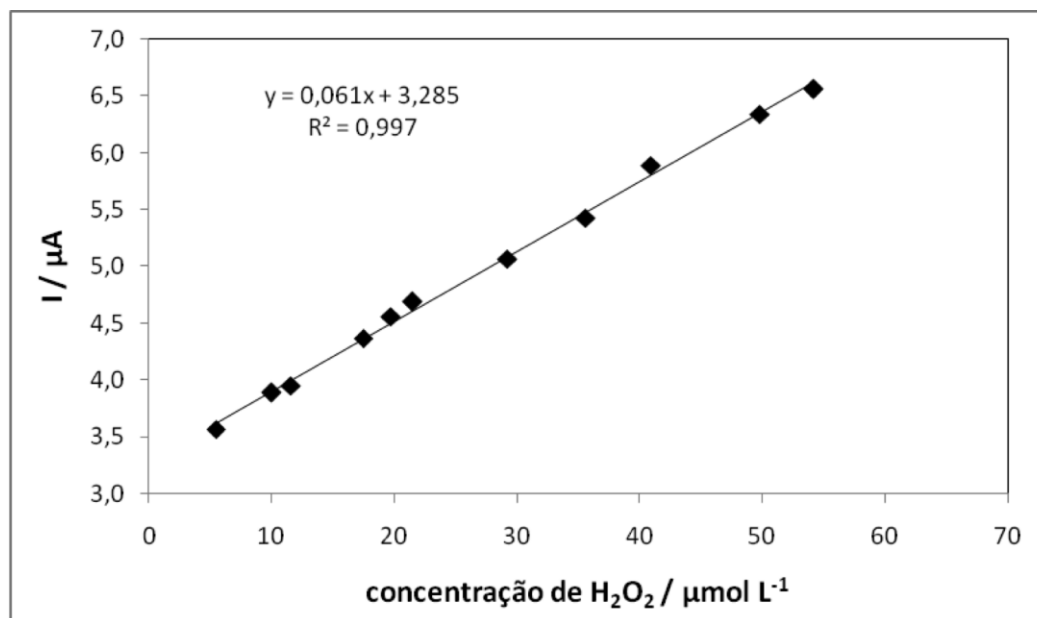
O desvio padrão relativo (DPR) obtido no estudo da reprodutibilidade foi de 0,028%, valor muito baixo e considerado muito bom, demonstrando que mesmo que se usem biossensores distintos, as análises são confiáveis. Além disso, cabe ressaltar que os nabos usados como fonte enzimática não foram os mesmos, mostrando que a quantidade de peroxidase nesses vegetais permanece praticamente constante, desde que sejam obtidos de mesmo solo de plantio, como neste caso. Para vegetais adquiridos de lugares distintos, um novo estudo deve ser realizado para a verificação da influência da região de cultivo na concentração enzimática.

### Curva de calibração

Depois de otimizados todos os parâmetros analíticos, foi possível a obtenção de uma curva de calibração, que será utilizada posteriormente na análise do biodiesel. A curva de calibração proposta foi construída com a introdução do eletrodo na solução contendo ácido acético 0,01 mol L<sup>-1</sup> e acetato de sódio até pH igual a 6,5, com sucessivas adições de peróxido de hidrogênio e realizando medidas voltamétricas, mantendo-se a concentração de 36 mmol L<sup>-1</sup> de guaiacol constante. Depois de concluídas as medições, foi possível construir a curva de

calibração como mostra a Figura 5. A resposta voltamétrica é linear entre 5,5 e 55  $\mu\text{mol L}^{-1}$  de peróxido, com uma equação da reta de  $y$  ( $\mu\text{A}$ ) =  $0,061 \times (\mu\text{mol L}^{-1}) + 3,285$

( $R^2=0,997$ ,  $n=11$ ). O limite de detecção encontrado foi de  $4,0 \times 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$ , calculado de acordo com o método recomendado pela IUPAC.

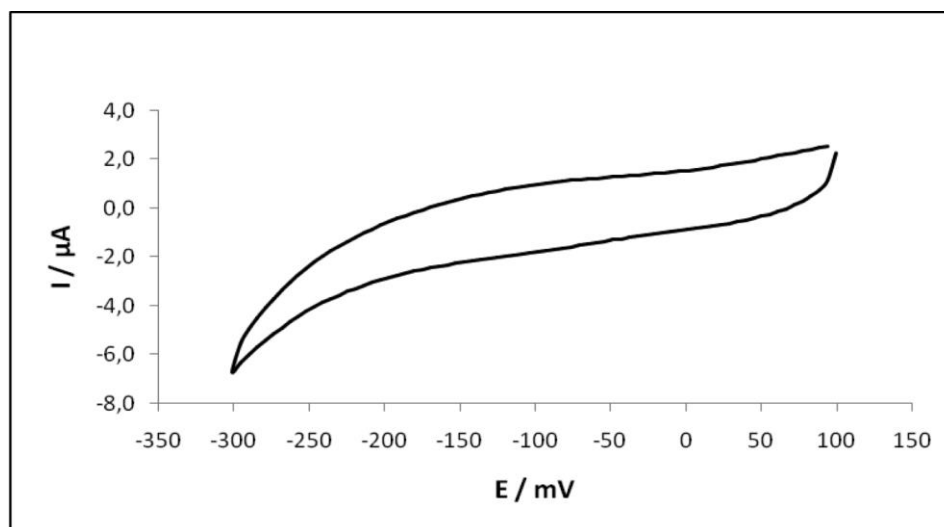


**Figura 5.** Curva de calibração obtida com o biossensor em sucessivas adições de peróxido de hidrogênio em solução tampão acetato  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  pH 6,5 e  $36 \text{ mmol L}^{-1}$  de guaiacol

#### **Aplicação do biossensor para análise de glicerídeos em amostras de biodiesel**

Como não é possível a determinação diretamente da concentração de glicerídeo no biodiesel utilizando-se os biossensores, foi necessário convertê-los em uma substância que pudesse ser medida com o dispositivo. Como o biossensor é à base de enzima peroxidase, uma conversão interessante seria do glicerídeo em peróxido de hidrogênio. Por isso, foi utilizado um kit enzimático, onde os glicerídeos presentes neste biocombustível foram convertidos a peróxido de hidrogênio e, assim, foi possível realizar sua medição. Outra consideração importante, é que este biossensor não pode ser usado em solventes

orgânicos, pois pode haver lixiviação da pasta de carbono para a solução. Como o kit enzimático foi utilizado em solução de heptano, foi necessário realizar um novo processo de extração do  $\text{H}_2\text{O}_2$  para que este fosse transferido a uma fase aquosa. Este processo foi realizado utilizando-se uma mistura de ácido acético  $0,01 \text{ mol L}^{-1}$  e clorofórmio (3:1). Após extração do substrato, o pH do meio foi ajustado para 6,5 com acetato de sódio (para melhor atividade da enzima) e foi adicionado  $36 \text{ mmol L}^{-1}$  de guaiacol. Assim, determinou-se a quantidade de peróxido presente nesta amostra. As medidas foram realizadas em triplicata (curvas superpostas). A Figura 6 apresenta um dos resultados obtidos.



**Figura 6.** Voltamograma da medida de peróxido de hidrogênio na fase aquosa do biodiesel, que foi formado pela conversão enzimática do glicerídeo não reagido

A média dos valores de corrente catódica da análise em triplicata foi de  $6,71 \cdot 10^{-6} \text{ A} \pm 0,014 \cdot 10^{-6}$ . Substituindo este valor na equação da reta achamos a concentração de peróxido de hidrogênio na fase aquosa, que foi de  $56 \cdot 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ . O valor da concentração foi convertido em número de mols ( $2,8 \cdot 10^{-7}$  mols), considerando a célula eletroquímica com capacidade de 5 mL. Levando em conta que o biodiesel utilizado era de óleo de soja e, sabendo-se que um mol de óleo de soja contém 874,8 g de glicerídeo<sup>22</sup>, obtêm-se o valor de  $2,45 \cdot 10^{-4}$  g de glicerídeo não reagido no biodiesel. Convertendo-se o valor em porcentagem a partir da massa de amostra usada (0,5 g), tem-se o teor de 0,049% (m/m) de glicerídeo não reagido no biodiesel.

Com a finalidade de comparação do valor obtido com o biossensor proposto, foi feita análise de triglicerídeo livre utilizando-se cromatografia gasosa. O valor encontrado foi de 0,052% (DPR= 5,8%).

Como estudos futuros, pretende-se avaliar a interferência de outros contaminantes nesta análise, como glicerol produzido e o álcool usado (metanol), quando em excesso no biodiesel. Além disso, biodiesel derivado de outros vegetais, como o de mamona, será

testado, quanto ao teor de glicerídeos usando o biossensor.

#### 4. Conclusões

O biossensor proposto se mostrou apto para a determinação de glicerídeos não reagidos em biodiesel quando comparado com os teores obtidos com a técnica de referência, que é a cromatografia gasosa. Além disso, o dispositivo é preciso, reprodutível e possui exatidão das medidas. O biossensor se mostrou como método alternativo para esse tipo de determinação, pois é de simples construção e utilização e, principalmente, possui baixo custo.

Embora envolva processos de extração para que a análise possa ser realizada com o dispositivo, ainda assim é considerado como parte da Química Verde, pois os resíduos podem ser reutilizados por destilação dos solventes e não gera outros resíduos nocivos ao ambiente. Além disso, a quantidade de amostras e reagentes utilizados é bem baixa, especialmente quando comparada aos métodos de titulação, espectroscópicos ou mesmo cromatográficos.

## Agradecimentos

Agradecemos ao Prof. Lauro Kubota (IQ-UNICAMP), ao CNPq pela bolsa concedida e a PUC-Campinas.

## Referências Bibliográficas

- <sup>1</sup> Feofilova, E. P.; Sergeeva, Y. E.; Ivashchkin, A. A. Biodiesel-fuel: Content, production, producers, contemporary biotechnology (Review). *Applied Biochemistry and Microbiology* **2010**, *46*, 369. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- <sup>2</sup> Singh, B.; Guldhe, A.; Rawat, I.; Bux, F. Towards a sustainable approach for development of biodiesel from plant and microalgae. *Renewable & Sustainable Energy Reviews* **2014**, *29*, 216. [[CrossRef](#)]
- <sup>3</sup> Yan, Y.; Li, X.; Wang, G.; Gui, X.; Li, G.; Su, F.; Wang, X.; Liu, T. Biotechnological preparation of biodiesel and its high-valued derivatives: A review. *Applied Energy* **2014**, *113*, 1614. [[CrossRef](#)]
- <sup>4</sup> Mojifur, M.; Masjuki, H. H.; Kalam, M.A.; Atabani, A. E.; Shahabuddin, M.; Palash, S. M.; Hazrat, M. A. Effect of biodiesel from various feedstocks on combustion characteristics, engine durability and materials compatibility: A review. *Renewable & Sustainable Energy Reviews* **2013**, *28*, 441. [[CrossRef](#)]
- <sup>5</sup> Vêras, G.; Brito, A. N. B.; Silva, A. C.; Silva, P.; Costa, G. B.; Félix, L. C. N.; Fernandes, D. D. S.; Fontes, M. M. Classificação de biodiesel na região do visível. *Química Nova* **2012**, *35*, 315. [[CrossRef](#)]
- <sup>6</sup> Babaei, M.; Alizadeh, N. Methanol selective gas sensor based on nano-structured conducting polypyrrole prepared by electrochemically on interdigital electrodes for biodiesel analysis. *Sensors and Actuators B: Chemical* **2013**, *183*, 617. [[CrossRef](#)]
- <sup>7</sup> Donkin, S. S. R. Glycerol from biodiesel production: the new corn for dairy cattle. *Revista Brasileira de Zootecnia* **2008**, *37*, 280. [[CrossRef](#)]
- <sup>8</sup> Lôbo, I. P.; Ferreira, S. L. C.; Cruz, R. S. Biodiesel: parâmetros de qualidade e métodos analíticos. *Química Nova* **2009**, *32*, 1596. [[CrossRef](#)]
- <sup>9</sup> Ribeiro, M. S.; Rocha, F. R. P. A single-phase spectrophotometric procedure for in situ analysis of free glycerol in biodiesel. *Microchemical Journal* **2013**, *106*, 23. [[CrossRef](#)]
- <sup>10</sup> Farré, M.; Pérez, S.; Gonçalves, C.; Alpendurada, M. F. Green analytical chemistry in the determination of organic pollutants in the aquatic environment. *Trends Analytical Chemistry* **2010**, *29*, 1347. [[CrossRef](#)]
- <sup>11</sup> Sang, S.; Zhao, Y.; Zhang, W.; Li, P.; Hu, J.; Li, G. Surface stress-based biosensors. *Biosensors and Bioelectronics* **2014**, *51*, 124. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- <sup>12</sup> Thévenot, D. R.; Toth, K.; Durst, R. A.; Wilson, S. G. Electrochemical biosensors: recommended definitions and classification. *Biosensors and Bioelectronics* **2001**, *16*, 121. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- <sup>13</sup> Valdez, H. C.; Amado, R. S.; de Souza, F. C.; D'Elia, E.; Vieira, E. C. Determinação de glicerol livre e total em amostras de biodiesel por método enzimático com detecção colorimétrica. *Química Nova* **2012**, *35*, 601. [[CrossRef](#)]
- <sup>14</sup> Fatibello-Filho, O.; Vieira, I. C. Uso analítico de tecidos e de extratos brutos vegetais como fonte enzimática. *Química Nova* **2002**, *25*, 455. [[CrossRef](#)]
- <sup>15</sup> Skoog, D. A.; Holler, F. J.; Crouch, S. R. *Princípios de Análise Instrumental*. 6a. ed., Bookman: Porto Alegre, 2009.
- <sup>16</sup> Louzada, E. S.; Luccas, P. O.; de Magalhães, C. S. Construção e caracterização de um biossensor potenciométrico para determinação de pirogalol. *Revista Analytica* **2004**, *11*, 52. [[Link](#)]
- <sup>17</sup> Silva, M. C.; Corrêa, A. D.; Torres, J. A.; Amorim, M. T. S. P. Descoloração de corantes industriais e efluentes têxteis simulados por peroxidase de nabo (*Brassica campestris*). *Química Nova* **2012**, *35*, 889. [[CrossRef](#)]
- <sup>18</sup> Uliana, C. V.; Riccardi, C. S.; Yamanaka, H. Estudo do comportamento eletroquímico da enzima peroxidase na presença de peróxido

de hidrogênio e ácido 5-aminossalicílico. *Eclética Química* **2008**, 33, 57. [[CrossRef](#)]

<sup>19</sup> ABNT NBR 15344: Biodiesel - Determinação de glicerina total e do teor de triglicerídeos em biodiesel, 2010. [[Link](#)]

<sup>20</sup> Borin, A.; Mendes, R. K.; Etchegaray Jr., A.; Farias, R. S.; Marassato, M. A. Planejamento de Experimentos na Validação de Método Analítico: Aplicação para Análise de Robustez na Determinação de Glicerina Livre em Biodiesel. *Revista Analytica* **2011**, 55, 56. [[Link](#)]

<sup>21</sup> Silva, V. P. A.; Alves, C. R.; Oliveira, J. E.; Rondina, D.; Furtado, R. F. Biossensor amperométrico para determinação de peróxido de hidrogênio em leite. *Eclética Química* **2011**, 36, 143. [[CrossRef](#)]

<sup>22</sup> Froehner, S.; Leithold, J.; Lima Junior, I. F. Transesterificação de óleos vegetais: caracterização por cromatografia em camada delgada e densidade. *Química Nova* **2007**, 30, 2016. [[CrossRef](#)]