



# **Desenvolvimento e Aplicação de um Biossensor Enzimático para o Controle de Qualidade do Óleo Comestível de Gergelim**

**Érica Felipe Maurício**

**Projeto de Final de Curso**

**Orientadores:**

**Prof.<sup>a</sup> Andréa Medeiros Salgado**

**Dr.<sup>a</sup> Lívia Maria da Costa Silva**

**Novembro de 2013**

# DESENVOLVIMENTO E APLICAÇÃO DE UM BIOSSENSOR ENZIMÁTICO PARA CONTROLE DE QUALIDADE DO ÓLEO COMESTÍVEL DE GERGELIM

*Érica Felipe Maurício*

Projeto de Final de Curso submetido ao Corpo Docente da Escola de Química, como parte dos requisitos necessários a obtenção do grau de Engenheiro de Alimentos.

Aprovado por:

---

Francisca das Chagas Sobral Silva Mihos, M.Sc.

---

Prof. Fernando Luiz Pellegrini Pessoa, D.Sc.

---

Prof.<sup>a</sup> Karen Signori Pereira, D.Sc.

Orientado por:

---

Prof.<sup>a</sup> Andréa Medeiros Salgados, D.Sc.

---

Lívia Maria da Costa Silva, D.Sc.

Rio de Janeiro, RJ, Brasil

Novembro de 2013

Maurício, Érica Felipe.

Desenvolvimento e aplicação de um biossensor enzimático para o controle de qualidade do óleo comestível de gergelim / Érica Felipe Maurício Rio de Janeiro: UFRJ/EQ, 2013.

xiii,55p.; il.

Projeto Final – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola de Química, 2013.

Orientadores:      Andréa Medeiros Salgado  
   Livia Maria da Costa Silva

1.      Biossensor      2. Lipase *Candida rugosa*      3. Óleos Comestíveis      4. Projeto Final (Graduação – UFRJ/EQ)      5. D. Sc. Livia Maria da Costa Silva e Professora Andréa Medeiros Salgado      I. Título.

*Dedico este trabalho  
Aos meus pais: Elenice e Ferdinando.*

## AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer a todos que de alguma forma contribuíram para a elaboração deste projeto final.

- ∞ Primeiramente, agradeço a Deus por ter me dado forças e eu ter conseguido chegar até aqui;
- ∞ Aos meus pais, Elenice e Ferdinando, pelo apoio, amor, carinho e ajuda em todas as horas, pois sem eles nada disso seria possível;
- ∞ A minha família pelo apoio, carinho e confiança;
- ∞ Ao meu namorado, Emerson Rufino, por ter me ajudado e ficado ao meu lado nos momentos difíceis;
- ∞ A Ariana Farias Melo pela oportunidade que me deu no Laboratório de Sensores Biológicos, em poder trabalhar junto com ela e conhecer a importância de um biossensor, fazer parte da tese de doutorado dela e ter se tornado uma amiga;
- ∞ A Livia Maria da Costa Silva, pela orientação e pela amizade, apoio e conselhos;
- ∞ A Andréa Medeiros Salgado, pela orientação e ensinamentos;
- ∞ Aos meus queridos amigos que na hora do desespero estavam sempre ao meu lado;
- ∞ Ao Professor Fernando Luiz Pellegrini Pessoa, pela orientação e bolsa durante a iniciação científica;
- ∞ Ao CNPq e a Faperj pelo apoio financeiro

Resumo do Projeto de Final de Curso apresentando à Escola de Química como parte dos requisitos necessários para a obtenção do grau de engenheiro de alimentos.

**DESENVOLVIMENTO E APLICAÇÃO DE UM BIOCSENSOR ENZIMÁTICO  
PARA CONTROLE DE QUALIDADE DO ÓLEO COMESTÍVEL DE  
GERGELIM**

Érica Felipe Maurício

Novembro, 2013

Orientadores: Prof.<sup>a</sup> Andréa Medeiros Salgado

Dr.<sup>a</sup> Livia Maria da Costa Silva

Este trabalho propõe um novo instrumento, biossensor enzimático, para detectar o nível de degradação de amostras de óleos vegetais o que permite um controle mais direto da sua qualidade. Para o desenvolvimento do instrumento, foi utilizada a enzima comercial lipase obtida de *Candida rugosa* tipo VII como biocomponente do biossensor, nas formas livre e imobilizada, em conjunto com um eletrodo íon-seletivo de hidrogênio para soluções não aquosas, utilizado como transdutor. Os testes foram realizados com amostras de óleo de gergelim, devido ao conhecimento crescente dos seus benefícios a saúde que provavelmente promoverá o aumento da demanda e mercado do óleo, e a enzima foi utilizada e testada nas formas livre e imobilizada. O sistema (enzima/eletrodo) mostrou uma resposta ótima durante o tempo reacional de 15 minutos, nas condições de pH 8,75 e 37°C. A resposta do eletrodo (mV) foi proporcional à concentração do éster na faixa de 10 a 50% (v/v) de ácidos graxos livres. A curva de calibração do instrumento mostrou boa correlação entre as variáveis estudadas (concentração do óleo e resposta do transdutor), indicando seu bom desempenho para a detecção potenciométrica de triglicerídeos em amostras de óleos de gergelim. Posteriormente, o biossensor enzimático desenvolvido foi aplicado em amostras de óleo de gergelim degradado, através de tratamento térmico, aplicação de UV e oxidação (Rancimat). Além disso, o biossensor foi testado também em amostra de óleo de gergelim usado para fritura de batata. Os valores encontrados foram sempre comparados / relacionados com o índice de acidez – ensaio já utilizado para análise de

degradação de óleos. Os resultados mostraram uma boa resposta e sensibilidade de detecção com fatores de correlação acima de 0,979, além de uma ótima aplicabilidade do biossensor desenvolvido.

# SUMÁRIO

Capítulo I – Introdução .....	1
Capítulo II – Objetivos.....	3
II.1 – Objetivo Geral .....	3
II.2 – Objetivos Específicos.....	3
Capítulo III – Revisão bibliográfica.....	4
III.1 – Biossensores.....	4
III.2 – Lipases .....	14
III.3 – Gergelim .....	16
III.4 – Óleos.....	18
III.5 – Óleo de Gergelim .....	20
III.6 – Estabilidade Oxidativa de Óleos .....	21
Capítulo IV – Materiais e Métodos.....	24
IV.1 – Óleo de Gergelim Comercial .....	24
IV.2 – Preparação da Emulsão.....	25
IV.3 – Biocomponente (Lipase Comercial).....	25
IV.3.1 – Processo de imobilização da lipase.....	25
IV.4– Determinação da Atividade Lipásica.....	27
IV.5 – Extração do Óleo de Gergelim.....	28
IV.6 – Métodos de Degradação do Óleo de Gergelim .....	29
IV.6.1 – Preparação da Amostra Real do Óleo de Gergelim Degradado por Fritura.....	29
IV.7 – Índice de Acidez.....	30
IV.8 –Desenvolvimento do Biossensor: Análise Potenciométrica.....	31
Capítulo V – Resultados e Discussão.....	34
V.1 – Testes Realizados com o Óleo de Gergelim Comercial (Marca Pazze) e a Enzima Lipase na Forma Livre .....	34
V.2 – Testes de Degradação do Óleo de Gergelim Comercial (Marca Pazze) .....	35
V.3 – Aplicação do Biossensor em Amostra Real de Óleo de Gergelim Comercial (Marca Pazze) Degradado na Fritura de Batatas.....	39
V.4 – Testes Realizados com o Óleo de Gergelim Recém-extraído e a Enzima Lipase na Forma Livre .....	41
V.5 – Testes Realizados com o Óleo de Gergelim Comercial (Marca Pazze) e a Enzima Lipase na Forma Imobilizada .....	44
V.5.1 – Construção da curva de calibração do biossensor enzimático .....	44



V.5.2 – Avaliação do comportamento das curvas ascendente e descendente de calibração do biossensor enzimático.....	46
Capítulo VI – Conclusões e Sugestões.....	48
Referências Bibliográficas .....	50

## LISTA DE FIGURAS

Figura III.1. 1 - Esquema de um biossensor.....	4
Figura III.1.2 - Diversas áreas de aplicação da análise potenciométrica. ....	6
Figura III.1. 3 – Esquema dos principais desafios para a comercialização dos biossensores.....	13
Figura III.2. 1– Reações catalisadas pela lipase. ....	15
Figura III.3. 1 – Gergelim ( <i>Sesamum indicum</i> L.).....	16
Figura III.5. 1– Estrutura molecular do sesamol. ....	21
Figura III.5. 2 – Estrutura molecular do tocoferol. ....	21
Figura IV.1. 1 - Informações nutricionais contidas no rótulo do óleo de gergelim comercial da marca Pazze .....	24
Figura IV.2.1. 1 – Suporte vítreo utilizado.....	26
Figura IV.2.1. 2 – Descrição química da reação no processo de imobilização .....	27
Figura IV.3. 1 – Esquema da medida da atividade enzimática. ....	28
Figura IV.5.1. 1 – Procedimento de fritura das batatas com óleo de gergelim comercial. ....	30
Figura IV.7. 1- Esquema da reação que ocorre pela ação da lipase em um éster.....	32
Figura IV.7. 2 – Esquema da análise potenciométrica.....	32
Figura IV.7. 3 - Foto da análise potenciométrica .....	33
Figura V.1. 1 – Variação do potencial (mV) de acordo com a variação da concentração do óleo de gergelim comercial utilizando a enzima na forma livre. ....	34
Figura V.1. 2 – Atividade enzimática (U/mL) de acordo com a variação da concentração do óleo de gergelim comercial utilizando a enzima na forma livre. ....	35

Figura V.2. 1 – Mudança de coloração do óleo de gergelim Pazze após 40 horas de tratamento térmico a 160°C. (A) Óleo sem degradação e (B) Óleo degradado. ....	37
Figura V.2. 2 – Variação do potencial do óleo de gergelim degradado de acordo com o tempo de exposição ao tratamento térmico (175°C).....	38
Figura V.2. 3 – Índice de acidez do óleo de gergelim degradado de acordo com o tempo de exposição ao tratamento térmico (175°C). ....	38
Figura V.2. 4 – Relação entre os resultados encontrados com os dois métodos: índice de acidez e biossensor ( $\Delta$ potencial).....	39
Figura V.3. 1–Observação visual da degradação do óleo de gergelim comercial após 5 frituras com o mesmo.....	40
Figura V.3. 2–Análises da degradação do óleo de gergelim, por meio do biossensor (variação do potencial) e do índice de acidez, após sucessivos procedimentos de fritura de batata.....	40
Figura V.4. 1 – Variação do potencial (mV) de acordo com a variação da concentração do óleo de gergelim recém-extraído utilizando a enzima na forma livre.....	42
Figura V.4. 2 – Atividade enzimática (U/mL) de acordo com a variação da concentração do óleo de gergelim recém-extraído utilizando a enzima na forma livre.....	43
Figura V.5.1. 1 – Variação do potencial (mV) de acordo com a variação da concentração do óleo de gergelim comercial utilizando a enzima na forma imobilizada. ....	45
Figura V.5.1. 2 – Atividade enzimática (U/mL) de acordo com a variação da concentração do óleo de gergelim comercial utilizando a enzima na forma imobilizada. ....	45
Figura V.5.2. 1 – Variação do potencial (mV) de acordo com o crescimento e decréscimo da variação de concentração do óleo de gergelim utilizando enzima imobilizada. ....	46

## LISTA DE QUADROS

Quadro III.1. 1 – Exemplos de biossensores usados na indústria de alimentos para avaliação de qualidade. ....	8
Quadro III.1. 2 – Biossensores utilizados na indústria de alimentos para a detecção de microrganismos patogênicos. ....	9
Quadro III.1. 3 – Biossensores utilizados na indústria de alimentos para a detecção de toxinas. ....	10
Quadro III.1. 4 – Biossensores utilizados na indústria de alimentos para a detecção de aditivos alimentares. ....	10
Quadro III.1. 5 – Biossensores a base de lipase, como biocomponente (continua). ....	11
Quadro III.2. 1 - Aplicações de lipases conforme o tipo de reação catalisada e as áreas de aplicação. ....	16
Quadro III.4. 1 – Grupos de óleos vegetais por tipo de ácido graxo predominante. ....	18

## LISTA DE TABELAS

Tabela III.3. 1– Conteúdo de óleos em material oleaginoso.....	17
Tabela V.2. 1 - Degradação do óleo de gergelim em relação ao comprimento de onda e ao tempo de exposição. ....	36
Tabela V.3. 1 - Comparação entre os índices de acidez experimental e calculado para as amostras reais, com seus respectivos desvios padrão. ....	41

## Capítulo I – Introdução

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

A avaliação da estabilidade oxidativa de óleos é realizada por testes de oxidação acelerada, índice de peróxido e determinação de dienos conjugados. No entanto, todos esses métodos necessitam de altas temperaturas apresentando valores questionáveis, pois os peróxidos se decompõem rapidamente, além de não refletirem a estabilidade ou qualidade do óleo em condições normais de estocagem. Outro método utilizado é a análise sensorial sendo um método mais útil e sensível, porém requer treinamento da equipe e os resultados variam muito de uma equipe para outra (FRANKEL, 1993).

Neste contexto, a aplicação de biossensor se torna promissora. Trata-se de uma classe de instrumentos que apresenta como vantagens: poder ser automatizado e colocado *in line*, assim como, apresentar elevada especificidade, uma vez que tem a capacidade de combinar a seletividade de um componente bioativo com o analito de interesse, com a sensibilidade de um transdutor capaz de converter o sinal biológico em um sinal elétrico proporcional à concentração do analito analisado. Ademais, estes instrumentos são capazes de fornecer resultados rápidos, facilidade no processamento de dados, baixo custo e, muitas vezes, serem portáteis.

Além disso, a lipase, sendo utilizada como o componente bioativo, trás como característica ao biossensor a especificidade que é um fator de máxima importância. Ainda, a lipase ao reagir gera produtos similares àqueles produzidos por catálise química, porém com menor grau de termo degradação, devido à temperatura na

biocatálise ser bem inferior. (CASTRO, H. F. de; MENDES, A. A.; SANTOS, J. C. dos, 2004).

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

Este trabalho encontra-se estruturado em sete capítulos da seguinte forma:

- Capítulo I – trata da introdução do trabalho onde é apresentado um panorama geral do assunto.
- Capítulo II – mostra o objetivo geral do trabalho e os objetivos específicos para poder alcançá-lo.
- Capítulo III – traz os embasamentos teóricos pertinentes à análise dos resultados, através de uma revisão bibliografia referentes ao tema deste projeto final.
- Capítulo IV – descreve as metodologias e materiais utilizados no desenvolvimento do presente trabalho.
- Capítulos V – apresenta os resultados obtidos bem como as discussões comparando com os resultados encontrados na literatura.
- Capítulo VI – relata as conclusões obtidas ao longo do estudo, as considerações finais sobre o tema deste projeto final e apresenta as sugestões para continuidades da linha de pesquisa.

## Capítulo II – Objetivos

### II.1 – Objetivo Geral

Desenvolver um biossensor utilizando a lipase comercial de *Candida rugosa* tipo VII para detectar a degradação de óleo comestível de gergelim utilizado na indústria alimentícia.

### II.2 – Objetivos Específicos

- ✓ Avaliação da atividade hidrolítica do componente biológico (lipase comercial de *Candida rugosa* tipo VII) nas formas livre e imobilizada, em diferentes concentrações de óleo de gergelim;
- ✓ Avaliação do comportamento do sistema proposto: componente biológico, nas formas livre e imobilizada, acoplado ao transdutor selecionado (eletrodo íon-seletivo de hidrogênio);
- ✓ Aplicação do biossensor desenvolvido em óleo de gergelim recém-extraído;
- ✓ Aplicação do biossensor desenvolvido em amostras degradadas, de óleo comestível de gergelim, por diferentes métodos (luz ultravioleta, tratamento térmico, Rancimat);
- ✓ Aplicação do biossensor desenvolvido em amostra real (óleo comestível de gergelim utilizado em fritura de batata);
- ✓ Comparação entre os resultados encontrados com biossensor enzimático e o método tradicional (índice de acidez).



## Capítulo III – Revisão bibliográfica

### III.1 – Biossensores

Os dispositivos criados a partir da junção de uma enzima com um eletrodo receberam o nome de “Eletrodos Enzimáticos”. Contudo, com o desenvolvimento intensivo na busca de novos sensores físico-químicos, em especial, utilizando-se reações enzimáticas variadas, foi introduzido um termo mais genérico e abrangente, o de “Biossensor” (ALFAYA, KUBOTA, 2002; ROSATTO, 2000).

A seletividade é um dos maiores problemas na química analítica, e geralmente, é obtida apenas através de um intenso controle das condições experimentais. No entanto, na natureza, encontram-se estruturas altamente seletivas na forma de enzimas, anticorpos, dentre outros. As enzimas, particularmente, apresentam várias vantagens, em especial a combinação de seletividade com sensibilidade, além de permitirem a utilização de várias tecnologias de transdução (SILVA, 2011).

Assim, um biossensor combina a especificidade de um componente biológico ativo para o analito de interesse com a sensibilidade de um transdutor para converter o sinal biológico em um sinal elétrico proporcional à concentração do analito (SALGADO, 2001), como visto na Figura III.1.1. Um biossensor deve ser claramente diferenciado de um sistema bioanalítico que requer etapas adicionais de processamento, tais como, adição de reagentes. Além disso, nestes sistemas o componente biológico não está necessariamente ligado diretamente ao detector, o que muitas vezes ocorre nos biossensores.

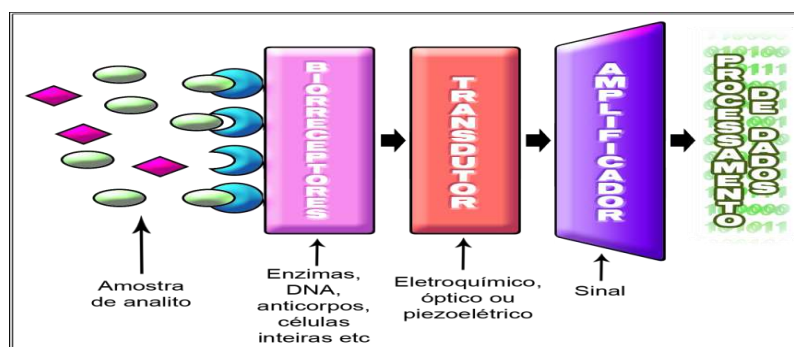


Figura III.1. 1 - Esquema de um biossensor.

Fonte: arte gráfica de MELO, 2012.

Os biossensores fornecem informações analíticas quantitativas ou semi-quantitativas usando um elemento biológico reconhecedor incorporado a um transdutor que deve ser capaz de converter a resposta química em um sinal apropriado. O elemento chave do biossensor é a camada sensora, constituída por biomoléculas, que permite avaliar a concentração de componente desejado contido na amostra. A escolha do material biológico e do transdutor adequado depende de cada amostra e do tipo de medida em que se tem interesse. O biocomponente determina o grau de seletividade ou especificidade do biossensor. O reconhecimento seletivo é a principal característica da tecnologia dos biossensores. Diferentes materiais e transdutores têm sido empregados na construção dos biossensores sendo os eletroquímicos os mais populares, pois apresentam resposta rápida, possuem a vantagem de serem econômicos e a possibilidade de automação, permitindo sua aplicação em um grande número de amostras (MELLO, KUBOTA, 2007).

Os biossensores são classificados em função: do tipo de interação (entre o elemento de reconhecimento e o analito); do método utilizado para detectar esta interação; da natureza dos elementos de reconhecimento; e o tipo de sistema de transdução (RUMAYOR et al., 2005).

Atualmente, os biossensores estão cada vez mais sendo introduzidos a diversas áreas como: saúde, ambiental, pecuária, agrônômica, alimentícia e até na prevenção de bioterrorismo (EMBRAPA, 2008). E ainda é possível destacar a ocupação dos biossensores potenciométricos no mercado de acordo com as suas áreas, como observado na Figura III.1.2.

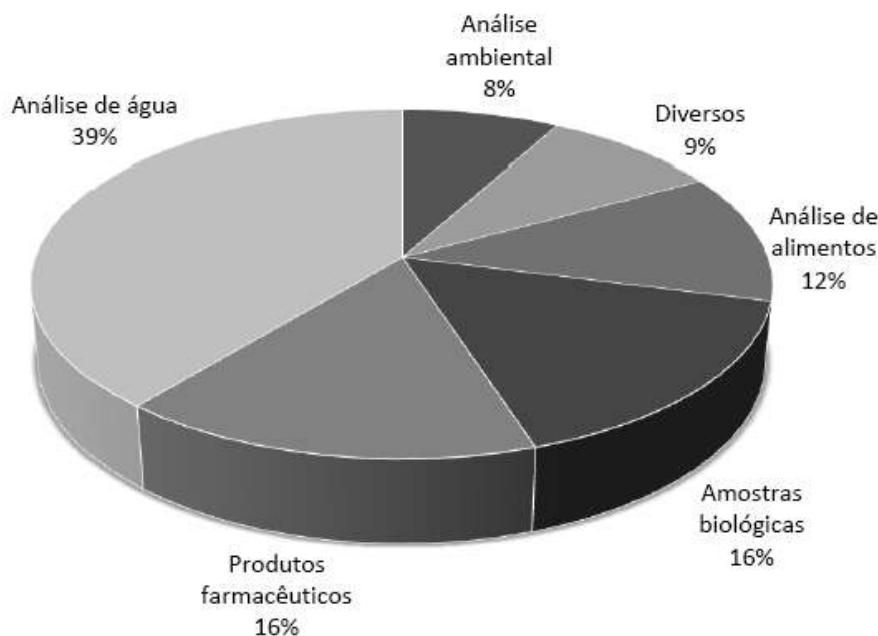


Figura III.1.2 - Diversas áreas de aplicação da análise potenciométrica.  
 Fonte: KUTSCHENKO et al., 2005 modificado por SILVA, 2011.

Os biossensores para serem aplicados na indústria de alimentos devem possuir, se não todas, algumas das seguintes características: alta sensibilidade, alta seletividade, confiabilidade, durabilidade, rapidez na emissão dos resultados, simplicidade de operação, poucas exigências de condições de preparação das amostras, possibilidade de automação, facilidade de transporte, miniaturização, capacidade de realizar múltiplas análises e baixo custo (RUMAYOR et al., 2005). Sendo considerado também que as vantagens dos biossensores em relação às técnicas convencionais não se limitam à sensibilidade e seletividade, mas ao fato de que, geralmente, dispensarem um elaborado pré-tratamento da amostra (praticidade), rapidez nas análises e gastos mínimos de reagentes, proporcionando assim, agilidade na obtenção dos resultados, e redução no custo financeiro (EMBRAPA, 2008).

Por isso, considerando a preocupação mundial com a qualidade dos alimentos, o desenvolvimento de biossensores ocupa ainda mais espaço no mercado, devido ao interesse crescente de empresas no financiamento desse tipo de tecnologia para disponibilizá-la ao mercado (EMBRAPA, 2008).

A qualidade dos alimentos pode ser entendida como o fator que diferencia os produtos de acordo com as suas características sensoriais, composição e propriedades funcionais. Em análises de qualidade de alimentos, os biossensores são aplicados, sobretudo, na detecção de contaminantes químicos e biológicos. Portanto, a análise da composição dos alimentos empregando biossensores permite quantificar os componentes encontrados naturalmente nos alimentos e verificar outros compostos que são adicionados para o enriquecimento, como é o caso de algumas vitaminas e minerais (EMBRAPA, 2008).

No Quadro III.1.1, pode-se observar os diferentes tipos de biossensores desenvolvidos para avaliar a composição de alimentos, incluindo aqueles utilizados para avaliar seus componentes naturais (teor de etanol, glicose, amido, entre outros) e também aditivos como vitaminas, aminoácidos e minerais (RUMAYOR et al., 2005).

Quadro III.1. 1 – Exemplos de biossensores usados na indústria de alimentos para avaliação de qualidade.

Sistema de Transdução	Elemento de Reconhecimento	Analito	Alimentos
Amperométrico	Glicose Oxidase	Glicose	Vinho, leite, iogurte, refrigerante, suco e mel
Amperométrico	Frutose desidrogenase	Frutose	Mel, leite, suco, gelatina e corante artificial
Amperométrico	$\beta$ -galactosidase	Lactose	Leite
Amperométrico	Transaminase, Lactato desidrogenase	Lactato	Vinho e sidra
Amperométrico	Fructosa desidrogenase, $\beta$ -galactosidase	Lactulose	Leite
Amperométrico	$\alpha$ -amilase, amiloglucosidase, glicose oxidase	Amido	Farinha de trigo
Amperométrico	Aminoácido oxidase	L-aminoácidos	Leite e suco de frutas
Amperométrico	Glutamato oxidase	L-glucamato	Condimentos e soja
Amperométrico	Lisina oxidase	L-lisina	Leite e massas
Amperométrico	Malato desidrogenase	L-malato	Vinho, sidra e suco
Amperométrico	Álcool oxidase	Etanol	Cerveja, vinho e outras bebidas alcoólicas
Amperométrico	Glicerolfosfato oxidase, glicerolquinase	Glicerol	Vinho
Amperométrico	Polifenol oxidase	Catecol	Cerveja
Amperométrico	Polifenol Oxidase e peroxidase	Colesterol	Manteiga e Margarina
Amperométrico	Citrato liasa	Ácido cítrico	Suco e isotônicos
SPR	Anticorpos	Ácido fólico	Alimentos fortificados
SPR	Anticorpos	Biotina e folatos	Fórmulas infantis e leite
Eletrquímico	Fosfolipase D e colina oxidase	Lecitina	Farinha e óleo de soja

Legenda: SPR: Ressonância de Plasmônica de Superfície.

Fonte: adaptado de RUMAYOR et al., 2005; NEVES, 2011.

Além dos exemplos já citados, também é possível observar outros tipos de biossensores na indústria de alimentos como os para detecção de microrganismos patogênicos (Quadro III.1.2), detecção de toxinas (Quadro III.1.3) e detecção de aditivos alimentares (Quadro III.1.4).

Quadro III.1. 2 – Biossensores utilizados na indústria de alimentos para a detecção de microrganismos patogênicos.

Sistemas de Transdução	Elemento de Reconhecimento	Microrganismo
Eletroquímico	Anticorpos	<i>S.typhimurium</i> , <i>E. coli</i> O157:H7, <i>Campylobacter</i> , <i>S. aureus</i>
Potenciométrico	Anticorpos	<i>S.typhimurium</i> , <i>E. coli</i> O157:H7, <i>B. subtilis</i> , <i>Y. pestis</i> , <i>Neisseria meningitidis</i> , <i>Brucella melitensis</i>
Impedimétrico	Anticorpos, receptores de proteína A	<i>Salmonella</i> , <i>Proteus vulgaris</i>
Piezoelétrico tipo QCM	Anticorpos, receptores de proteína A	<i>Vibrio cholerae</i> , <i>S. enteritidis</i> , <i>S. typhimurium</i> , <i>Listeria monocytogenes</i> , <i>Candida albicans</i> , <i>Campylobacter</i> , <i>E. coli</i> , <i>Shingella dysenteriae</i> , <i>Yersina pestis</i> , <i>Proteus</i> , <i>Serratia</i> , <i>Klebsiella</i>
Piezoelétrico tipo SAW	Anticorpos	<i>E. coli</i> , <i>Legionella</i> , <i>Salmonella</i>
Nanoeletromecânico	Anticorpos	<i>E. coli</i> O157:H7
SPR	Anticorpos	<i>E. coli</i> O157:H7, <i>Salmonella enteritidis</i> , <i>Listeria monocytogene</i> , <i>B. subtilis</i>
Bioluminescência	Anticorpos	<i>S. aureus</i> , <i>Mycombacterium avium</i> , <i>M.paratuberculosis</i> , <i>Salmonella</i> , <i>Listeria</i>
Imunofluorescência	Anticorpos	<i>S. typhimurium</i> , <i>Yersinia</i> , <i>V. Cholerae</i> , <i>E. coli</i>
Óptico	Anticorpos	<i>Samonella typhimurium</i>
Fibra óptica	Anticorpos	<i>E. coli</i> O157:H7, <i>S. aureus</i>

Fonte: adaptado de VENUGOPAL, 2002; VELASCO-GARCÍA & MOTTRAM, 2003; NEVES, 2011.

Quadro III.1. 3 – Biossensores utilizados na indústria de alimentos para a detecção de toxinas.

Sistema de Transdução	Elemento de Reconhecimento	Toxina	Origem
Onda	Anticorpos	Enterotoxina A, estafilocócica	Bacteriana
SPR, Fibra óptica, piezoelétrico	Anticorpos	Enterotoxina B	Bacteriana
Fibra óptica	Anticorpos	Toxina A de <i>Clostridium botulinum</i>	Bacteriana
QCM, Onda	Anticorpos, receptores (gangliosídios)	Toxina colérica	Bacteriana
QCM	Anticorpos	Enterotoxina termolábil de <i>E. coli</i>	Bacteriana
SPR	Anticorpos	Micotoxina de <i>Fusarium</i> e <i>Aspergillus</i> (fumisina B1 e aflatoxina B1)	Fúngico
SPR	Anticorpos	Fumisina	Fúngico
Biossensor fluorimétrico de imunoafinidade, Fibra óptica	Anticorpos	Aflatoxinas	Fúngico
Eletroquímico	Canais de Sódio	Toxinas paralizantes	Marinho
QCM	Anticorpos	Ácido okadoico	Marinho
Eletroquímico	Anticorpos	Ácido okadoico, brevetoxina	Marinho

Legenda: QCM (Micro balança piezoelétrica de cristal quartzo); SPR (Ressonância Plasmônica de Superfície).

Fonte: adaptado de RUMAYOR et al., 2005; NEVES, 2011.

Quadro III.1. 4 – Biossensores utilizados na indústria de alimentos para a detecção de aditivos alimentares.

Sistema de Transdução	Elemento de Reconhecimento	Tipo de Interação	Analito
Amperométrico	carboxil esterase e álcool oxidase	Biocatalítico	Aspartame
Amperométrico	carboxilpeptidase e L-aspartase	Biocatalítico	Aspartame
Amperométrico	Peptidase, aspartato, aminotransferase e glutamato oxidase	Biocatalítico	Aspartame
Amperométrico	A-quimotripsina, álcool oxidase	Biocatalítico	Aspartame
Amperométrico	Sorbitol desidrogenase	Biocatalítico	Sorbitol
Amperométrico	Tirosinase	Biocatalítico	Ácido benzóico
Amperométrico	Sulfito oxidase	Biocatalítico	Sulfitos

Fonte: adaptado de RUMAYOR et al., 2005; NEVES, 2011.

Ademais, além dos exemplos de biossensores aplicados às indústrias de alimentos, também podem ser relacionados alguns tipos de biossensores que utilizam especificamente a lipase (biocomponente do presente trabalho), como observados no Quadro III.1.5.

Quadro III.1. 5 – Biossensores a base de lipase, como biocomponente (continua).

Enzima	Imobilização	Sistema de transdução	Substrato (analito)	Linearidade	Tempo de resposta	Condições operação	Referência
Lipase pancreática	Silica porosa cristalina ( $\rho$ -type 100)	Potenciométrica	Tributirina	5 a 40 mM	15mim	Tampão fosfato pH 7,0/ 0,1M	Reddy et al., 2001 Reddy et al., 2003
Lipase de <i>Candida rugosa</i>	Silica porosa cristalina ( $n^{\circ}$ -type 100)	Potenciométrica	Tributirina	0 a 0,027 mol/dm <sup>3</sup>	-	Tampão fosfato de sódio Faixa de pH 3 a 8 20mM	Setzu et al., 2007
Lipase, Glicerol quinase, glicerol 3-fosfato oxidase	Membrana de álcool polivinílico (PVA)	Amperométrico	Trioleína	0,56 a 2,25 mM	15 mim	Tampão fosfato de sódio pH 7,0 0,1M 25°C	Pudir et al., 2010
Lipase <i>Pseudomonas capacia</i>	Silica porosa cristalina ( $\rho$ -type 100)	Potenciométrica	Tributirina	1 a 10mM	20 mim	Tampão fosfato pH 7 1mM	Fernandez et al., 2009
Lipase	Silica gel	Potenciométrica	Tributirina	5 a 15 mM	30 min	Tampão fosfato pH 7	Baus et al., 2005

Fonte: MELO, 2012.



Quadro III.1.5– Biossensores a base de lipase, como biocomponente (continuação).

Enzima	Imobilização	Sistema de transdução	Substrato (análito)	Linearidade	Tempo de resposta	Condições operação	Referência
Lipase pancreática, Glicerol quinase ( <i>Cellulomanas sp</i> ), glicerol 3-fosfato oxidase ( <i>Aerococcus viridans</i> )	Membrana de Acetato celulose	Amperométrico	Trioleína	0,2 a 3,5 mM	15 min	Tampão fosfato pH 6,5 0,1M 37°C	Minakshi e Pundir 2008
Lipase <i>Candida rugosa</i>	Filme sol-gel nano-estruturado CeO <sub>2</sub>	Eletroquímico	Tributirina	50 a 500 mg/dl	-	-	Solanki et al., 2009
Lipase	Nano-tubos de polianilina	Eletroquímico	Tributirina	25 a 300 mg/dl	20 seg.	Tampão fosfato pH 7,4 50 mM	Dhand et al., 2009
Lipase, Glicerol desidrogenase, β-NAD	Nano-partícula de carbono modificada	Eletroquímica	-	0 a 10 mM	-	-	Liao et al., 2008
Lipase	Nano-partículas magnética	Potenciométrica	Trioleína	3 a 30 mM	5 min	Tampão fosfato pH 7,0 10mM	Vijayalakshmi 2008

Fonte: MELO, 2012.

Com isso, pode-se observar, no presente levantamento, que os biossensores utilizados na área de alimentos não estão voltados para qualidade de óleos (somente um para óleo de soja como visto no Quadro III.1.1) e não utilizam como biocomponente a enzima lipase. Assim, o desenvolvimento do biossensor proposto no presente trabalho se torna inovador, mesmo ainda enfrentando alguns desafios, conforme mostrados na Figura III.1.3.

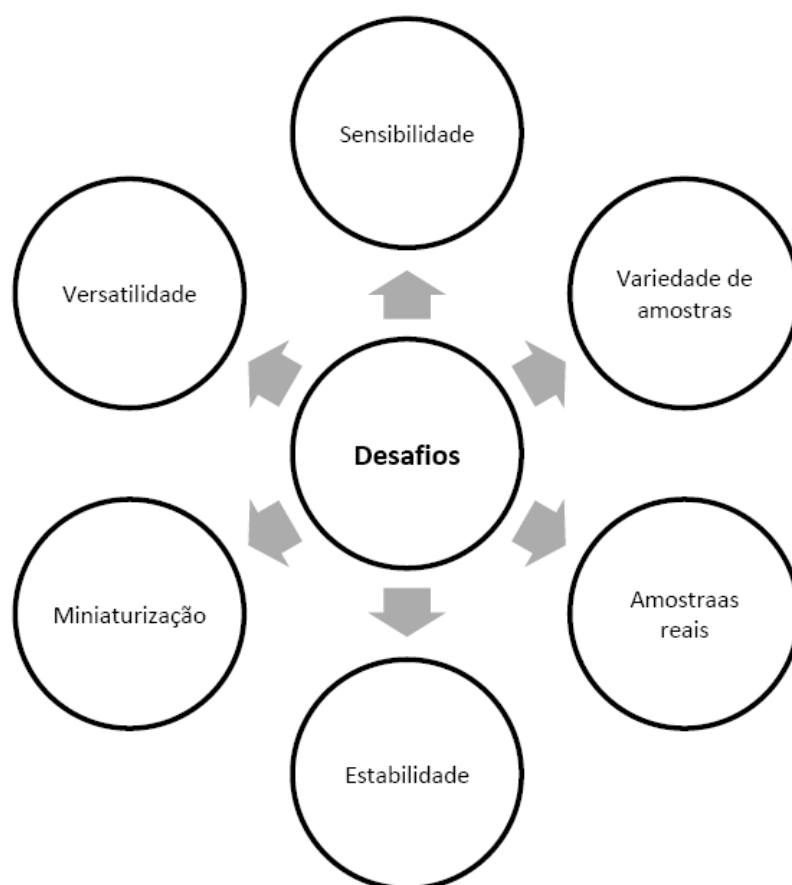


Figura III.1. 3 – Esquema dos principais desafios para a comercialização dos biossensores.

Fonte: SCOGNAMIGLIO et al., 2010 modificado por SILVA, 2011.

Tais desafios são enfrentados quando se busca a comercialização dos biossensores, fazendo com que os mesmos não fiquem restritos a área de pesquisa e desenvolvimento. Assim, o crescente desenvolvimento de biossensores miniaturizados vem ampliar e muito o campo de aplicação e uso destes instrumentos e, futuramente, acredita-se que com os “novos elementos” e com o aperfeiçoamento dos biossensores existentes, a falta de credibilidade, que atualmente ainda existe no Brasil, segundo o Professor Doutor Lauro Kubota (Unicamp *apud* SILVA, 2011), para o uso destes instrumentos para aplicações industriais, deixe de ser um grande problema.

### III.2 – Lipases

As lipases são enzimas classificadas como hidrolases (glicerol éster hidrolases, E.C. 3.1.1.3) e atuam sobre a ligação éster de vários compostos, sendo os acilgliceróis seus melhores substratos. Porém, tais componentes são capazes de catalisar as reações de hidrólise e as reações de síntese (esterificação, transesterificação e interesterificação), conforme Figura III.2.1, que são possíveis de controlar pelo equilíbrio da atividade de água presente na mistura da reação (VILLENEUVE et al., 2000). São comumente encontradas na natureza, podendo ser obtidas a partir de fontes animais, vegetais e microbianas. As lipases podem ter massa molecular variando de 20 a 75 kDa, atividade em pH na faixa entre 4 a 9 e em temperaturas variando desde a ambiente até 70°C. Lipases são usualmente estáveis em soluções aquosas neutras à temperatura ambiente apresentando, em sua maioria, uma atividade ótima na faixa de temperatura entre 30 e 40°C. Contudo, sua termoestabilidade varia consideravelmente em função da origem, sendo as lipases microbianas as que possuem maior estabilidade térmica. (CASTRO *et al.*, 2004).

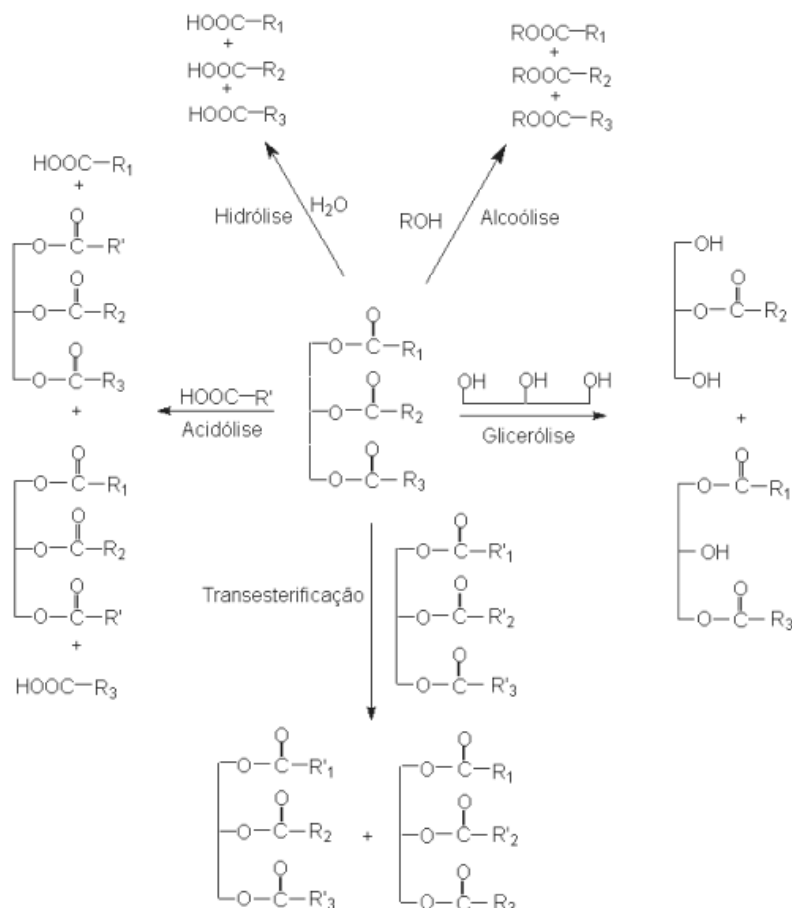


Figura III.2. 1– Reações catalisadas pela lipase.

Fonte: CASTRO, 2004.

As lipases catalisam uma série de diferentes reações mostradas na Figura III.2.1, além de quebrar as ligações de éster de triacilgliceróis com moléculas de água (hidrólise), conforme reação mostrada na Figura III.2.2. Para aplicação industrial, a especificidade da lipase é um fator de máxima importância. A enzima pode ser específica com relação à molécula ácida ou alcoólica do substrato. As lipases são divididas em 3 grupos baseados em sua especificidade (não específicas, 1,3 específicas e ácidos graxos específica). Lipases não específicas (produzidas por *Candida rugosa*, *Staphylococcus aureus*, *Chromobacterium viscosum* e *Pseudomonas* sp., dentre outros), que é a lipase utilizada no estudo, quebram as moléculas de acilglicerol na posição randômica, produzindo ácidos graxos livres, glicerol, monoacilgliceróis e diacilgliceróis como intermediários. Neste caso, os produtos são similares àqueles produzidos por catálise química, porém com menor grau de termodegradação, devido à temperatura na biocatálise ser bem inferior. (CASTRO; MENDES; SANTOS, 2004).

Existe uma vasta aplicabilidade das lipases em diversos processos podendo ser usadas na composição de detergentes, indústria alimentícia e têxtil, produção de papel, tratamento de efluentes entre outras aplicações como pode ser observado no Quadro III.2.1 (JAEGER & REETZ, 1998).

Quadro III.2. 1 - Aplicações de lipases conforme o tipo de reação catalisada e as áreas de aplicação.

Tipos de Reações	Áreas de Aplicação	Aplicações	Produtos
Hidrólise	Alimentos (laticínios)	Hidrólise de gorduras do leite	Agentes flavorizantes para queijos e derivados
Hidrólise	Química (processamento de óleo)	Hidrólise de óleos e gorduras	Ácidos graxos, diglicerídeos, monoglicerídeos (emulsificantes, reagentes para análise de lipídios)
Hidrólise	Química (detergentes)	Remoção de manchas de óleos	Detergentes de uso em lavanderias e domésticos
Hidrólise	Medicina	Dosagem de triglicerídeos no sangue	Kits para diagnósticos
Esterificação	Indústria fina geral	Síntese de ésteres	Intermediários quirais ésteres, emulsificantes
Esterificação	Indústria alimentícia	Esterificação ou transesterificação	Óleos ou gorduras, flavorizantes e na produção de aromatizantes
Esterificação	Indústria farmacêutica	Síntese de intermediários em medicamentos	Antiinflamatórios (naproxeno, ibuprofeno, cetoprofen, suprofen)
Transesterificação	Indústria fina	Transesterificação em óleos vegetais	Produção de Biodiesel

Fonte: adaptado de DURLI, 2007.

### III.3 – Gergelim

O gergelim (*Sesamum indicum* L.), da família Pedaliaceae (Figura III.3.1), é a mais antiga oleaginosa conhecida. Essa espécie, de distribuição tropical e subtropical, é tolerante à seca, e sua produção é proveniente de pequenos e médios agricultores, exercendo, portanto, uma apreciável função social (LAGO; CAMARGO; SAVY FILHO, 2001).



Figura III.3. 1 – Gergelim (*Sesamum indicum* L.).

Fonte: site AGEITEC.

O gergelim tem despertado o interesse de novos produtores e empresários brasileiros que buscam uma cultura alternativa para alimentação e exploração agrícola viável. É um alimento de alto valor nutricional, rico em óleo e proteínas. A torta obtida da prensagem dos grãos se constitui em excelente concentrado para alimentação animal. A casca é usada para adubação do solo. Devido a sua tolerância a seca e facilidade de cultivo, apresenta alto potencial agrônômico podendo ser usado em rotação e sucessão de culturas, consorciado com algodão, funciona como cultura armadilha para mosca branca e para controle de formigas cortadeiras. É uma cultura que se insere tanto nos tradicionais sistemas de cultivo como na agricultura sustentável e orgânica (EMBRAPA, 2006).

O grão é usado principalmente na indústria de panificação, de biscoitos e confeitos e de cereais matinais. Além de fins alimentares, seus grãos encontram diversas aplicações na indústria farmacêutica, cosmética e óleo-química. O óleo também é aproveitado para cosméticos, massoterapia, em laboratórios e em farmácias de manipulação. O teor de óleo encontrado no gergelim e em outras oleaginosas pode ser observado na Tabela III.3.1.

Tabela III.3. 1– Conteúdo de óleos em material oleaginoso.

<b>Material oleaginoso</b>	<b>Conteúdo de óleo (%)</b>
Gergelim	50-55
Polpa de palma	45-50
Caroço de palma	45-50
Amendoim	45-50
Colza	40-45
Girassol	35-45
Oliva	25-30
Farelo de arroz	20-30
Soja	18-20

Fonte: CERT, MOREDA & PÉREZ-CAMINO, 2000.

Segundo EMBRAPA (2012), o gergelim é rico em sais minerais, como cálcio, ferro, fósforo, potássio, zinco e selênio. Também são encontradas vitaminas A, C e do complexo B e niacina. É fonte de proteínas, fibras e lipídios, além de ter ômega 3, 6 e 9.

O Brasil é considerado um país importador de gergelim. Os principais produtores são Índia, África do Sul, China, Paraguai, Bolívia, Venezuela, México e

Guatemala. No Brasil, o gergelim é cultivado principalmente no Nordeste do país – Ceará, Rio Grande do Norte, Paraíba e Bahia – e no Centro-Sul; no Estado de São Paulo, o gergelim é plantado a mais de 40 anos para a produção de óleo e uso em indústrias, em restaurantes e em casas de comida natural. O consumo interno médio é de 10.000 toneladas por ano, sendo que o país importa em torno de 50% desse total (CARVALHO et al., 2001).

### III.4 – Óleos

Os óleos vegetais podem ser classificados de várias maneiras, sendo uma delas a classificação por composição de ácidos graxos. A lista dos ácidos graxos naturais é superior a 1000, mas os de interesse comercial estão limitados a um menor número, talvez cerca de 20. Nos óleos vegetais três ácidos graxos são dominantes: palmítico, oléico, linoléico e por vezes acompanhado de ácido esteárico e pelo ácido linolênico. Os outros, que ocorrem em óleos especiais, incluem o mirístico, láurico, erúico, hexadecenóico, ácido  $\gamma$ -linolênico, eleostearico e isômeros, ricinoléico e vernólico, como observado no Quadro III.4.1.

Quadro III.4. 1 – Grupos de óleos vegetais por tipo de ácido graxo predominante.

<b>Ácido Graxo</b>	<b>Óleo Vegetal</b>
Láurico	Azeite de dendê e coco
Palmítico	Óleo de Palma e algodão
Oléico / Linoléico	Óleo de amendoim, cártamo, gergelim, girasol, algodão, canola, soja
Alto Oléico	Azeite de oliva, óleo de cártamo, girassol, canola, amendoim, soja
Linolênico	Óleo de linhaça, canola e soja
Gordura vegetal	Coco
Ácido Conjugado	Óleo de calêndula

Fonte: adaptado de FUENTES, 2011

Os óleos vegetais são constituídos principalmente de triglicerídeos (95-98%) e uma mistura de componentes menores (2-5%) de uma vasta série de compostos químicos. Os componentes menores apresentam uma ampla composição qualitativa e quantitativa, dependendo da espécie vegetal de que foram obtidos. Entretanto, em uma mesma espécie o conteúdo e a composição destes componentes podem variar devido às condições climáticas e agrônômicas, qualidade da matéria-prima, método de extração e

procedimentos de refino. Finalmente, durante a estocagem do óleo, a hidrólise, esterificação e oxidação também originam variações nos mesmos. Os principais grupos dos componentes menores presentes nos óleos vegetais são: hidrocarbonetos, ceras, álcoois, componentes fenólicos voláteis, fosfolipídios, pigmentos, tocoferóis, tocotrienóis e ácidos triterpênicos (CERT, MOREDA & PÉREZ-CAMINO, 2000).

Segundo Sarmiento (2002), os óleos vegetais são obtidos principalmente de sementes oleaginosas, da polpa de alguns frutos e germe de cereais.

“Os componentes mais expressivos dos óleos e gorduras são os triglicerídeos e suas propriedades físicas dependem da estrutura e distribuição dos ácidos graxos presentes” (CASTRO; MENDES; SANTOS, 2004). A estrutura básica dos óleos e gorduras pode ser redesenhada, por meio da modificação química dos ácidos graxos (hidrogenação), pela reversão da ligação éster (hidrólise) e reorganização dos ácidos graxos na cadeia principal do triglicerídeo (interesterificação) (CASTRO; MENDES; SANTOS, 2004).

O Instituto Adolfo Lutz (1985) preconiza que a determinação de acidez pode fornecer um dado valioso na apreciação do estado de conservação de um produto alimentício. A decomposição dos glicerídeos é acelerada por aquecimento e pela luz, sendo a rancidez quase sempre acompanhada pela formação de ácidos graxos livres. Os métodos de determinação da acidez podem avaliar a acidez titulável ou fornecer a concentração de íons de hidrogênio livres, por meio do pH. Os métodos que avaliam a acidez titulável resumem-se em titular com soluções de alcali padrão a acidez do produto ou de soluções aquosas ou alcoólicas do produto e, em certos casos, os ácidos graxos obtidos dos lipídios. Pode ser expressa em mL de solução molar por cento ou em gramas do componente ácido principal.

As sementes de gergelim apresentam alto teor de óleo, conforme visualizado na Tabela III.3.1. Este óleo possui grande resistência à rancificação devido a presença de compostos fenólicos como o sesamol e tocoferóis. Após a extração do óleo, obtém-se o farelo desengordurado, o qual apresenta alto teor protéico e de fibras, podendo ser utilizado como fonte alternativa de proteínas e energia para grupos humanos (CORSO, 2008).



### III.5 – Óleo de Gergelim

O óleo de gergelim é pouco alterável pelo ar, fluido, aromático e agradável. É apreciado para diversas finalidades na culinária e até preferido ao óleo de oliva por muito consumidores nas saladas e maioneses (MORETTO & FETT, 1998).

Segundo EMBRAPA (2006), o óleo de gergelim apresenta *flavour* característico e agradável e maior estabilidade oxidativa, quando comparado com a maioria dos óleos vegetais, por causa de sua composição em ácidos graxos e pela presença de antioxidantes naturais. Estudos recentes mostraram que o óleo de gergelim pode baixar os níveis de colesterol e hipertensão em humanos (SANKAR et al., 2004) e reduz a incidência de certos cânceres (MIYAHARA et al., 2001). Ainda segundo WERE et al. (2006), os efeitos observados na saúde têm sido atribuídos a composição química do óleo caracterizado por nível baixo de ácidos graxos saturados e a presença de antioxidantes. E com o conhecimento crescente dos benefícios a saúde, a demanda de mercado do gergelim e do óleo provavelmente irá aumentar.

A rancificação oxidativa ocorre em lipídios que contêm ácidos graxos insaturados e que podem sofrer oxidação, degradação e polimerização por mecanismos de radicais livres. A fim de impedir ou retardar a deterioração oxidativa, os antioxidantes foram extensamente utilizados. Podem agir como sequestradores de radicais livres, redutores de oxigênio e como quelantes de metais pro-oxidantes, sendo os mais utilizados, o hidroxibutiltolueno (BHT), o butilhidroxianisol (BHA) e o tercibutilhidroquinona (TBHQ). Porém, estes quelantes sintéticos podem ocasionar danos à saúde, portanto uma atenção especial está sendo dada para os antioxidantes naturais.

O sesamol (3,4-metilenodioxifenol) é um composto orgânico natural presente no óleo de gergelim. Caracteriza-se como um sólido cristalino branco derivado do fenol. É solúvel em água, mas miscível na maioria dos óleos, e além das propriedades antioxidantes, apresenta-se também como antifúngico (CORSO, 2008). Sua estrutura pode ser observada na Figura III.5.1.

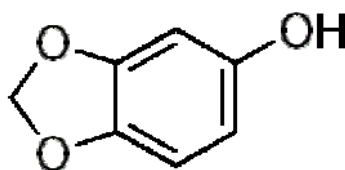


Figura III.5. 1– Estrutura molecular do sesamol.

Fonte: CORSO, 2008.

Além do sesamol, encontra-se presente no óleo de gergelim também o tocoferol, que segundo Ramalho & Jorge (2006), por ser um dos melhores antioxidantes naturais, é amplamente aplicado como meio para inibir a oxidação dos óleos e gorduras comestíveis, prevenindo a oxidação dos ácidos graxos insaturados. A atividade antioxidante dos tocoferóis é principalmente devida à capacidade de doar seus hidrogênios fenólicos aos radicais livres lipídicos interrompendo a propagação em cadeia. Sua estrutura pode ser visualizada na Figura III.5.2.

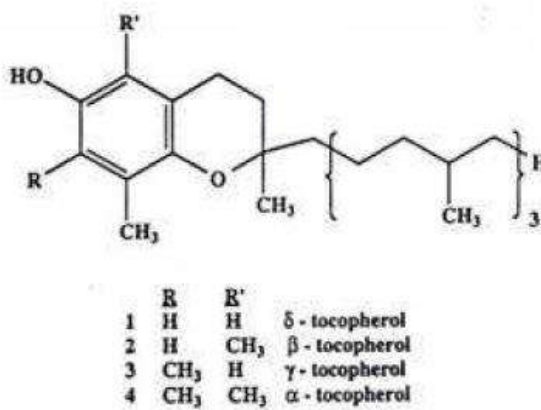


Figura III.5. 2 – Estrutura molecular do tocoferol.

Fonte: CORSO, 2008.

### III.6 – Estabilidade Oxidativa de Óleos

Segundo Frank, Geil & Freaso (1982), as alterações nos óleos e gorduras e dos produtos que os contêm devem-se, principalmente, a processos químicos e/ou enzimáticos, podendo ser detectadas ou percebidas sensorialmente, ainda em estágios

iniciais. Os processos bioquímicos dependem da umidade, da atividade enzimática e da presença de microorganismos, enquanto que os processos químicos, chamados de autooxidação e de fotooxidação, ocorrem com intervenção de oxigênio, dependendo, segundo Nawar (1985), da presença de insaturação nos ácidos graxos, luz, temperatura, presença de antioxidantes e de pró-oxidantes, entre outros.

O processo de oxidação de lipídios é amplamente estudado, pois conforme St. Angelo (1996), a deterioração oxidativa é responsável pela formação de sabores estranhos que reduzem a qualidade e a vida de prateleira dos mesmos além de produzir compostos com implicações nutricionais. Os métodos de determinação da estabilidade oxidativa surgiram numa tentativa de prever a vida de prateleira de óleos e gorduras, pois o acompanhamento das alterações ocorridas nestes produtos, nas condições de armazenamento, é lento e pode consumir grande quantidade de reagente. Portanto, para avaliar a estabilidade oxidativa ou a sua suscetibilidade à oxidação, o óleo pode ser submetido a testes de oxidação acelerada, sob condições padronizadas e um ponto final é escolhido, no qual se observam sinais de deterioração oxidativa. Para se acelerar a oxidação, o aquecimento tem sido o meio mais utilizado e eficiente (ANTONIASSI, 2001).

De acordo com Frankel (1993) as análises de índice de peróxido, dienos conjugados e valor de carbonila, utilizadas para acompanhar a evolução da oxidação nos métodos acelerados em alta temperatura, apresentam valor questionável, pois os peróxidos se decompõem rapidamente em temperatura elevada. A avaliação sensorial é a mais útil e sensível para se monitorar a oxidação, mas é também altamente dependente do treinamento da equipe sensorial e os resultados variam muito de uma equipe para outra.

O uso de métodos acelerados pode ser criticado, porque o mecanismo de oxidação é diferente em altas temperaturas e os resultados não refletirão necessariamente a estabilidade ou qualidade dos óleos em condições normais de estocagem. No entanto, a avaliação de estabilidade oxidativa em temperatura mais baixa implica em monitoramento constante por longo período, demandando trabalho e grande consumo de reagentes. O benefício obtido também é discutível, pois foram observados

resultados conflitantes, dependendo da análise ou das condições de estocagem utilizadas (ANTONIASSI, 2001).

Portanto, o desenvolvimento de um biossensor para detecção da qualidade de óleos teria como vantagens uma análise mais precisa, rápida, barata e que poderia ser realizada de forma simples com um mínimo treinamento.

## Capítulo IV – Materiais e Métodos

Tem como intuito descrever as metodologias e materiais utilizados para o desenvolvimento do presente trabalho.

### IV.1 – Óleo de Gergelim Comercial

O óleo de gergelim possui na sua fórmula sesamol, propriedade antioxidante que dá ao óleo uma elevada estabilidade e age contra radicais livres no organismo humano. Pode-se também observar a partir do rótulo do produto (Figura IV.1.1) as informações nutricionais deste óleo comercial.

**Óleo de Gergelim Bruto**

**Informação Nutricional**  
porção de 13 ml (1 colher de sopa)

	Quantidade por porção	%VD(*)
Valor Calórico	120 kcal/ 503 kJ	6 %
Carboidratos	0 g	0 %
Proteínas	0 g	0 %
Gorduras Totais	14 g	25 %
Gorduras Saturadas	1,9 g	9 %
Linoléico (Ômega 6)	6 g	**VD
Oléico (Ômega 9)	5 g	**VD
Gorduras Trans	0 g	**VD
Fibra Alimentar	0 g	**VD
Sódio	0 mg	0 %

\*Valores Diários de Referência com base em uma dieta de 2.000 kcal ou 8.400 kJ. Seus valores diários podem ser maiores ou menores dependendo de suas necessidades energéticas.  
\*\*Valores Diários não estabelecidos

Figura IV.1. 1 - Informações nutricionais contidas no rótulo do óleo de gergelim comercial da marca Pазze

## IV.2 – Preparação da Emulsão

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

## IV.3 – Biocomponente (Lipase Comercial)

Para os testes, utilizou-se a lipase comercial de *Candida rugosa* tipo VII (marca Sigma-Aldrich). Utilizou-se 1mL de extrato enzimático na concentração de 0,1g/mL (0,1g da enzima comercial para 1mL de tampão fosfato de potássio 50mM pH 7,0), para os ensaios com a enzima livre, e, para os ensaios utilizando a enzima imobilizada, foi utilizado 1g da enzima imobilizada.

### IV.3.1 – Processo de imobilização da lipase

A imobilização utilizada neste trabalho consistiu na ligação covalente entre a lipase e o suporte vítreo (pérolas de vidro aminopropil com tamanho de poro de 700 Å/ 80-120µm) (marca Sigma-Aldrich) mostrado na Figura IV.2.1.1. O suporte selecionado sofreu o processo de silanização com 3-amino-propiltrióxissilano (APTS) e a ativação com glutaraldeído.



Figura IV.2.1. 1 – Suporte vítreo utilizado.

Fonte: MELO, 2008.

Inicialmente, o suporte foi protonado utilizando solução de ácido nítrico 10% (v/v) durante 30 minutos a temperatura ambiente ( $24\pm 1^\circ\text{C}$ ) na proporção de 30mL de solução por grama de suporte. Posteriormente, o suporte foi lavado com água ultra pura e em sequência com soluções aquosas de acetona a 25%, 50%, 75% e 100% (v/v) sequencialmente, na proporção de 10mL por grama de suporte. Finalmente, o suporte foi colocado na estufa, a  $40^\circ\text{C}$ , por 1 hora. A silanização foi realizada com solução de 3-amino-propiltriétoxissilano (APTS) na concentração de 0,5% (v/v) a  $75^\circ\text{C}$  por 3 horas, na proporção de 12 mL de solução por grama de suporte. Após este tempo, o suporte foi lavado e secado novamente, como descrito anteriormente, e submetido ao processo de ativação com solução de glutaraldeído a 2,5% (v/v) em solução tampão fosfato de sódio (100mM, pH 7,0) por 60 minutos a  $23^\circ\text{C}$ , na proporção de 12,5mL de solução por grama de suporte. Com o suporte pré-ativado, foi adicionada a solução de lipase, utilizando lipase comercial (1g) em 100 mL de solução tampão fosfato de potássio (50mM, pH 7,0), e incubados a  $20^\circ\text{C}$  por 24 horas. As reações que ocorrem durante o processo podem ser observadas na Figura IV.2.1.2.

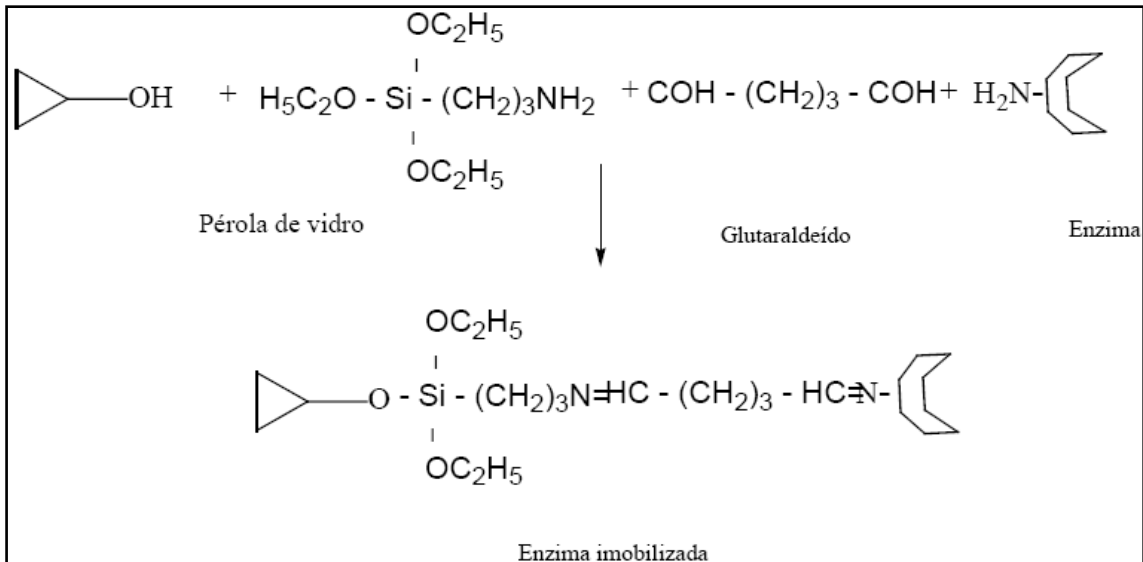


Figura IV.2.1. 2 – Descrição química da reação no processo de imobilização

Fonte: MELO, 2008.

Ao longo do processo, foi determinada a atividade enzimática do sobrenadante utilizando o método titulométrico (Item IV.3). Ao final da imobilização, a atividade da enzima imobilizada foi medida pelo mesmo método.

#### IV.4– Determinação da Atividade Lipásica

Para as análises de atividade enzimática, foi utilizado o método de titulação, segundo o procedimento descrito por Soares et al. (1999), utilizando 9mL de emulsão (óleo de gergelim + Tween + solução tampão fosfato de potássio 100mM, pH 8,75) e 1mL ou 1g de enzima. O ensaio é realizado utilizando agitação magnética, a 37°C durante 15 minutos. Após este tempo, a reação foi paralisada pela adição de 10mL de uma mistura de água, acetona e etanol (1:1:1, v/v/v), conforme esquema mostrado na Figura IV.3.1.



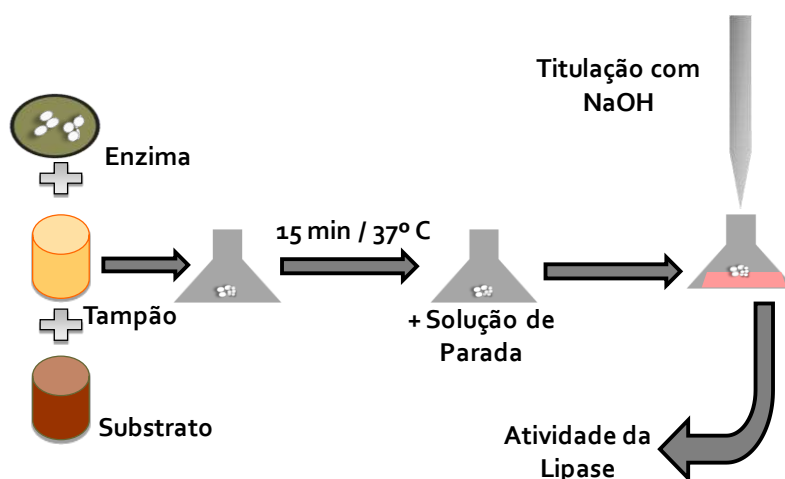


Figura IV.3. 1 – Esquema da medida da atividade enzimática.

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

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

#### IV.5 – Extração do Óleo de Gergelim

O óleo de gergelim foi extraído utilizando os grãos de gergelim (marca ArmaZen) adquiridos em mercado local e submetidos a prensagem, utilizando uma prensa contínua do tipo rosca sem fim (expeller) (marca IBG Monforts, modelo CA 590), a temperatura aproximada de 23°C. Este procedimento foi realizado no Laboratório de Processamento de Matérias-Primas Vegetais / Escola de Química / EQ da Prof.<sup>a</sup> Suely Pereira Freitas.

## IV.6 – Métodos de Degradação do Óleo de Gergelim

Com o óleo de gergelim recém-extraído, foi testado o ensaio de estabilidade oxidativa utilizando o equipamento Rancimat modelo 743 (marca Mettler), em modo automático (atividade realizada em colaboração com o Laboratório de Análises de Biocombustíveis e Derivados de Petróleo - LABIPETRO - Instituto de Química/UFRJ). Com uso do equipamento, foi possível expor as amostras a condições oxidantes como presença de oxigênio. Para a execução dos ensaios, foram realizadas análises em triplicatas, com as seguintes condições de análise: tipo de atmosfera – ar; vazão de borbulhamento do ar: 10L/h; temperatura – 110°C; massa de amostra –  $3 \pm 0,013$ g.

Com o óleo de gergelim comercial, primeiramente, foi feita a degradação em câmara escura UV (marca Biotec<sup>®</sup>) utilizando os comprimentos de onda 254 e 365nm durante uma hora. Em seguida, houve exposição do óleo utilizando somente o comprimento de 365nm por 180 horas. Em seguida, testou-se a degradação através da combinação da câmara a 365nm durante 6 horas com tratamento térmico em banho-maria (marca Solab SL 150/10), a 50°C por mais 6 horas, com as 12 horas seguintes em temperatura ambiente e sem a presença de luz, ficando assim por 45 dias.

Outra tentativa de ensaio de degradação do óleo comercial foi a utilização do tratamento térmico utilizando uma placa de aquecimento (marca Marconi MA085), primeiramente a 160°C, colocando 6 horas em aquecimento e 18 horas em temperatura ambiente ( $24 \pm 1$ °C) até apresentar mudança visível na coloração do óleo (característico da sua degradação, totalizando ao final 40 horas de aquecimento). Posteriormente, a 175°C, colocando o óleo em aquecimento por 1 hora, deixando 23 horas em temperatura ambiente e sendo retirada uma amostra e analisando o grau de degradação do óleo, obtendo-se desta forma 7 horas de degradação.

### IV.6.1 – Preparação da Amostra Real do Óleo de Gergelim Degradado por Fritura

Para a amostra real de óleo de gergelim degradado, foi realizada a fritura da batata congelada na forma de palitos (marca McCain) adquirida no comércio local. As frituras

foram feitas da seguinte maneira: primeiramente, deixou-se o óleo aquecer (o que levou em média 1 minuto e 30 segundos) e, em seguida, foram retiradas seis batatas palito do freezer e colocadas diretamente para fritura no óleo pré-aquecido. O processo de fritura (Figura IV.5.1.1) ocorreu até as batatas ficarem aptas para o consumo durou em média 6 minutos em chama média do fogão (temperatura média de 191°C). Esta operação foi repetida cinco vezes.

As cinco amostras reais (1 por cada fritura realizada) foram analisadas com o biossensor enzimático desenvolvido e determinado o índice de acidez.



Figura IV.5.1. 1 – Procedimento de fritura das batatas com óleo de gergelim comercial.

#### IV.7 – Índice de Acidez

O índice de acidez é definido como o número de miligramas de hidróxido de potássio necessário para neutralizar um grama de amostra (INSTITUTO ADOLFO LUTZ,1985). O método avalia a acidez titulável, visando titular, com solução de álcali-padrão, a acidez do produto ou solução aquosa/alcoólicas do produto, assim como os ácidos graxos obtidos. Para a realização do método, as amostras devem estar bem homogêneas e completamente líquidas.

Inicialmente, foi pesado 2,00 gramas da amostra de óleo em balança analítica (marca Shimadzu - modelo AUY220) em frasco erlenmeyer de 125mL. Em seguida, foram adicionados 25mL de solução de éter e álcool (2:1 v/v) neutra e adicionadas duas gotas do indicador fenolftaleína. Para a titulação, foi utilizado hidróxido de sódio (0,01M) até o aparecimento da coloração rosa, a qual deverá persistir por 30 segundos. Para o cálculo do índice de acidez, foi utilizada a Equação IV.6.1.

$$\text{Índice de acidez} = \frac{V \times f \times 5,61}{P} \quad \text{Equação IV. 6.1}$$

Onde:

V = volume, em mL, de solução de hidróxido gasto na titulação;

f = fator de correção da solução de hidróxido de sódio;

P = quantidade, em gramas, da amostra.

#### IV.8 –Desenvolvimento do Biossensor: Análise Potenciométrica

O desenvolvimento de um biossensor está baseado na ação de um componente biológico sobre o analito de interesse. No caso do presente trabalho, relaciona-se a ação da enzima lipase sobre o óleo de gergelim. Assim, utilizou-se a capacidade do transdutor escolhido (eletrodo íon-seletivo de hidrogênio) de captar a mudança ocorrida com a reação bioquímica esquematizada na Figura IV.7.1, que descreve a ação da lipase na presença de água que atua nos triglicerídeos gerando como produto final glicerol e ácidos graxos livres.

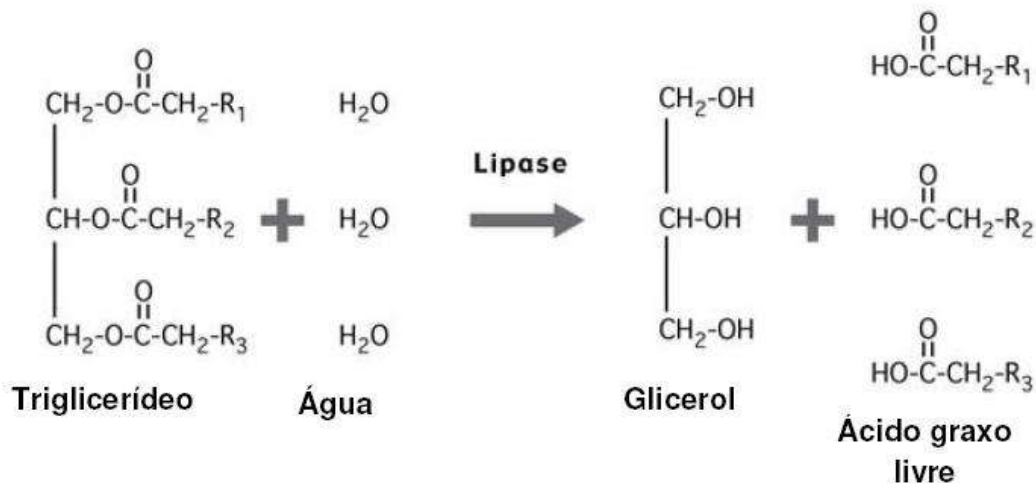


Figura IV.7. 1- Esquema da reação que ocorre pela ação da lipase em um éster.

Fonte: MELO, 2008.

Os ácidos graxos liberados após a reação têm a capacidade de mudar o pH da solução. Assim, o transdutor selecionado tem a sensibilidade de detectar as mudanças que ocorrem e produzem diferença de potencial (mV). As mudanças de pH devem ser logicamente proporcionais à concentração dos ésteres presente na solução (MELO, 2012).

Assim, no presente trabalho, as variações de potencial (mV) foram realizadas com auxílio de um pHmetro da marca Metrohm e um eletrodo íon-seletivo de hidrogênio na construção do biossensor enzimático (Figuras IV.7.2 e IV.7.3). As condições de operação utilizadas foram estudadas e selecionadas por variar a concentração do substrato de 10 a 50% (v/v), utilizando óleo de gergelim: 37°C, por 15 minutos com agitação controlada.

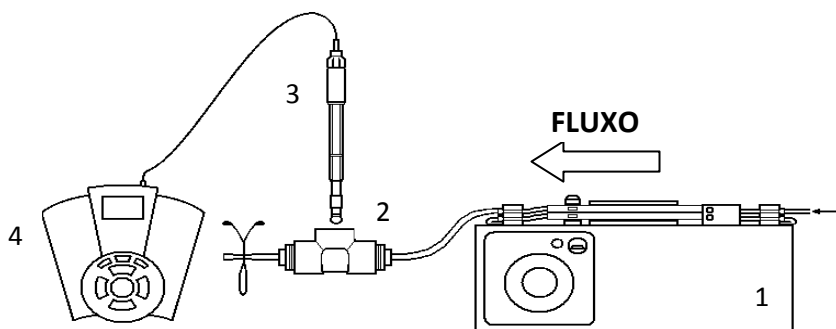


Figura IV.7. 2 – Esquema da análise potenciométrica

Fonte: adaptado de MELO, 2012.



Figura IV.7. 3 - Foto da análise potenciométrica

O sistema, Figura IV.7.2, foi composto de: uma bomba peristáltica (1) como elemento propulsor para o transporte das soluções padrão, amostras e solução de limpeza- solução de Tween 0,5% (v/v) através do sistema de análise; uma câmara reacional (2) com capacidade de 10mL, onde a lipase livre e imobilizada foi acondicionada e diretamente ligada ao eletrodo íon-seletivo de hidrogênio (3), imerso na câmara por um orifício de diâmetro de 1,7cm; e o sistema de transdução (4), ligado ao eletrodo íon seletivo, que apresenta o valor do sinal, em mV, referente as variações detectadas pelo mesmo. O volume total do sistema foi de 15mL e foram usadas mangueiras de silicone para conexão com diâmetro interno de 0,3mm e com 105cm de comprimento.

O mesmo esquema foi utilizado para testar a detecção de concentrações crescentes e decrescentes de substrato. Foram utilizadas as condições de operação: 37°C, por 15 minutos com agitação controlada, 1,0g de enzima imobilizada. Foram feitas emulsões com concentração de 10 a 50% (v/v) e fazendo as leituras no biossensor, primeiramente na ordem crescente (10 a 50% (v/v)) e em seguida na ordem decrescente (50 a 10 % (v/v)) e comparados os valores encontrados de variação de potencial em mV.

## Capítulo V – Resultados e Discussão

O presente capítulo visa apresentar os resultados obtidos ao longo do trabalho, bem como a discussão dos mesmos, comparando com os trabalhos presentes na literatura.

### V.1 – Testes Realizados com o Óleo de Gergelim Comercial (Marca Pazze) e a Enzima Lipase na Forma Livre

Os primeiros testes para avaliar o sistema (agente biológico – transdutor) visando analisar a resposta do mesmo para a elaboração do biossensor enzimático foram realizados com a enzima na forma livre. A Figura V.1.1 apresenta uma curva logarítmica com um bom coeficiente de correlação ( $R=0,982$ ). Assim, observa-se uma relação entre a variação potenciométrica, resposta do eletrodo íon-seletivo de hidrogênio, observada e o aumento da concentração do substrato, durante os 15 minutos de reação, na presença do biocomponente. O coeficiente encontrado indicou uma boa sensibilidade do método.

A partir da Figura V.1.1, foi possível observar que a variação de potencial se comportou de forma logarítmica, em função da atividade da enzima, onde há liberação de íons  $H^+$ , em relação à concentração do substrato (óleo de gergelim), variando na faixa de 10 a 50% (v/v).

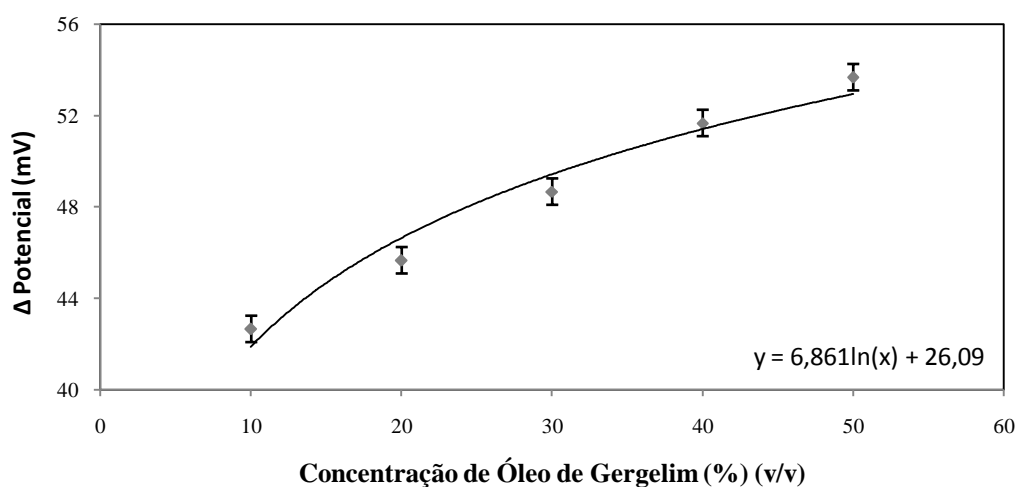


Figura V.1. 1 – Variação do potencial (mV) de acordo com a variação da concentração do óleo de gergelim comercial utilizando a enzima na forma livre.

A fim de garantir que a variação potenciométrica crescente observada na Figura V.1.1 se deu pela ação da enzima lipase, também foi avaliada a atividade enzimática com as mesmas variações de substrato gerando uma resposta positiva como esperado. Como observado na Figura V.1.2, ao se aumentar a concentração do substrato, houve acréscimo da atividade lipásica. Ambas as análises foram desenvolvidas com as mesmas condições: 37°C, 15 minutos e 1mL de extrato enzimático.

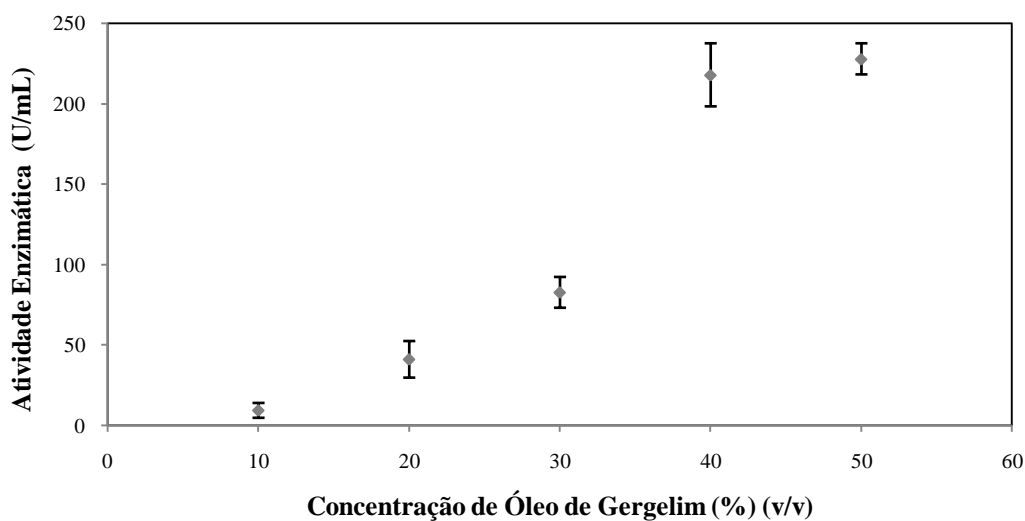


Figura V.1. 2 – Atividade enzimática (U/mL) de acordo com a variação da concentração do óleo de gergelim comercial utilizando a enzima na forma livre.

Devido aos bons resultados, a curva mostrada na Figura V.1.1 foi utilizada como a curva de calibração do biossensor enzimático, ainda usando a enzima livre.

## V.2 – Testes de Degradação do Óleo de Gergelim Comercial (Marca Pazze)

Após a obtenção da curva de calibração do biossensor, foram feitos testes para a detecção da degradação do óleo utilizando luz ultravioleta com os comprimentos de onda de 254nm e 365nm. Os resultados são mostrados na Tabela V.2.1.



Tabela V.2. 1 - Degradação do óleo de gergelim em relação ao comprimento de onda e ao tempo de exposição.

Comprimento de Onda (nm)	Tempo (horas)	Volume de NaOH (mL)	Índice de Acidez (mg KOH/ g de amostra)	$\Delta$ do Potencial (mV)	$\Delta$ Índice de Acidez (mg KOH/ g de amostra)
-	0,0	33,57	9,26	43	-
254	0,5	34,43	9,50	43	0,24
254	1,0	36,30	10,02	36	0,75
365	0,5	34,85	9,62	31	0,35
365	1,0	37,02	10,21	25	0,95

Com os resultados obtidos, foi possível perceber que com o comprimento de onda igual 365nm houve maior variação do índice de acidez, menor variação do potencial e, conseqüentemente, maior degradação do óleo. Esse fato ocorre devido ao comprimento de onda de 365nm ser mais incidente que o de 254nm, uma vez que este último é absorvido pelos gases da atmosfera, enquanto que o primeiro não (OKUNO & VILELA, 2005). A partir daí, o teste de exposição, com 365nm, continuou até um tempo total de 180 horas. Ao final do ensaio, não foi observada nenhuma mudança visual (coloração e aspecto). Porém, detectada a degradação utilizando o biossensor com variação de potencial igual a 9 mV e o índice de acidez não apresentando tanta variação como esperado ficando igual a 11,18mg KOH/g de amostra. Esta degradação se deve ao fato que a luz ultravioleta promove a destruição dos antioxidantes naturais, permitindo a formação de peróxidos (EVANGELISTA, 2002).

Posteriormente, foram feitos testes para simular a exposição do óleo ao Sol, caso o mesmo fosse armazenado ao ar livre. Sendo assim, foram realizados os testes a partir da degradação do óleo de gergelim por meio de luz ultravioleta combinada com o tratamento térmico. Após 45 dias de exposição – colocando 6h de exposição na câmara UV e, no dia seguinte, 6h de exposição ao tratamento térmico a 50°C, não foi observada degradação visualmente, apresentando variação do potencial igual a 35mV e índice de acidez igual 9,6mg KOH/g de amostra. Devido ao tempo em que foi feito o experimento, observou-se boa estabilidade do óleo, o que é corroborado pelo fato dos óleos terem de 6 meses a 1 ano de validade, segundo o regulamento técnico oficial do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), mais especificamente, a Instrução Normativa nº 49, de 22 de dezembro de 2006.

Seguindo as Instruções Técnicas da EMBRAPA (2001) que tratam de fritura de alimentos, foi realizado o teste de degradação do óleo a partir da temperatura média para a fritura, em óleos, de alimentos: 190°C. O primeiro teste foi realizado a 160°C, devido a tal temperatura estar bem próxima da temperatura de fumaça, podendo ocasionar algum acidente no laboratório. Para interromper o ensaio, foi utilizado o critério de observação visual da degradação. Assim, a mudança de cor característica da fritura foi observada após 40 horas de tratamento térmico, conforme visualizado na Figura V.2.1.



Figura V.2. 1 – Mudança de coloração do óleo de gergelim Pazze após 40 horas de tratamento térmico a 160°C. (A) Óleo sem degradação e (B) Óleo degradado.

Após observar a degradação do óleo, foram feitos ensaios de confirmação com o biossensor e o índice de acidez. O teste com o biossensor, utilizando enzima livre, encontrou variação de potencial igual a 5mV. Utilizando a curva de calibração mostrada na Figura V.1.1, inferiu-se que a concentração de óleo sem degradar era de aproximadamente 0,05% (v/v), mostrando assim que o óleo já se encontrava completamente degradado. Ao utilizar o método de índice de acidez, obteve-se um valor de 11,50mg KOH/g de amostra, observando assim um aumento deste índice confirmando que houve a degradação do mesmo.

Finalmente, foram realizados testes visando simular a degradação do óleo, por meio de frituras sucessivas e diárias em um estabelecimento ou residência. Assim, uma amostra do óleo de gergelim, em laboratório, foi aquecida a 175°C por 1 hora, uma vez ao dia. Os resultados encontrados com o biossensor e o índice de acidez são mostrados nas Figuras V.2.2 e V.2.3, respectivamente. Ambas as análises foram feitas em duplicada.

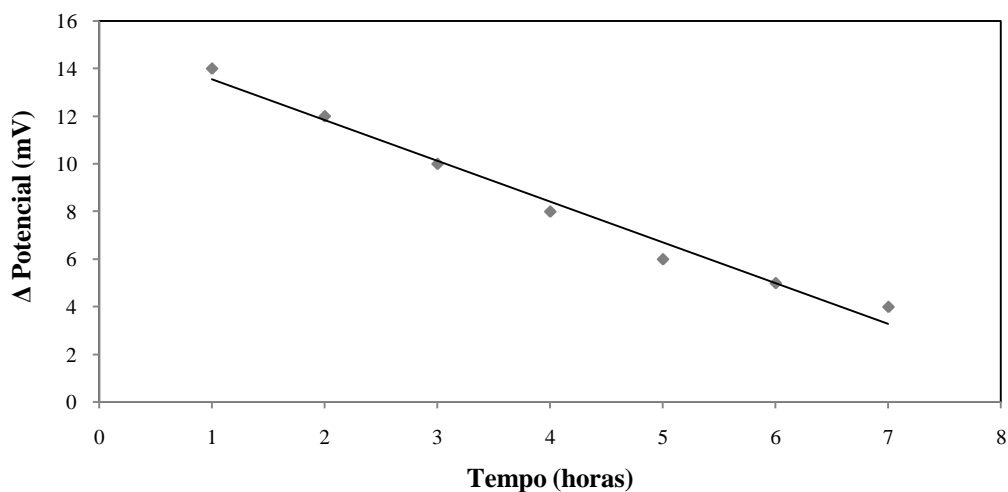


Figura V.2. 2 – Variação do potencial do óleo de gergelim degradado de acordo com o tempo de exposição ao tratamento térmico (175°C).

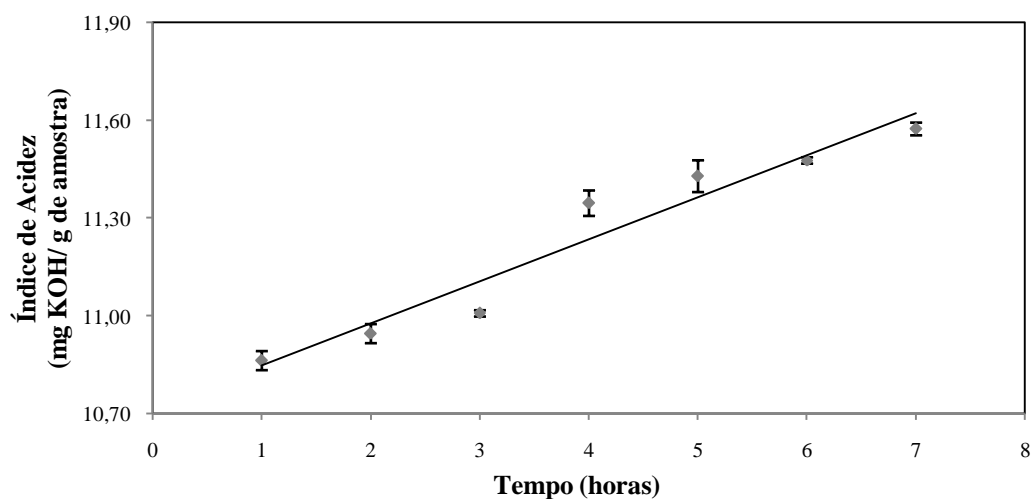


Figura V.2. 3 – Índice de acidez do óleo de gergelim degradado de acordo com o tempo de exposição ao tratamento térmico (175°C).

As Figuras V.2.2 e V.2.3 mostram que houve degradação do óleo de gergelim ao longo do tempo de tratamento térmico, a 175°C, com fatores de correlação igual a 0,991 e 0,969, respectivamente. Assim, observa-se que o biossensor foi capaz de detectar a degradação do óleo, conforme desejado. Assim, através da Figura V.2.4, buscou-se estabelecer uma relação entre os dois métodos.

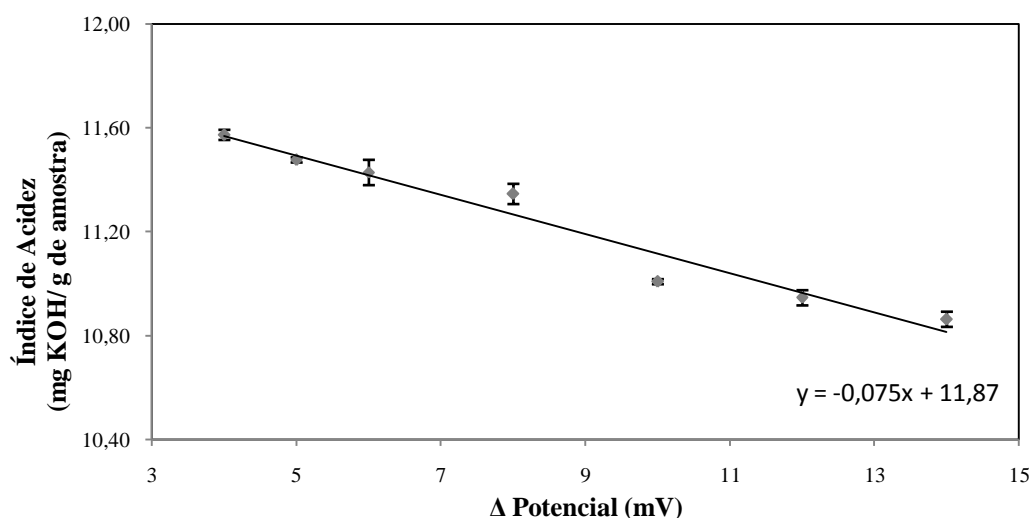


Figura V.2. 4 – Relação entre os resultados encontrados com os dois métodos: índice de acidez e biossensor ( $\Delta$  potencial).

Ao realizar a correlação entre os dois métodos utilizados para a detecção da degradação do óleo, observou-se boa correlação entre eles, corroborado com o coeficiente de correlação de  $R=0,978$ , o que demonstra nesta aplicação, a robustez e confiabilidade apresentada pelo biossensor desenvolvido, ainda usando a enzima livre.

### V.3 – Aplicação do Biossensor em Amostra Real de Óleo de Gergelim Comercial (Marca Pазze) Degradado na Fritura de Batatas

A fim de avaliar a eficiência do biossensor desenvolvido, foi realizada a sua aplicação na medida da degradação de uma amostra real (óleo de gergelim proveniente da fritura de batata). Esta degradação pôde ser observada visualmente, conforme mostrada na Figura V.3.1. Ademais, a Figura V.3.2 mostra os resultados encontrados com o biossensor (variação de potencial, em mV) e o índice de acidez nas análises das 05 amostras do procedimento de fritura.



Figura V.3. 1—Observação visual da degradação do óleo de gergelim comercial após 5 frituras com o mesmo.

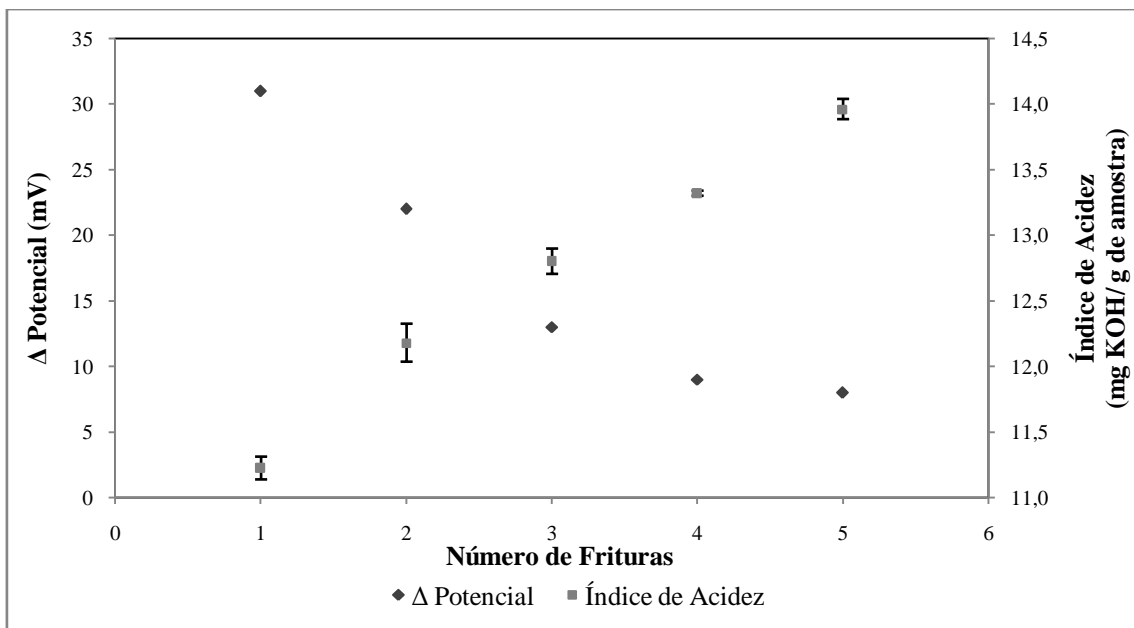


Figura V.3. 2—Análises da degradação do óleo de gergelim, por meio do biossensor (variação do potencial) e do índice de acidez, após sucessivos procedimentos de fritura de batata.

A partir da Figura V.3.2, pode ser observado o decaimento da variação do potencial em relação ao aumento do número de frituras com o óleo de gergelim, uma

vez que com a degradação do óleo ocorre a quebra de triglicérides e com isso reduzindo a quantidade de substrato disponível para a ação da enzima. Em contrapartida, o índice de acidez aumenta com relação ao aumento do número de frituras com o óleo de gergelim, devido a degradação do óleo ocasionar o aumento de ácidos graxos livres, proporcionando assim o aumento da acidez.

Com ambos os métodos, é comprovada a degradação do óleo de gergelim comercial utilizado, portanto, significando que o método do biossensor proposto é sensível e robusto o suficiente para detectar a degradação mesmo em amostras reais, como no caso de fritura de batatas.

Ademais, também foi feita a comparação do índice de acidez, ao longo do procedimento de fritura, de modo experimental e calculado utilizando a equação obtida pela relação mostrada na Figura V.2.4. Observou-se que os valores encontrados foram bem próximos entre si, conforme visualizado na Tabela V.3.1.

Tabela V.3. 1 - Comparação entre os índices de acidez experimental e calculado para as amostras reais, com seus respectivos desvios padrão.

Número de Frituras	Índice de Acidez Experimental (mg KOH/g de amostra)	Índice de Acidez Calculado (mg KOH/g de amostra)	Desvio Padrão
0	9,26 ± 0,02	8,65	0,43
1	11,22 ± 0,09	9,55	1,19
2	12,18 ± 0,14	10,22	1,38
3	12,80 ± 0,10	10,90	1,35
4	13,32 ± 0,02	11,20	1,50
5	13,96 ± 0,08	11,27	1,90

#### V.4 – Testes Realizados com o Óleo de Gergelim Recém-extraído e a Enzima Lipase na Forma Livre

Após observar boas respostas com a enzima na forma livre utilizando como substrato o óleo de gergelim comercial, o biossensor proposto foi testado em amostra de óleo de gergelim recém-extraído. A partir da Figura V.4.1, foi possível observar que a variação de potencial também se comportou de forma logarítmica, em função da

atividade da enzima, onde há liberação de íons H<sup>+</sup>, em relação à concentração do substrato (óleo de gergelim), variado na faixa de 10 a 50 % (v/v).

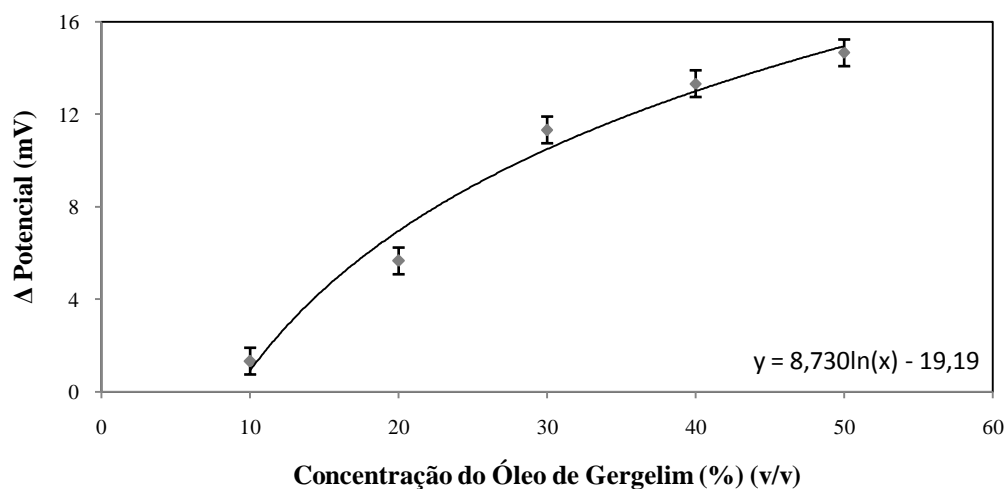


Figura V.4. 1 – Variação do potencial (mV) de acordo com a variação da concentração do óleo de gergelim recém-extraído utilizando a enzima na forma livre.

A fim também de garantir que a variação potenciométrica crescente observada na Figura V.4.1 se deu pela ação da enzima lipase, também foi avaliada a atividade enzimática com as mesmas variações de substrato gerando uma resposta positiva como esperado (coeficiente de correlação  $R=0,989$ ). Como observado na Figura V.4.2, ao se aumentar a concentração do substrato, houve acréscimo da atividade lipásica. Ambas as análises foram desenvolvidas com as mesmas condições: 37°C, 15 minutos e 1mL de extrato enzimático.

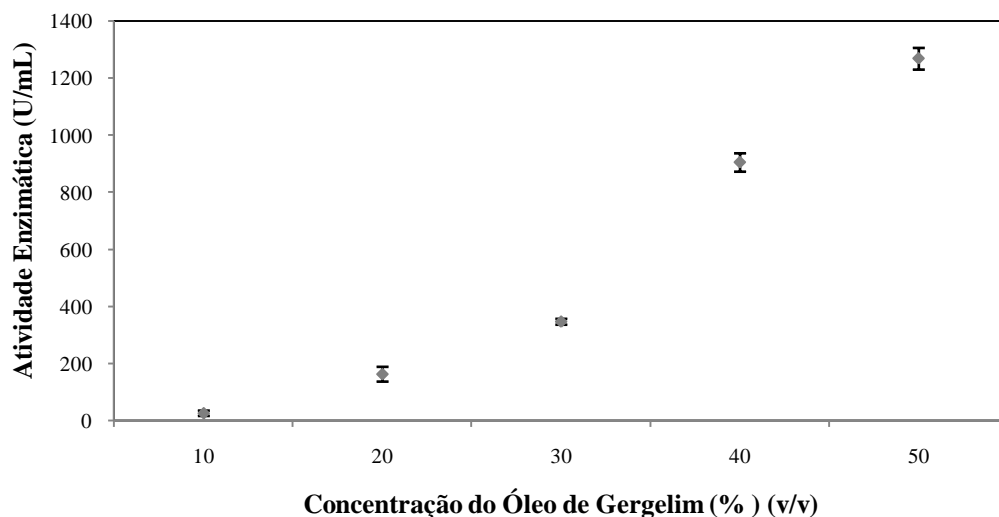


Figura V.4. 2 – Atividade enzimática (U/mL) de acordo com a variação da concentração do óleo de gergelim recém-extraído utilizando a enzima na forma livre.

Devido aos bons resultados, a curva mostrada na Figura V.4.1 foi utilizada como a curva de calibração do biossensor enzimático para o óleo de gergelim recém-extraído. A utilização de outra curva de calibração para o biossensor enzimático para amostras de óleo de gergelim recém-extraído foi necessária por este poder apresentar características químicas diferenciadas do óleo de gergelim comercial utilizado em testes anteriores por se apresentar na forma bruta.

Para o óleo de gergelim recém-extraído, realizou-se a degradação do mesmo por meio da oxidação com o aparelho Rancimat. A utilização do biossensor, no óleo degradado resultante, gerou uma resposta de variação do potencial igual a 3mV. Utilizando a equação da curva de calibração mostrada na Figura V.4.1, obteve-se que somente 12,7% do óleo ainda estava na sua forma íntegra. O resultado vai de encontro com o esperado, visto que o método utilizado pelo aparelho é muito agressivo, utilizando o tratamento térmico a 100°C e o oxigênio (como oxidante).



## V.5 – Testes Realizados com o Óleo de Gergelim Comercial (Marca Pazze) e a Enzima Lipase na Forma Imobilizada

### V.5.1 – Construção da curva de calibração do biossensor enzimático

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

Além disso, após observar as boas respostas com a enzima lipase na forma livre, a realização de ensaios com o biocomponente na forma imobilizada permitiria também a sua reutilização, visto que a enzima era o constituinte mais caro do instrumento desenvolvido. Assim, como visto na literatura, a utilização de enzimas imobilizadas favorece a manutenção de suas propriedades catalíticas por maior tempo, podendo ser reutilizadas em um maior número de análises. Assim, quanto maior a estabilidade operacional do biocomponente imobilizado, maior é seu tempo de uso produtivo, tornando a análise mais barata e simples (ROSATTO *et al.*, 2001; SILVA, 2011).

A partir da Figura V.5.1.1, foi possível observar que a variação de potencial se comportou também de forma logarítmica, com coeficiente de correlação  $R=0,979$ , em função da atividade da enzima, onde há liberação de íons  $H^+$ , em relação à concentração do substrato (óleo de gergelim), variado na faixa de 10 a 50% (v/v).

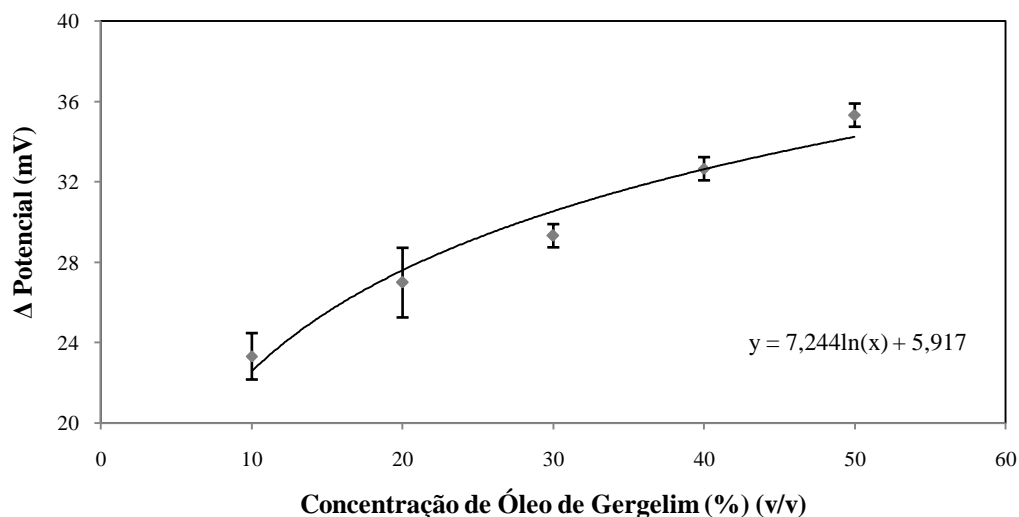


Figura V.5.1. 1 – Variação do potencial (mV) de acordo com a variação da concentração do óleo de gergelim comercial utilizando a enzima na forma imobilizada.

A fim de garantir que a variação potenciométrica crescente observada na Figura V.5.1.1 se deu pela ação da enzima lipase, também foi avaliada a atividade enzimática com as mesmas variações de substrato gerando uma resposta positiva com o esperado. Como observado na Figura V.5.1.2, ao se aumentar a concentração do substrato, houve acréscimo da atividade lipásica. Ambas as análises foram desenvolvidas com as mesmas condições: 37°C, 15 minutos e 1g de enzima imobilizada.

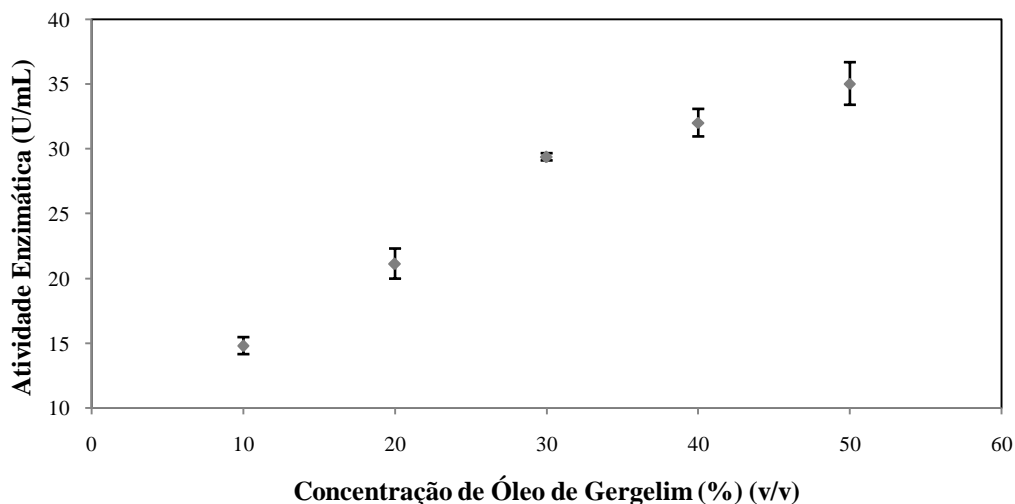


Figura V.5.1. 2 – Atividade enzimática (U/mL) de acordo com a variação da concentração do óleo de gergelim comercial utilizando a enzima na forma imobilizada.

Devido aos bons resultados, a curva mostrada na Figura V.5.1.1 foi utilizada como a curva de calibração do biossensor enzimático para o óleo de gergelim comercial utilizando a enzima imobilizada.

#### V.5.2 – Avaliação do comportamento das curvas ascendente e descendente de calibração do biossensor enzimático

A fim de verificar se a enzima na forma imobilizada teria sensibilidade suficiente para detectar as variações de concentração do analito (óleo de gergelim) e se o eletrodo íon-seletivo hidrogênio não ficaria saturado (existência de histerese), foram realizadas curvas de calibração na forma ascendente e descendente das concentrações do óleo de gergelim comercial analisadas. Observou-se que o eletrodo foi capaz de detectar as mudanças de concentração do óleo de gergelim gerando uma curva de variação potenciométrica coerente com os dados obtidos anteriormente (Figura V.5.2.1).

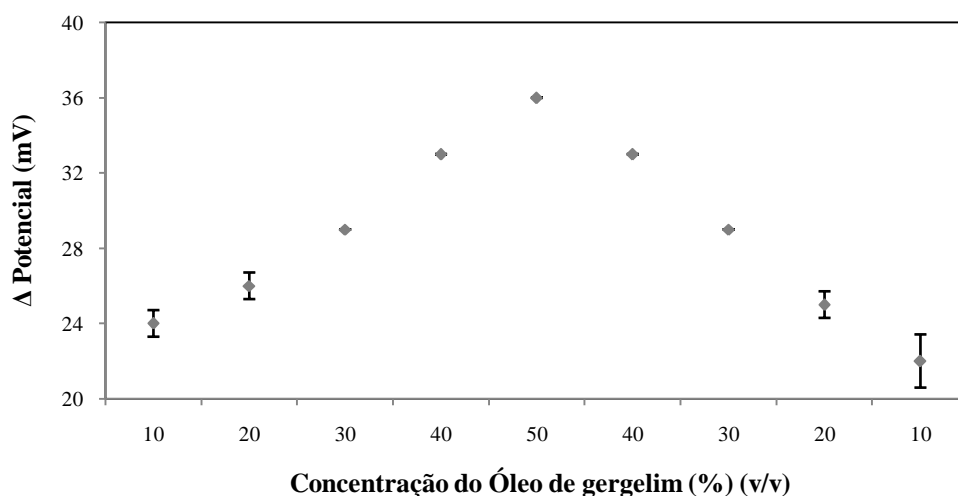


Figura V.5.2. 1 – Variação do potencial (mV) de acordo com o crescimento e decréscimo da variação de concentração do óleo de gergelim utilizando enzima imobilizada.

A fim de garantir que a variação potenciométrica crescente observada na Figura V.5.2.1 se deu pela ação da enzima lipase, também foi avaliada a atividade enzimática com as mesmas variações de óleo de gergelim e as mesmas condições: 37°C, 15 minutos e 1g de enzima imobilizada. Os resultados mostraram um mesmo perfil de

resposta encontrado na Figura V.5.2.1, mostrando a coerência dos resultados encontrados.

Assim é possível dizer que também aplicando na configuração do biossensor proposto enzima lipase comercial imobilizada, este foi capaz de responder a diferentes concentrações de óleo de gergelim de forma sensível, coerente e estável, apresentando ainda repetitividade em relação aos valores dos sinais obtidos para amostras de mesma concentração de óleo analisados de forma crescente e decrescente pelo instrumento.

## Capítulo VI – Conclusões e Sugestões

O sistema biossensor proposto mostrou uma boa resposta com ambas as formas de utilização da enzima (livre e imobilizada), apresentando, em ambos os casos, uma resposta com perfil logarítmico (resposta do transdutor em diferença de potencial com o aumento da concentração da amostra (óleo de gergelim), na faixa de 10 a 50 % (v/v). As análises de atividade lipásica confirmaram que as variações de diferença de potencial encontradas eram decorrentes de reação do biocomponente com o substrato. As curvas de calibração do biossensor, nas duas formas do biocomponente, apresentaram coeficiente de correlação superior a 0,979, mostrando boa sensibilidade do instrumento. Além disso, o biossensor proposto também apresentou uma boa detecção tanto para concentrações crescentes quanto para decrescentes do substrato.

Ao testar o sistema, utilizando a lipase na forma livre e como substrato (óleo de gergelim comercial) degradado, tanto por tratamento na câmara de UV, como tratamento térmico, ou ambos, foi possível identificar a quantidade de óleo não degradado até mesmo quando este valor ficou bem baixo (0,05% (v/v), no caso do tratamento término a 160°C por 40h). Sendo assim, o biossensor mostrou uma boa sensibilidade e aplicabilidade para detectar a qualidade destes óleos.

Quando aplicado em amostra degradada em condição mais severa de temperatura, 175°C, houve uma boa resposta do biossensor, caracterizada pela diminuição da diferença de potencial com o aumento do tempo de exposição ao tratamento térmico. Ademais, obteve-se uma boa correlação com o índice de acidez - que é o método tradicional utilizado atualmente para o mesmo fim, mostrando a robustez e confiabilidade da aplicação do instrumento proposto para esta finalidade.

Quando utilizado em amostras reais (fritura de batatas), também foi possível observar consistência dos resultados, utilizando o sistema biossensor proposto e o índice de acidez. Ademais, houve boa correspondência entre os valores experimentais e os encontrados com a curva de correlação entre o índice de acidez e a variação do potencial pelo biossensor.

Finalmente, diante dos resultados encontrados durante o trabalho, pode-se concluir que o biossensor enzimático (biocomponente nas formas livre ou imobilizada) desenvolvido tem se mostrado bem promissor para a determinação na degradação de óleos em amostras padrão e reais de óleo de gergelim degradado.

E como sugestões para dar continuidade a este trabalho, têm-se:

- ✓ Aplicar o biossensor, utilizando a enzima lipase na forma imobilizada, em amostras de óleos de gergelim comercial e recém-extraído degradados, usando método Rancimat e sob tratamento térmico
- ✓ Fazer o estudo de reutilização da enzima imobilizada.
- ✓ Testar o biossensor enzimático (enzima lipase nas formas livre e imobilizada) desenvolvido em outros tipos de óleos.

## Referências Bibliográficas

AGEITEC, site disponível em < <http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/gergelim/arvore/CONT000g13xgw6q02wx5ok0xkgyq5tycrnzs.html>>. Acessado em 01 de dezembro de 2013

ALFAYA, A.A. S.; KUBOTA, L.T. A. Utilização de materiais pelo processo de sol-gel na construção de biossensores. *Química Nova*, v.25, n 5, v. 835-841; 2008.

ANTONIASSI, R. Métodos de avaliação da estabilidade oxidativa de óleos e gorduras. *Boletim Ceppa, Curitiba*, v. 19, n. 2, p. 353-380, jul./dez. 2001.

ANVISA, Consulta Pública nº 85, de 13 de dezembro de 2004.<http://www4.anvisa.gov.br/base/visadoc/CP/CP%5B8994-1-0%5D.pdf>, consultado em 29 de outubro de 2013.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento – MAPA – Instrução Normativa nº49, de 22 de dezembro de 2006. Aprova o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade dos Óleos vegetais Refinados; a Amostragem; os Procedimentos Complementares; e o Roteiro de Classificação de Óleos Vegetais Refinados, Brasília: Diário Oficial da União de 26/12/2006, Seção 1, Página 140.

CARVALHO, P. G. B.; BORGHETTI, F.; BUCKERIDGE, M. S.; MORHI, L.; FERREIRA FILHO, E. X. Temperature-dependent germination and endomannase activity in sesame seeds. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*. Lavras, v. 13, n. 2, p.139-148, 2001.

CASTRO, H. F. de; MENDES, A. A.; SANTOS, J. C. dos. Modificação de óleos e gorduras por biotransformação. *Revista Química Nova*, Vol. 27, No. 1, 146-156, 2004.

CERT, A.; MOREDA, W.; PÉREZ-CAMINO, M. C. Chromatographic analysis of minor constituents in vegetable Oils. *Journal Chromatography A.*, v. 881, p.313-148, 2000.

CORSO, M. P. Estudo da extração de óleo de sementes de gergelim (*Sesamun indicum* L.) empregando os solventes dióxido de carbono supercrítico e n-propano pressurizado Toledo. Centro de Engenharias e ciências exatas – Universidade Estadual do Oeste do Paraná, 2008, Dissertação de Mestrado.

DURLI, E. Tratamento de efluentes de indústria de laticínios utilizando lipases de Burkholderiacepacea LTEB11. Departamento de Química- Área de concentração em Química Orgânica. Universidade Federal do Pará. Dissertação (Mestrado), Curitiba, 2007.

EMBRAPA, Gergelim para Alimentação e Biodiesel. Disponível em: <<http://www.embrapa.br/imprensa/noticias/2012/julho/3a-semana/simposio-discute-gergelim-para-alimentacao-e-biodiesel/?searchterm=gergelim>> Acesso em 14 de outubro de 2013

EMBRAPA, Sistemas de Produção, No. 6, Versão Eletrônica Dez/2006. Disponível em: <<http://www.cnpa.embrapa.br/produtos/gergelim/index.html>> Acesso em 15 de outubro de 2013

EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Org. FURTADO, R. F.; DUTRA, R. A. F.; ALVES, C. R.; PIMENTA, M. G. R.; GUEDES, M. I. F. Aplicações de biossensores na análise da qualidade de alimentos. Fortaleza: Embrapa, 2008. 22p. (Embrapa Agroindústria Tropical. Documentos, 117).

EVANGELISTA, J., Alimentos: Um Estudo Abrangente. São Paulo: Editora Atheneu, 2002.

FERRARI, C. K. B. Oxidação Lipídica em Alimentos e Sistemas Biológicos: Mecanismos Gerais e Implicações Nutricionais e Patológicas. Nutr., Campinas, 11(1): 3-14, jan./jun., 1998

FRANK, J.; GEIL, J. V.; FREASO, R. Automatic determination of oxidation stability of oil and fatty products. *Food Technology*, v. 36, n. 6, p. 71-76, 1982.



FRANKEL, E.N. In search of better methods to evaluate natural antioxidants and oxidative stability in food lipids. *Trends in Food Science & Technology*, v.4, n.7, p.220-225, 1993.

FUENTES, P. H. A., Avaliação da Qualidade de Óleos de Soja, Canola, Milho e Girassol durante o Armazenamento, Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-graduação em Ciências dos Alimentos, Dissertação (Mestrado), 2011.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz. v.1: Métodos químicos e físicos para análise de alimentos, 3. ed. São Paulo: IMESP, 1985.

INSTRUÇÕES TÉCNICAS, Fritura de Alimentos – Obtenção de Alimento com qualidade, Janice Ribeiro Lima. Embrapa Agroindústria Tropical, N° 08, abril/2001, p.1-3.

JAEGER, K.E. & REETZ, M.T. Microbial lipases form versatile tools for biotechnology. *Tibtech*, v. 16, p. 396-403, 1998.

KUTSCHENKO, F. et al. Análise potenciométrica – um levantamento histórico, princípios e aplicações. *Iniciação científica CESUMAR*, v. 7, n. 1, p. 49-56, 2005.

LAGO, A. A.; CAMARGO, O. B. de A., SAVY FILHO, A. et al. Maturação e produção de sementes de gergelim cultivar IAC-China. *Pesquisa agropecuária brasileira*, Brasília, v. 36, n. 2, p. 363-369, fev. 2001.

MELO, A. F. Desenvolvimento preliminar de um biossensor enzimático para determinação de taninos hidrolisáveis. Dissertação de mestrado, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2008.

MELO, A. F. Produção e aplicação de lipase no desenvolvimento de um biossensor potenciométrico. Tese de doutorado, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2012.

MELLO, L.D; KUBOTA, L.T. Biosensors as a tool for the antioxidant status evaluation. *Talanta*, v. 72, p. 335–348; 2007.

MIYAHARA, Y., HIBASAMI, H., KATSUZAKI, H., IMAI, K., KOMIYA, T. Sesamol from sesame seed inhibits proliferation by inducing apoptosis in human lymphoid leukemia Molt 4B cells. *International Journal of Molecular Medicine*, v. 7, p. 369-371, 2001.

MORETTO, E.; FETT, R. *Tecnologia de Óleos e Gorduras Vegetais na Indústria de Alimentos*. São Paulo: Varela, 1998. 150 p.

NAWAR, W. W. Lipids. In: FENNEMA, O. R. *Food chemistry*. 2 ed., New York: Marcel Dekker, 1985. p. 176.

NEVES, R. B. S., *NANOTECNOLOGIA APLICADA À INDÚSTRIA DE ALIMENTOS: o uso de biossensores*, Universidade Federal de Goiás, Programa de pós graduação em ciência Animal, Escola de Veterinária e Zootecnia, 2011.

OKUNO, E.; VILELA, M. A. C., *Radiação Ultravioleta: Características e Efeitos*. 1ª Edição, São Paulo: Editora Livraria da Física, Sociedade Brasileira de Física, 2005.

RAMALHO, V., C.; JORGE, N. Antioxidantes utilizados em óleos, gorduras e alimentos gordurosos. *Revista química Nova*, São Paulo, v. 29, n.4, p. 755-760, Ago. 2006.

ROSATTO, S.S. Desenvolvimento de um biossensor amperométrico para fenol a base de peroxidase e sílica modificada. Tese de Doutorado Universidade Estadual de Campinas, Campinas, São Paulo, 2000.

ROSATTO, S.S. et al. Biossensores amperométricos para determinação de compostos fenólicos em amostras de interesse ambiental. *Química Nova*, v. 24, n. 1, p. 77-86, 2001.

RUMAYOR, V. G.; IGLESIAS, E. G.; GALÁN, O. R.; CABEZAS, L. G. Aplicaciones de biosensores en la industria agroalimentaria. Madrid: ElecÉIndustria Gráfica, 2005. 113p.

SALGADO, A. M. Desenvolvimento e Aplicação de Sensores e Sistemas de Moritoração de Biomassa, Etanol e de substrato por Modelo, Tese de Doutorado, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2001.

SANKAR, D., SAMBANDAM, G., RAO, M.R., PUGALENDI, K.V. Impact of sesame oil on nifedipine in modulating oxidative stress and electrolytes in hypertensive patients. *Asia Pacific JournalofClinicalNutrition*, v. 13, n. 107. 2004.

SARMENTO, C. M. P. Extração supercrítica de óleo de farelo de arroz e obtenção de frações enriquecidas em tocoferóis e tocotrienóis. Dissertação de Mestrado, Centro Tecnológico, Universidade Federal de Santa Catarina, 2002.

SCOGNAMIGLIO, V. et al. Biosensors for effective environmental and agrifood protection and commercialization: from research to market. *Microchimica Acta*, v. 170, p. 215–225, 2010.

SILVA, L. M. C. Desnvolvimento de Biossensores Eletroquímicos para Fenol e Uréia com Foco na Aplicação Ambiental, Tese de Doutorado, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2011.

SOARES, C.F.M; de CASTRO,M.F; de MORAES,F.F e ZANIN,G.M. Characterization and utilization of *Candida rugosa*Lipase Immobilized on Controlled Pore Silica.*AppliedBiochemistryandBiotecnology*, 77/79 (1999).

ST. ANGELO, A. J. Lipid oxidation in foods. *Food Science and Nutrition*, v. 36, n. 3 p. 175-224, 1996.

VELASCO-GARCÍA, M.; MOTTRAM, T. Biosensor technology addressing agricultural problems.*Biosystems Engineering*, London, v. 84, n. 1, 1-12, 2003.

VENUGOPAL, V. Biosensors in fish production and quality control. *Biosensors and Bioelectronics*, Oxford, v. 17, n. 3, p. 147–157, 2002.

VILLENEUVE, P.; MUDERHWA. M.; GRAILLE, J.; HAAS, M. J. Customizing lipases for biocatalysis: a survey of chemical, physical and molecular biological approaches. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 9, p. 113-148, 2000.

WERE, A. A.; ONKWARE, A., WELANDER, S. G. M.; CARLSSON, A. S. Seed oil content and fatty acid composition in East African sesame (*Sesamum indicum L.*) accessions evaluated over 3 years. *Field Crops Research*, v. 97, p.254–260, 2006.