

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA DE PESCA

B S L C M

INTRODUÇÃO DE ANÁLISE BIOTECNOLÓGICA PELO BIOSSENSOR

ANA ROSA MONTEIRO COELHO DE CARVALHO

Dissertação apresentada ao Departamento de Engenharia de Pesca do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Ceará, como parte das exigências para obtenção do título de Engenheiro de Pesca.

FORTALEZA-CEARÁ

1992-2

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária
Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

C321i Carvalho, Ana Rosa Monteiro Coelho de.
Introdução de análise biotecnológica pelo biossensor / Ana Rosa Monteiro Coelho de Carvalho. – 1992.
17 f. : il.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências
Agrárias, Curso de Engenharia de Pesca, Fortaleza, 1992.
Orientação: Prof. Dr. Masayoshi Ogawa.

1. Pescados. 2. Matérias-primas. I. Título.

CDD 639.2

Prof. Masayoshi Ogawa PhD

- Orientador -

COMISSÃO EXAMINADORA:

Engenheiro de Pesca Nilson Luiz de Aguiar Carvalho MSc

Prof. José Wilson Calíope de Freitas

VISTO:

Prof. Luiz Pessoa Aragão MSc

Chefe do Departamento de Engenharia de Pesca

Prof. Moisés Almeida de Oliveira MSc

Coordenador do Curso de Engenharia de Pesca

AGRADECIMENTOS

A Deus, por haver me concedido mais uma vitória.

Ao Prof. Dr. Masayoshi Ogawa, pela dedicada orientação e amizade no decorrer deste trabalho.

A Pesquisadora Norma Barreto Perdigão e aos Engenheiros de Pesca Israel Hidenburgo Aniceto Cintra e Nilson Luiz de Aguiar Carvalho pela colaboração e apoio dispensado para a confecção deste trabalho.

A meus pais e irmãos, pelo carinho, compreensão e dedicação durante minha carreira acadêmica.

Ao professor Moises Almeida de Oliveira, pela atenção dedicada durante o decorrer do curso.

INTRODUÇÃO DE ANÁLISE BIOTECNOLÓGICA PELO BIOSSENSOR

1 - INTRODUÇÃO

Dentre os setores relacionados com as atividades desenvolvidas nas indústrias de alimentos, o controle de qualidade da matéria-prima detém uma grande responsabilidade no que se refere a observância de normas e padrões a serem aplicados quando se trata de um alimento a ser oferecido ao consumidor.

Desta forma, uma empresa que atua neste ramo jamais poderá oferecer um produto final de qualidade aceitável, caso a matéria-prima seja considerada imprópria; especialmente quando se trata de indústrias que operam com pescado. Pois, considerando as fases por que passa o pescado, até sua chegada ao consumidor, podemos dizer que este necessita de um controle de qualidade mais rigoroso frente aos outros alimentos. Sendo assim, o êxito de uma atividade de inspeção está relacionado diretamente com a velocidade e reprodutibilidade das análises, a fim de reduzir as perdas da matéria-prima e dos produtos finais, tanto quanto combater as enfermidades que podem atingir o consumidor.

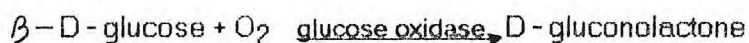
Muito já se tem confirmado quanto ao valor da qualidade do peixe e dos testes utilizados para diagnosticar sua aceitação para o consumo na obtenção de produtos industrializados de alta qualidade. Contudo, SAITO et al. (1959) por WATANABE et al. (1983), referem que a estimativa do frescor do pescado tem importância fundamental no beneficiamento deste. Porque após a morte do peixe, ocorrem alterações que se iniciam pela ação autolítica dos enzimas musculares fazendo com que o ATP se degrade de acordo com a seguinte sequência: ATP (adenosina-5'-trifosfato) — ADP (adenosina-5'-difosfato) — AMP (adenosina-5'-monofosfato) — IMP (inosina-5'-monofosfato) — HxR (inosina) — Hx (hipoxantina) — X (xantina) — U (ácido úrico).

Vários métodos já foram descritos para determinar a hipoxantina, (JONES et al., 1964; KOBAYASHI & UCHIYAMA 1970; TANAKA et al., 1970 e JAHNS et al., 1976). Ainda no que concerne a determinação do frescor do pescado, temos o método do Valor do K. Este método foi considerado mais prático e lógico frente aos demais. Com os recentes avanços alcançados no setor de determinação da qualidade nas indústrias pesqueiras, está o método do biossensor. Este se baseia no uso de sensores químicos. De acordo com WATANABE et al. (1983), já foram testados com êxito, sensores enzimáticos, biológicos e sensor organela e existem outros em fase experimental.

Os sensores não são resultados de pesquisas recentes, em 1930 já havia trabalho publicado mostrando a importância de um sensor enzimático. UPDAKE (1967) elaborou o primeiro sensor enzimático, porém sem imobilizar a enzima, ficando o seu uso restrito a no máximo 10 análises, pois de acordo com WATANABE et al. (1983), a enzima imobilizada fica estável podendo ser utilizada para mais de 100 análises. O sensor enzimático elaborado para determinar hipoxantina foi usado xantina oxidase e um teste de oxigênio, comparado com o método de EHIRA & UCHIYAMA (1969) foi considerado mais rápido, eficiente e econômico.

Em virtude do exposto acima o biossensor se torna um método promissor na análise, não só do frescor, como na determinação de substâncias estranhas no pescado usado por empresas que tentam mascarar a má qualidade do produto.

O presente estudo, trata da introdução de técnicas de análise pelo biossensor. Na ocasião, desenvolveu-se um sensor enzimático para a determinação de glicose, baseado na seguinte reação:



O sensor foi testado com a determinação de análise em tres amostras.

2 - MATERIAL E MÉTODOS

Com adaptação de materiais, foi montado um biossensor enzimático para determinação de glicose. O sistema constou de um frasco de polietileno contendo solução tampão de fosfato pH 7,8, colocado sobre um agitador magnético. A função do agitador foi de oxigenar a solução. Dentro do frasco foi realizado um subsistema de sifonação em substituição a uma bomba peristáltica, para obtenção de um fluxo constante. A velocidade do fluxo foi controlada na vazão de 1 ml/min. A eficiência desta vazão foi confirmada em estudos realizados por WATANABE et al. (1988). Como sensor foi utilizado um eletrodo DO de oxigênio, modelo ABLE, tipo DG-5G, acoplado a um registrador Varian Tectron modelo 135 A. Com a finalidade de aumentar a sensibilidade do registrador foram adaptadas a este duas resistências 1K 2 5% e 5W.

A figura 1 mostra o diagrama esquemático do biossensor utilizado e na figura 2 o diagrama esquemático de outro sensor desenvolvido por WATANABE et al. (1983), para efeito de comparação.

Reagentes

- Glucose oxidase (E.C.1.1.3.4, from *Aspergillus niger*) fabricada pela Sigma Co.
- Glutaraldeído a 25%.
- Triacetilcelulose pela Estmon Kodac Co.
- Diclorometano pela Sigma Co.
- Sol. de Diclorometano saturada.
- Diaminofenol.
- Sol. Tampão de fosfato pH 7,8.

Imobilização da enzima

A enzima glucose oxidase foi imobilizada em uma membrana preparada de acordo com as orientações do Prof. Dr. Etsuo Watanabe da 'Tokyo University of Fisheries'. Foram dissolvidas 250 g de triacetil celulose em 5 ml de diclorometano, em seguida adicionado 0,2 ml de glutaraldeído, com agitação a solução foi homogeneizada e adicionado 1,5 g de diaminofenol e 5 ml de solução de diclorometano saturada. Após a mistura completa a solução foi despejada sobre uma placa de vidro onde foi espalhada com auxílio de um bastão de vidro e ali permaneceu 24 horas em temperatura ambiente. Note-se que a maior parte do tempo o ambiente foi resfriado por um condicionador de ar. Formou-se então uma camada fina sobre o vidro, esta foi cortada em pedaços de 1 cm² e depois foi retirada com água destilada. Em seguida foram lavadas com solução tampão de fosfato 0,05 M e umedecidas com glutaraldeído 0,05 M por aproximadamente 3 horas e novamente lavadas em água destilada. Depois foram imersas em solução tampão de fosfato contendo glucose oxidase. As membranas foram estocadas em geladeira a temperatura de 10 °C.

Procedimento da análise

Uma solução tampão de pH 7,8 foi transferida manualmente para o frasco de polietileno. O sistema de sifonação encarregou-se de circular a solução continuamente pelo sistema. Após controlada a velocidade do fluxo (1 ml/min.), imobilizar a enzima na membrana e fixá-la no eletrôdo, pôde-se dar início aos testes. Com auxílio de uma microseringa foi injetado na direção do fluxo e aproximadamente 5 cm de distância do eletrôdo, uma alíquota de 0,1 ml da amostra a ser analisada. A enzima catalizou a oxidação da β -D-glucose, contida na amostra. O consumo de oxigênio da reação, medido pelo eletrôdo causou um decréscimo da corrente produzida pelo registrador. A diferença

entre a corrente inicial e o decréscimo desta, foi usado como determinação da concentração de glicose na amostra e foi dada na unidade de mA (miliampere).

O material analisado foi hemolinfa de caranguejo. Os caranguejos vivos, foram adquiridos no mercado e transferidos para o laboratório até o momento da coleta da hemolinfa. O líquido linfático foi obtido mediante extirpação de um dos pereiópodes do animal, deixando-o escorrer em um becker. Não foi necessário o uso de anticoagulante, pois a análise foi realizada logo em seguida da coleta da hemolinfa. A amostra foi aplicada no sensor conforme descrito anteriormente, antes que o líquido linfático coagulasse. Foram determinados os teores de glicose na hemolinfa de 5 caranguejos.

Além da hemolinfa do caranguejo, foi determinado o teor de glicose para Coca-Cola e suco de laranja (Solaranja) para avaliar a eficiência do aparelho.

Para a curva padrão da glicose, usou-se uma solução de glucose 0,1 M, esta foi diluída com água destilada na seguinte sequência: 1ª diluição (solução 10): 1 ml da solução 0,1 M completada para 10 ml; 2ª diluição (solução 1): 1ml da solução 10 completada para 10 ml; 3ª diluição (solução 3): 3 ml da solução 10 para 10 ml, 4ª diluição (solução 5): 5 ml da solução 10 para 10 ml e finalmente 5ª diluição (solução 7): 7ml da solução 10 para 10 ml.

A partir do peso molecular da solução padrão foi calculado a quantidade de glicose em mg/ml para cada diluição. Comparando os dados obtidos na determinação de glicose das amostras com a curva padrão, obteve-se o teor de glicose em mg/ml.

3 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

Uma das condições essenciais para se obter êxito, utilizando um biossensor em análises biotecnológicas, é a imobilização da enzima. De acordo com WATANABE et al.(1983) e KARUBE et al.(1984) a estabilidade da enzima geralmente aumenta com a imobilização. A enzima glicose oxidase estabilizada, permite a execução de até 100 análises.

A figura 3 mostra que a molécula do substrato se ajusta ao sítio ativo da enzima como conjunto de chave e fechadura, em uma relação de complementariedade.

O valor da quantidade do fluxo controlado em 1ml/min. não afetou a produção da corrente e com o volume amostrado de 0,1 ml a corrente foi estabilizada. Vale frisar conforme WATANABE et al. (1988), a produção da corrente diminuiu quando houve um aumento na velocidade de fluxo. Portanto é fundamental manter a velocidade do fluxo constante e utilizar sempre a mesma alíquota da amostra..

A curva padrão foi representada na figura 4. A amostra padrão foi aplicada no sensor como já descrito e obteve-se uma reta nas concentrações de 10 a 1 mM.

O nível máximo de glicose dado pelo biossensor é de 0,5 mg/ml, segundo WATANABE (1988).

Para a hemolinfa do caranguejo ocorreu uma variação nos teores de glicose. Os resultados foram os seguintes: 1,3; 1,2; 1,8; 1,7 e 1,3 mA. Os resultados se encontram na tabela 1.

O índice de metabolismo nos animais pode terem influenciado nesses valores, pois de acordo com JONHSTON & DAVIES (1972), a hemolinfa funciona como meio de transporte dos compostos de baixo peso molecular que são metabolizados pelo organismo do animal.

O metabolismo da glicose em crustáceos tem sido investigado por vários autores. HEMMINGSEN (1925) por OLIVEIRA (1988), encontrou valores normais de substâncias redutoras entre 2 a 40 mg/100 ml em camarões de água doce.

A glicose não é utilizada como substrato para metabolismo oxidativo nas espécies *Panulirus penicillatus* e *P. japonic*. A hipótese proposta por SCHEER (1951), é que a importância de glicose está relacionada com a formação da quitina no tegumento. HEMMINGSEN (1924a), encontrou um aumento de açúcar no sangue em *P. aztecus* depois do alimento e registrou uma queda no nível de glicose em *Carcinus maenas* após alguns dias de jejum. Para hemolinfa de caranguejo, os teores de glicose foram variados.. Essa variação se deu talvez devido as condições em que se encontravam os caranguejos antes de serem analisados. Tendo em vista que foram totalmente desconhecidas.

No tocante aos teores de glicose encontrados para a Coca-Cola e suco de laranja, foram respectivamente; 1.5 e 1.7 mA. .

4- CONCLUSOES

Baseado no presente estudo obtêve-se as seguintes conclusões:

- 1- O método de determinação de glicose utilizando um biossensor, tem a vantagem de se obter uma série de ensaios em um curto espaço de tempo.
- 2- Também não houve a necessidade de preparação de amostras para a análise. A amostra foi injetada diretamente no sistema, só requerendo de diluições para o ajuste de faixas dos níveis de glicose.
- 3- O controle da velocidade do fluxo e a imobilização da enzima são parâmetros marcantes, quando se trabalha com um sensor enzimático.
- 4- Foi comprovado a eficiência do biossensor para determinar glicose, seja em matéria animal como também para outros alimentos..
- 5- Para a hemolinfa do caranguejo os teores de glicose foram variados, para o suco de laranja e Coca-Cola os resultados foram praticamente semelhantes.

5- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 - EHIRA, S., UCHIYAMA, H. - Rapid estimation of freshness of fish by nucleoside phosphorylase and antine oxidase. *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.*, 35: 1080:1085, 1969.
- 2 - HEMMINGSEN, A. M. - The blood sugar of some invertebrates. *Skand. Arch. Physiol.*, 45: 204-210, 1924.
- 3 - JOHNSTON, M. A., DAVIES, P. S. - Possible hepatic function for crustacean blood cells. *Nature, London*, 230: 471-472, 1971.
- 4 - KARUBE, J., MATSUOKA, H., SUZUKI, S., WATANABE, E., TOYAMA, K. - Determination of fish freshness with an enzyme sensor system. *J. Agr. Food Chem.*, 32: 314, 1984.
- 5 - KOBAYASHI, H., UCHIYAMA, H. - Simple and rapid method for estimating the freshness of fish. *Bull. Tokai. Reg. Fish. Res. Lab.* (61): 21, 1970.
- 6 - OLIVEIRA, M. P. - Estudo das variações dos teores de glicose, glicogênio, carboidratos totais e proteína na hemolinfa e hepatopâncreas de jovens de lagostas da espécie *Panulirus leavicauda* (Latreille), em relação aos estágios de muda. Dissertação apresentada ao Departamento de Engenharia de Pesca do Centro de Ciências Agrárias da Universidade federal do Ceará, como parte das exigências para obtenção do título de Engenheiro de Pesca. Fortaleza-Ceará, 55 p. 1988.

- 7 - SAITO, T., ARAI, A., MATSUYOSHI, M. - A new method for estimating the freshness of fish. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.* (24): 749: 750, 1959.
- 8 - SCHEER, B. T., SCHEER, M. A. R. - Blood sugar in spiny lobsters (Part 1 of the hormonal regulation of metabolism in crustaceans). *Physiol. Comp. Occol.* 2: 198-209, 1951.
- 9 - TANAKA, T., ARAI, A., SAITO, T. - A simple and rapid method for estimating the freshness of muscle by thin layer chromatography. *J. Jap. Soc. Food & Nutrition.* 23: 127, 1970.
- 10 - UPDIKE, S. J., HICKS, G. P. - The enzyme electrode. *Nature.* 214: 986, 1967.
- 11 - WATANABE, E., ANDO, K., KARUBE, J., MATSUOKA, H., SUZUKI, S. - Determination of hypoxanthine in fish with an enzyme sensor. *J. food Sci.* 48 (2): 496: 500, 1983.
- 12 - WATANABE, E., ENDO, H., TOYAMA, K. - Determination of phosphate ions with an enzyme sensor system. *J.* 297: 306, 1988.

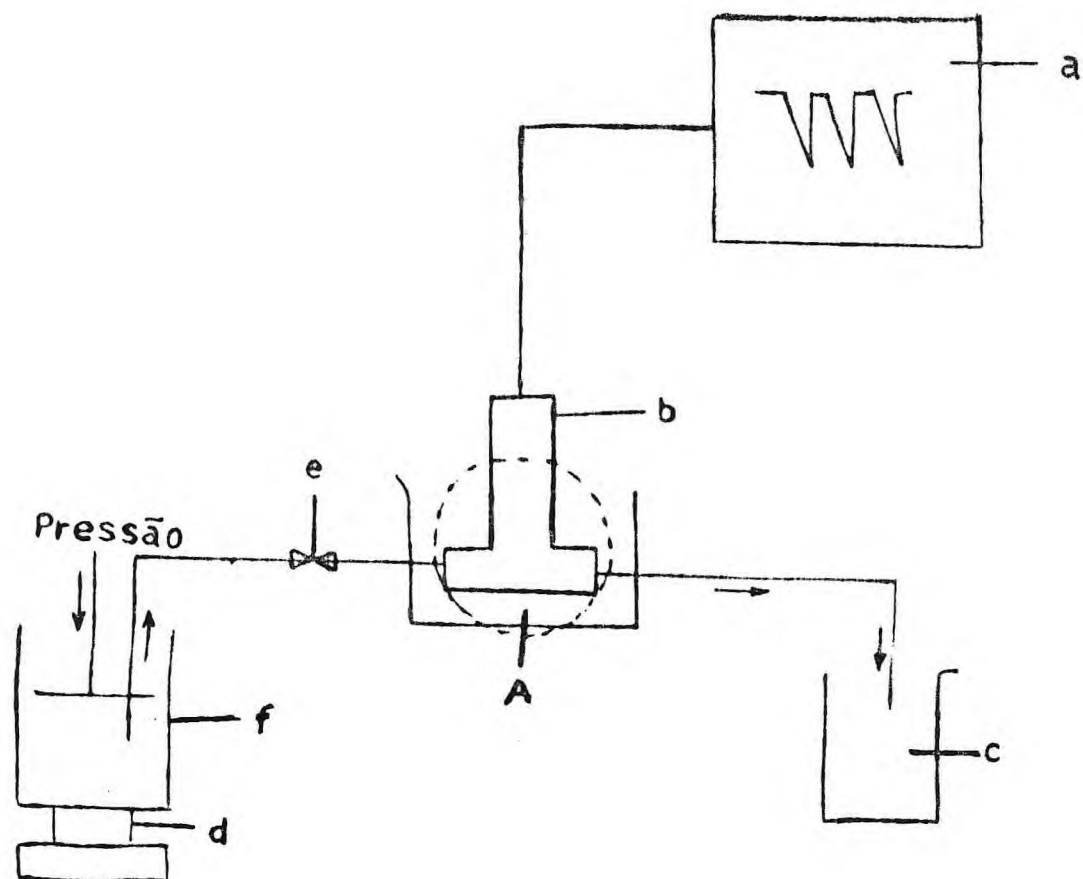
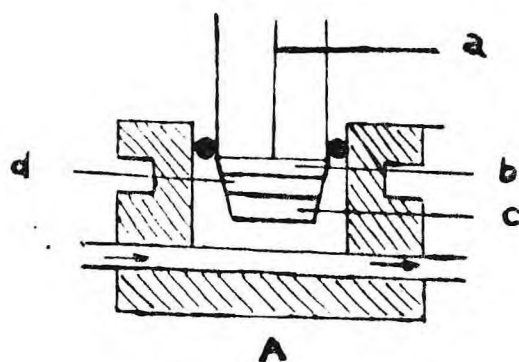


Figura 1 - Diagrama esquemático do biossensor montado no laboratório

a: registrador; b: eletrodo de oxigênio; c: recipiente para medir vazão do fluxo; e: local da aplicação da amostra; f: recipiente contendo solução tampão; d: agitador magnético.



Eletrodo de Oxigênio

a: cátodo de platina
b: membrana de teflon

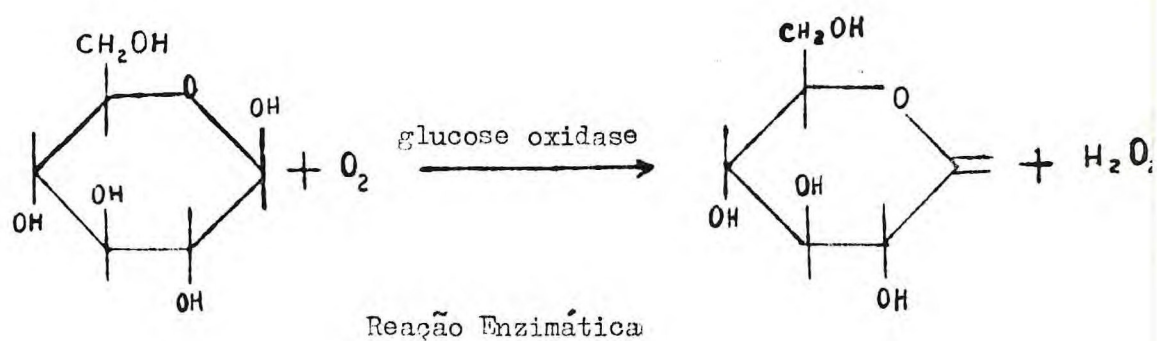
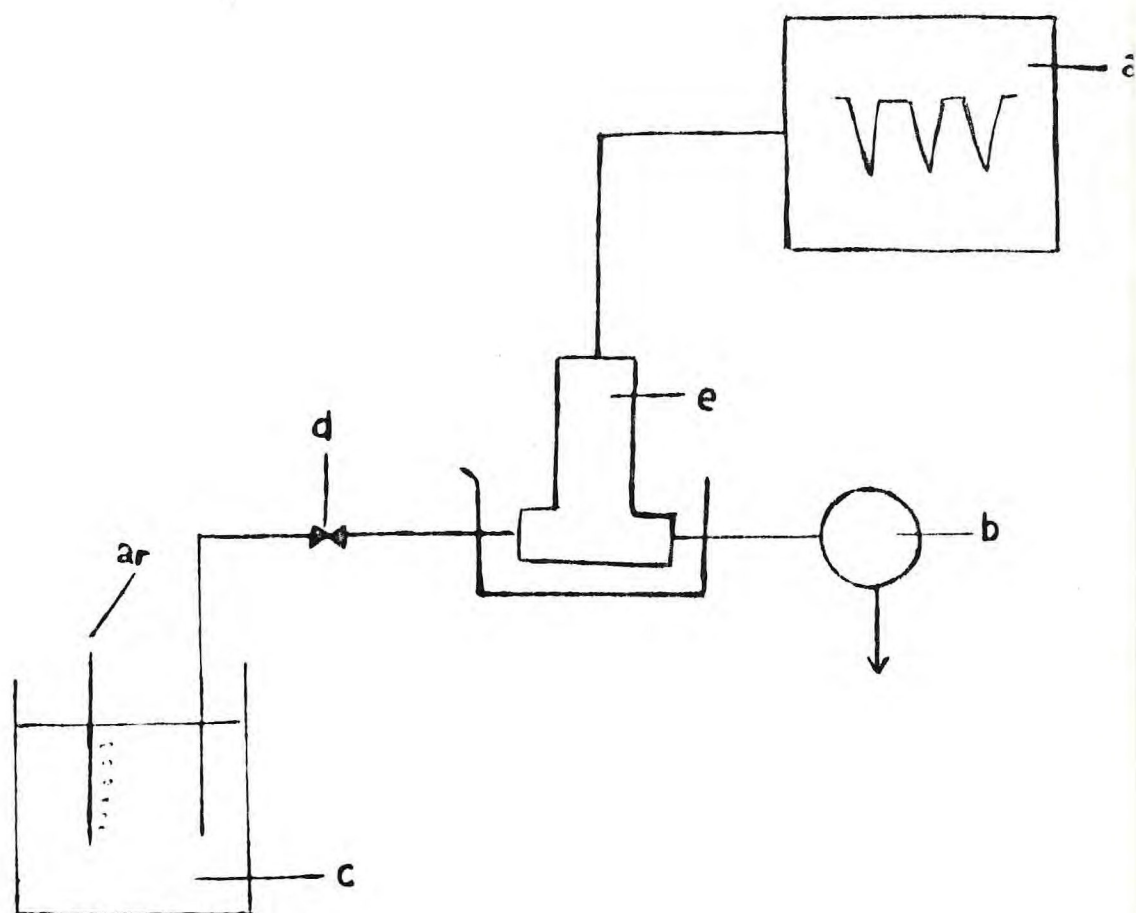
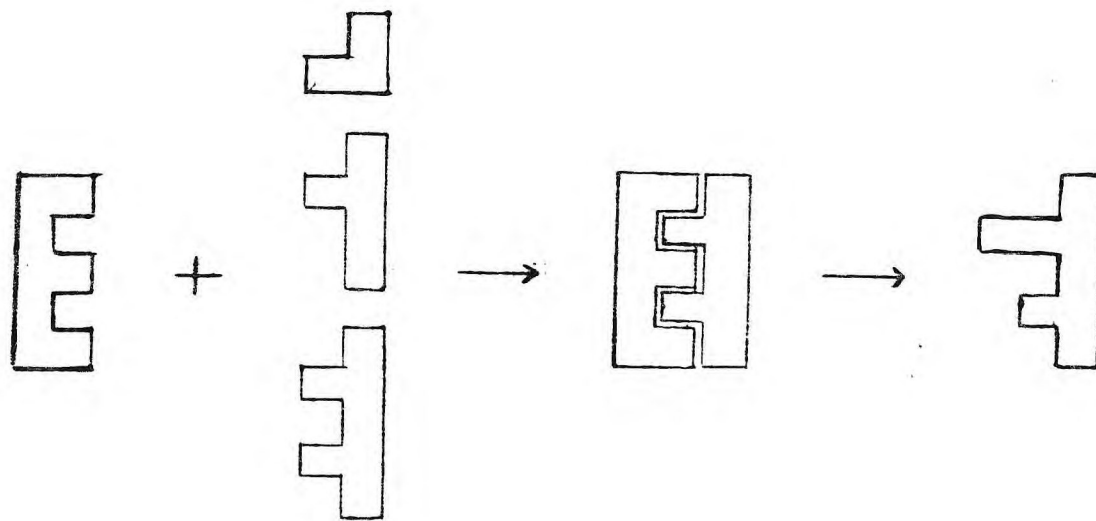
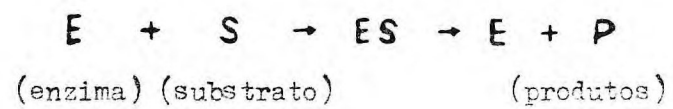


Figura 2 - Diagrama esquemático de um sensr enzimático para glucose
a: registrador; b: bomba peristáltica; c: tanque contendo solução tampão; Local da aplicação da amostra.

F

G

H

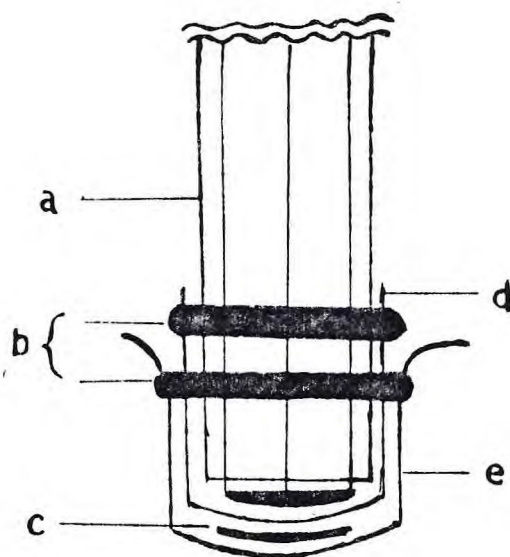


BSI.CM

Figura 3- Relação de complementariedade enzima/substrato

Tabela 1- Teores de glicose para hemolinfa de caranguejo, Coca-Cola e suco de laranja (só laranja).
C: Representa hemolinfa de caranguejo

AMOSTRAS	TEOR DE GLICOSE (mA)	TEOR DE GLICOSE (mg/ml)
C1	1,3	0,0137
C2	1,2	0,0127
C3	1.8	0,0180
C4	1,7	0,0160
C5	1,3	0,0137
Coca-Cola	1,5 a 1,7	0,015 a 0,011
Suco de laranja	1,5 a 1,7	0,015 a 0,011



ELETRODO ENZIMÁTICO

- a: eletrôdo de oxigênio
- b: borrachas para prender as membranas
- c: membrana enzimática
- d: membrana de teflon
- e: membrana de diálise