



Universidade Federal de Alfenas



Adriano Francisco Barbosa

***ESTUDO ELETROQUÍMICO DA INTERAÇÃO DE
OLIGOSSACARÍDEOS PREBIÓTICOS COM
MEMBRANAS DE BICAMADA LIPÍDICA***

Alfenas - MG

2010

Adriano Francisco Barbosa

***ESTUDO ELETROQUÍMICO DA INTERAÇÃO DE
OLIGOSSACARÍDEOS PREBIÓTICOS COM
MEMBRANAS DE BICAMADA LIPÍDICA***

Dissertação apresentada como requisito parcial para
obtenção do título de Mestre em Química – Área de
Concentração: Físico-Química pela Universidade Federal
de Alfenas.

Orientador: Prof. Dr José Maurício Schneedorf FS

Alfenas – MG

2010

Barbosa, Adriano Francisco.
Estudo eletroquímico da interação de oligossacarídeos
prebióticos com membranas de bicamada lipídica / Adriano Francisco
Barbosa . - Alfenas, 2010.

102 f. : il. -

Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal de
Alfenas.

Bibliografia.

1. Oligossacarídeos. 2. Comunicação Celular. 3. Membranas.
I. Título.

ADRIANO FRANCISCO BARBOSA

***ESTUDO ELETROQUÍMICO DA INTERAÇÃO DE
OLIGOSSACARÍDEOS PREBIÓTICOS COM
MEMBRANAS DE BICAMADA LIPÍDICA***

A Banca examinadora abaixo-assinada aprova a Dissertação apresentada como parte dos requisitos para a obtenção do título de mestre em Química pela Universidade Federal Alfenas. Área de concentração: Físico-Química

Aprovada em:

Profº. Dr. José Maurício Schneedorf Ferreira Silva
Instituição: Universidade Federal de Alfenas
Unifal-MG

Assinatura:

Profº. Dr. Mário José Politi
Instituição: Universidade de São Paulo – USP

Assinatura:

Profº. Dr. Fabio Herbst Florenzano
Instituição: Universidade Federal de Alfenas
Unifal-MG

Assinatura:

A Deus

À minha noiva Valéria pelo grande apoio, paciência, carinho e amor que é a razão da minha força, da minha alegria e da minha dedicação.

A meus Pais, pela minha criação, pelo contínuo apoio, e por estarem sempre presentes em minha vida.

Aos meus professores de graduação e pós-graduação que foram fundamentais para minha formação e que sempre me incentivaram.

Agradecimentos

À Universidade Federal de Alfenas MG pela grande oportunidade oferecida.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) pelo apoio financeiro na estruturação do laboratório de Bioquímica e pela bolsa concedida.

À Coordenação do Curso de Pós-Graduação pela política de incentivo à produção acadêmica.

Ao grupo de pesquisa, professores e técnicos de laboratório que sempre estiveram presentes acompanhando o meu trabalho.

Em especial, agradeço meu orientador José Mauricio que esteve sempre atencioso e muito dedicado em ajudar na busca de soluções para problemas encontrados durante a realização do projeto de pesquisa.

“Tentar e falhar é, pelo menos, aprender. Não chegar a tentar é sofrer a inestimável perda do que poderia ter sido”

(Geraldo Eustáquio)

RESUMO

Neste trabalho estão apresentados a avaliação da interação de oligossacarídeos prebióticos com membranas de bicamada lipídica por voltametria cíclica e espectroscopia de impedância eletroquímica e o desenvolvimento de um eletrodo de pasta de carbono modificado para quantificação de quefirano, inulina e fruto – oligossacarídeos de chicória por voltametria cíclica e cronoamperometria. Inicialmente foram utilizadas as técnicas de voltametria cíclica e espectroscopia de impedância eletroquímica para estudar os efeitos da interação de oligossacarídeos prebióticos (quefirano cultivado em meio aquoso, inulina e fruto- oligossacarídeo de chicória) com membranas de bicamada lipídica suportada em um eletrodo de Pt. O objetivo foi avaliar efeitos do tempo e da concentração na interação e verificar possíveis mecanismos de ação. A interação desses oligômeros sobre s-BLM de l- α -fosfatidilcolina/colesterol proporcionou o acesso dos íons de $\text{Fe}(\text{CN})_6^{-3/4-}$ à superfície do eletrodo de Pt gerando correntes faradáicas. Verificou-se que esse acesso dos íons-sonda ocorre devido à formação de poros na s-BLM. O mecanismo sugerido para a interação envolve ligações de hidrogênio entre os grupos hidroxila dos carboidratos e o grupo fosfato do fosfolípido. O modelo de interação proposto foi o de formação de tapete ligado, que proporciona efeitos semelhantes a um efeito detergente. Os resultados trazem informações que podem ajudar no entendimento sobre a ação direta de interações entre os oligossacarídeos prebióticos e as superfícies celulares, ambos relacionados com a atividade biológica desse grupo em vários modelos experimentais. Em outra etapa, foi desenvolvido um eletrodo de pasta de carbono modificado para detecção de carboidratos em geral incluindo os oligossacarídeos quefirano, inulina e fruto – oligossacarídeos de chicória. Nessa etapa trabalho, um eletrodo de pasta de carbono modificada foi otimizado para quantificação de carboidratos. O eletrodo apresentou maior sensibilidade para glicose quando utilizou-se 0,44% de α -naftilamina, 67/32.46% de grafite em pó / óleo mineral. Na construção do eletrodo inicialmente a porcentagem de carbono \ α -naftilamina passou por uma etapa de eletropolimerização em 0,2 HClO_4 M, mantendo o potencial de 0,65 V por 250 s. Para incorporar íons Ni (II) no filme

polimérico, a eletrodo foi colocado em uma solução aquosa de aquosa de 0,1 M NiCl_2 . A oxidação dos carboidratos, foi estudada por de voltametria cíclica em 0,1 M NaOH, velocidade de varredura 50mV / s e faixa de potencial de 0,150 a 0,580V. Foram estudados dezoito carboidratos (mono, di e polissacarídeos) obtendo curvas de calibração linear para dezesseis carboidratos com valores de coeficientes de correlação entre 0,984 - 0,999, respectivamente, a rhaminose e sacarose. O eletrodo modificado proporcionou limites de quantificação de 0,136, 0,241, 0,187, 0,140, 0,267, 0,121, 0,098, 0,188, 0,234, 0,285, 0,199 e 0,156 mmol.L^{-1} , respectivamente, glicose, lactose, maltose, rhaminose, sacarose, galactose, frutose , arabinose e fucose, manose, trealose e xilose. Para os oligossacarídeos, os limites de quantificação foi de 16,18, 636,7 e 2125,44 mg.L^{-1} para oligossacarídeos de Kefir, frutooligosaccharides da chicória e inulina.

Palavras - chave: Membrana de bicamada lipídica suportada. Oligossacarídeos prebióticos. Voltametria cíclica. Espectroscopia de impedância eletroquímica.

ABSTRACT

Present work to evaluate the interaction of oligosaccharides with prebiotic bilayer lipid membranes by cyclic voltammetry and electrochemical impedance spectroscopy and the development of an electrode modified carbon paste for the quantification of kefirano, inulin and fructo-oligosaccharide from chicory by cyclic voltammetry and chronoamperometry. Initially we have used cyclic voltammetry and electrochemical impedance spectroscopy to study the interaction effects of prebiotic oligosaccharides (kefirano grown in water, inulin and fructo-oligosaccharide from chicory) with bilayer lipid membranes supported on a Pt electrode. The objective was to evaluate effects of time and concentration on the interaction and to identify possible mechanisms of action. The interaction of these oligomers on s-BLM of 1- α -phosphatidilcoline/ cholesterol provided access of ions $\text{Fe}(\text{CN})_6^{-3/4}$ to the surface of Pt electrode generating faradaic current. It was found that the access of ions-probe is due to the formation of pores in the s-BLM. The suggested mechanism seems to involve some hydrogen bonding between the carbohydrate and the phosphate head group of the phospholipid with a carpet-like model of interaction. The overall results can help in the knowledge about direct molecular interactions between prebiotic oligosaccharides and cell surfaces, both related to the biological activity of this group in several experimental models. In another step, we developed an electrode modified carbon paste for the detection of carbohydrates in general including kefirano oligosaccharides, inulin and fructo-oligosaccharide from chicory. At this stage work, an electrode modified carbon paste was optimized for quantification of carbohydrates. The electrode showed a higher sensitivity to glucose when we used 0.44% α -naphthylamine, 67/32.46% of graphite / mineral oil. In the construction of the electrode initially the percentage of carbon \ α -naphthylamine went through a stage of electropolymerization in 0.2 M HCO_4 , keeping the potential of 0.65 V for 250 s. To incorporate ions Ni (II) in the polymer film, the electrode was placed in an aqueous solution of aqueous 0.1 M NiCl_2 . The oxidation of carbohydrates, was studied by cyclic voltammetry in 0.1 M NaOH, scan rate 50mV / s full potential of 0.150 to 0.580 V. Eighteen carbohydrates (mono, di and polysaccharides) obtained linear calibration

curves for sixteen carbohydrate values of correlation coefficients between 0.984 to 0.999, respectively, rhamnose and sucrose. The modified electrode provided limits of quantification of 0.136, 0.241, 0.187, 0.140, 0.267, 0.121, 0.098, 0.188, 0.234, 0.285, 0.199 and 0.156 mmol.L⁻¹, respectively, glucose, lactose, maltose, rhamnose, sucrose, galactose, fructose, arabinose and fucose, mannose, trehalose and xylose. For oligosaccharides, the limits of quantification was 16.18, 636.7 and 2125.44 mg.L⁻¹ for oligosaccharides Kefir, fructo-oligosaccharide from chicory and inulin

Key words: Supported bilayer lipid membrane. Prebiotics oligosaccharides. Cyclic voltammetry. Electrochemical impedance spectroscopy.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Técnicas analíticas desenvolvidas para determinação de oligossacarídeos.	73
Tabela 2 – Variáveis com seus respectivos níveis empregados no planejamento fatorial 2^4 utilizado na otimização da construção do eletrodo de trabalho.	76
Tabela 3 – Planejamento fatorial completo 2^4 usado para avaliar o efeito das variáveis na construção do eletrodo de pasta de carbono modificado para determinação de oligossacarídeos.	78
Tabela 4 – Matriz de Doehlert usada na otimização da confecção da pasta de carbono e os resultados obtidos no experimento.	81
Tabela 5 – ANAVA obtida para o modelo quadrático gerado pela matriz de Doehlert.	82
Tabela 6 – Parâmetros obtidos para a quantificação de vários carboidratos com o eletrodo de pasta de carbono modificado.	87

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Representação da estrutura simplificada para fruto-oligossacarídeos.	23
Figura 2 – Representação da estrutura conformacional da Inulina. Cadeia em (a) plano X-Y, (b) plano Y-Z.	23
Figura 3 – Estrutura química proposta para o quefirano originado de grãos de quefir em meio lácteo ¹⁷	24
Figura 4 – Representação de estruturas auto-organizadas: (a) micela normal; (b) moléculas de lipídeos organizadas na interface água-ar; (c) bicamada de lipídeos e (d) lipossomo.	26
Figura 5 – Gráfico de Tafel (extraído da referência 34).	32
Figura 6 – Voltamogramas cíclicos para o ECV modificado com BLM em solução de 0,5 mM de $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6^{+3}$ em 0,1 M de KCl após interação com: (a) 0,5 mM, (b) 0,0 mM, (c) 1,0 mM, (d) 1,8 mM, (e) 2,6 mM, (f) 3,4 mM (g) 4 mM, (h) 4,5 mM, (i) 6mM e (j) 10 mM de ibuprofeno. Inseto: Voltamograma cíclico do ECV não modificado. Velocidade de varredura de potencial: $50\text{mV}\cdot\text{s}^{-1}$ ³⁹	34
Figura 7 – (a) Gráfico Nyquist de um circuito RC em série, (b) e o seu respectivo gráfico de Bode ângulo de fase, (c) Gráfico Nyquist de um circuito RC em paralelo, (d) e o seu respectivo gráfico de Bode ângulo de fase (retirado da referência 48 com alterações).	38
Figura 8 – Gráfico Nyquist para o circuito de Randles ⁴⁸	39
Figura 9 – Esquema representativo das três possibilidades de transferência de elétrons de Pt-BLM em $1\text{mMol}\cdot\text{L}^{-1}$ de $\text{Fe}(\text{CN})_6^{-3/4}$ em KCl 0,1 M contendo íons Ca^{+2} . (a) tunelamento eletrônico através da membrana de bicamada lipídica, (b) tunelamento eletrônico através de uma monocamada lipídica, (c) transferência de elétrons na superfície do eletrodo de Pt quando o par redox atravessa por poros na membrana de bicamada lipídica. (o) representa o par redox. (Figura 5 da referencia 49)	40
Figura 10 – Gráfico de Nyquist do eletrodo de Pt-BLM em (a) em $1\text{mMol}\cdot\text{L}^{-1}$ de $\text{Fe}(\text{CN})_6^{-3/4}$ em KCl 0,1 M contendo diferentes concentrações de íons Ca^{+2} : (1) 0,5 mM, (2) 1,1 mM, (3) 2,4 mM, (4) 4,0 mM, (5) 7,6 mM; (b) em $1\text{mMol}\cdot\text{L}^{-1}$ de $\text{Fe}(\text{CN})_6^{-3/4}$, KCl 0,1 M e 8,0mM de Ca^{+2} contendo diferentes concentrações de EDTA: (1) 0 mM, (2) 2,2 mM, (3) 4.3 mM, (4) 7,8 mM e (5) 12,5 mM. (Figura 7 da referencia 49).	41

Figura 11 – Resposta para voltametria cíclica do (a) eletrodo de Pt, (b) eletrodo de platina modificado com s-BLM em solução de 1.0 mmol.L ⁻¹ K ₃ [Fe(CN) ₆]/K ₄ [Fe(CN) ₆] (1:1) e 0.1 mol.L ⁻¹ de KCl. Velocidade de varredura de potencial de 50 mVs ⁻¹	48
Figura 12 – Espectro de impedância do eletrodo de platina 1.0 mmol.L ⁻¹ de K ₃ [Fe(CN) ₆]/K ₄ [Fe(CN) ₆] (1:1) em KCl 0.1 mol.L ⁻¹ : (a) eletrodo de Pt; (b) eletrodo de Pt modificado com s-BLM: (■) dados experimentais, (—) ajuste da simulação do circuito equivalente de Randle's. Inseto, o circuito elétrico equivalente de Randle's.	49
Figura 13 – Voltamogramas cíclicos obtidos para uma solução de 1.0 mmol.L ⁻¹ K ₃ [Fe(CN) ₆]/K ₄ [Fe(CN) ₆] (1:1) em 0.1 mol.L ⁻¹ de KCl, para o eletrodo de modificado com a s-BLM após a interação com 0,04 g.L ⁻¹ quefirano por tempos crescentes: (a) 0 min, (b) 5 min, (c) 10 min, (d) 15 min, (e) 30 min, (f) 50min. Velocidade de varredura de potencial de 50mV.s ⁻¹	52
Figura 14 – Correntes de pico (I _{p_a} e I _{p_c}) e ΔE _p do eletrodo de Pt modificado com a s-BLM para uma solução 1.0 mmol.L ⁻¹ Fe(CN) ₆ ^{-3/4} em KCl 0.1 mol.L ⁻¹ em função do tempo de interação com uma solução de quefirano 0,04 g.L ⁻¹	53
Figura 15 – Voltamogramas cíclicos obtidos para solução de K ₃ [Fe(CN) ₆]/ K ₄ [Fe(CN) ₆] (1:1) contendo 0,1 mol.L ⁻¹ , para eletrodo Pt modificado com s-BLM após interação com crescentes concentrações de quefirano por um tempo de 5 min: (a) 0,00 μmol.L ⁻¹ , (b) 0,04 g.L ⁻¹ , (c) 0,08 g.L ⁻¹ , (d) 0,12 g.L ⁻¹ , (e) 0,16 g.L ⁻¹ e (f) 0,20 g.L ⁻¹ . Velocidade de varredura de 50mV.s ⁻¹	54
Figura 16 - Correntes de pico (I _{p_a} e I _{p_c}) (a) e ΔE _p (b) do eletrodo de Pt modificado com a s-BLM para uma solução 1.0 mmol.L ⁻¹ Fe(CN) ₆ ^{-3/4} em KCl 0.1 mol.L ⁻¹ em função da concentração de quefirano para um tempo de interação de 5 min.....	55
Figura 17 – Voltamogramas cíclicos obtidos a partir de uma solução de 1.0 mmol.L ⁻¹ K ₃ [Fe(CN) ₆]/K ₄ [Fe(CN) ₆] (1:1) em 0.1 mol.L ⁻¹ de KCl, para o eletrodo de Pt suportado por membrana de bicamada lipídica após a interação com 7,5 g.L ⁻¹ FOC por tempos crescentes respectivamente de 0 min, 5 min, 10 min, 15 min e 30 min. Velocidade de varredura de potencial de 50 mV.s ⁻¹	56
Figura 18 – Correntes de pico (I _{p_a} e I _{p_c}) do eletrodo de Pt modificado com a s-BLM para uma solução 1.0 mmol.L ⁻¹ Fe(CN) ₆ ^{-3/4} em KCl 0.1 mol.L ⁻¹ em função do tempo de interação de uma solução de 7,5 g.L ⁻¹ FOC.	57
Figura 19 – Voltamogramas cíclicos obtidos para uma solução de K ₃ [Fe(CN) ₆]/ K ₄ [Fe(CN) ₆] (1:1) contendo 0,1 mol.L ⁻¹ de KCl, para eletrodo Pt modificado com s-BLM após interação com concentrações crescentes de FOC por 20 min: (a) 0,00 g.L ⁻¹ , (b) 2,50 g.L ⁻¹ , (c) 5,00 g.L ⁻¹ , (d) 7,50 g.L ⁻¹ , (e) 10,0 g.L ⁻¹ e (f) 12,5 g.L ⁻¹ . Velocidade de varredura de 50mVs ⁻¹	58
Figura 20 – ΔE _p para o eletrodo de Pt modificado com a s-BLM em uma solução 1.0 mmol.L ⁻¹ Fe(CN) ₆ ^{-3/4} em KCl 0.1 mol.L ⁻¹ em função da concentração de fruto-oligossacarídeos de chicória para um tempo de interação de 20 min.....	59
Figura 21 – Voltamogramas cíclicos obtidos em uma solução de 1.0 mmol.L ⁻¹ K ₃ [Fe(CN) ₆] / K ₄ [Fe(CN) ₆] (1:1) em 0.1 mol.L ⁻¹ de KCl, para o eletrodo de Pt modificado com a s-BLM após a interação com 1,00 g.L ⁻¹ inulina por tempos crescentes: (a) 0 min, (b) 5 min, (c) 10 min, (d) 15 min, (e) 30 min e (f) 50min. Velocidade de varredura de 50 mVs ⁻¹	61
Figura 22 – Voltamogramas cíclicos obtidos para solução de K ₃ [Fe(CN) ₆]/ K ₄ [Fe(CN) ₆] (1:1) contendo 0,1 mol.L ⁻¹ , em um eletrodo Pt modificado com s-BLM após interação com diferentes concentrações Inulina por 10 min: (a) 0,00 g.L ⁻¹ , (b) 0,40 g.L ⁻¹ , (c) 0,70 g.L ⁻¹ , (d) 1,00 g.L ⁻¹ , (e) 1,30 g.L ⁻¹ , (f) 1,60 g.L ⁻¹ . Velocidade de varredura de 50 mVs ⁻¹	62
Figura 23 – Correntes de pico (I _{p_a} e I _{p_c}) do eletrodo de Pt modificado com a s-BLM para uma solução 1.0 mmol.L ⁻¹ Fe(CN) ₆ ^{-3/4} em KCl 0.1 mol.L ⁻¹ em função da concentração de inulina usada na interação após interação por 10 min.	62
Figura 24 – Espectro de impedância do eletrodo de Pt em solução 1.0 mmol.L ⁻¹ de K ₃ [Fe(CN) ₆]/K ₄ [Fe(CN) ₆] (1:1) e KCl 0.1 mol.L ⁻¹ para: (a) eletrodo de Pt modificado com s-BLM; (b) s-BLM após interação com FOC 5,0 g.L ⁻¹ , (c) s-BLM após interação com IN 1,0 g.L ⁻¹ e (b) s-BLM após interação com quefirano 0,04 g.L ⁻¹ . Tempo de interação de 10min.	63
Figura 25 – Fotos dos experimentos de partição octanol/água para os oligossacarídeos após um mês de equilíbrio a temperatura ambiente. Ensaio com soluções: (a) Quefirano 0,8 g.L ⁻¹ , (b) FOC 1% (m/v), (c) inulina 1% (m/v) e (d) triton X-100 20 mmol.L ⁻¹	65

Figura 26 – Mecanismo proposto para a interação dos oligossacarídeos e a membrana (b) as moléculas de oligossacarídeos se alinham na superfície da membrana (c) penetração e formação de poros e em (d) quando uma concentração crítica é atingida ocorre um efeito semelhante ao efeito detergente, onde os oligossacarídeos e componentes da membrana formam agregados que saem da membrana, causando até mesmo a destruição.....	67
Figura 27 – Diagrama de Pareto dos efeitos para as variáveis estudadas na confecção do eletrodo modificado para determinação de oligossacarídeos.....	79
Figura 28 – Superfície de resposta obtida a partir do modelo quadrático representado pela Equação 8.	83
Figura 29 – Resposta eletroquímica para o eletrodo de pasta de carbono otimizado para: (a) solução de NaOH 0,1 mol.L ⁻¹ ; (b) solução de glicose 1 mmol.L ⁻¹ em NaOH 0,1 mol.L ⁻¹	84
Figura 30 – (a) Dependência dos picos de correntes com a variação das taxas de varredura, taxas de varreduras: (A) 10, (B) 20, (C) 50, (D) 100, (E) 300 mV s ⁻¹ em solução glicose 1,00 m mol L ⁻¹ em NaOH 0,1 mol L ⁻¹ . (b) Gráfico de I _p vs v ^{1/2}	85
Figura 31 – Curva de calibração obtida a partir dos valores de corrente de pico anódico do eletrodo de pasta de carbono modificada para diferentes concentrações de glicose em NaOH 0,1 mol.L ⁻¹ : (a) 0,00; (b) 0,25; (c) 0,50; (d) 0,75 e (e) 1 mmol.L ⁻¹ de glicose. Inseto estão apresentados os voltamogramas cíclicos obtidos.....	86
Figura 32 – (a) Resposta de corrente-tempo para uma solução de NaOH 0,1 M no eletrodo otimizado com a adição de volumes constantes de solução de quefirano em NaOH 0,1M correspondente a um aumento de 3 mg.L ⁻¹ . A faixa de concentrações foi de 3 a 36 mg.L ⁻¹ . (b) Curva de calibração linear obtida com os valores de corrente máxima obtida injeção de alíquotas. As medidas foram conduzidas em um potencial fixo de 425 mV.....	88
Figura 33 – (a) Resposta de corrente-tempo para uma solução de NaOH 0,1 M no eletrodo otimizado com a adição de volumes constantes de solução de FOC em NaOH 0,1M correspondente a um aumento de 10,0 mg.L ⁻¹ . A faixa de concentrações foi de 10,0 a 100,0 mg.L ⁻¹ . (b) Curva de calibração linear obtida com os valores de corrente máxima obtida injeção de alíquotas. As medidas foram conduzidas em um potencial fixo de 425 mV.....	89
Figura 34 – (a) Resposta de corrente-tempo para uma solução de NaOH 0,1 M no eletrodo otimizado com a adição de volumes constantes de solução de inulina em NaOH 0,1M correspondente a um aumento de 200 mg.L ⁻¹ . A faixa de concentrações foi de 200,0 a 2600,0 mg.L ⁻¹ . (b) Curva de calibração linear obtida com os valores de corrente máxima obtida injeção de alíquotas. As medidas foram conduzidas em um potencial fixo de 425 mV.....	91

Lista de Abreviações

ABIA	–	Associação Brasileira das Indústrias da Alimentação
AF	–	Alimentos funcionais
ALG	–	Alginato
ANAVA	–	Análise de Variância
BHTA	–	Brometo de Hexadeciltrimetilamônio
CA	–	Concentração do Aglutinante
CC	–	Concentração Complexante
CG	–	Cromatografia Gasosa
CL	–	Colesterol
CLAE	–	Cromatografia líquida de Alta Eficiência
CLUE	–	Cromatografia Líquida de Ultra-eficiência

Cm	– Capacitância da Membrana
CPZ -	– Croropromazina
CSK	– Carboidratos Solúveis de quefirano
DSC	– Calorimetria Exploratória Diferencial
dm	– Espessura da Membrana
ESR	– Espectrometria de Ressonância de Spin
EC	– Eletroforese Capilar
ECV	– Eletrodo de Carbono Vítreo
EPt	– Eletrodo de Platina
FC	– L- α -fosfatidilcolina
FOC	– fruto-oligossacarídeo de chicória
FOS	– Fruto-oligossacarídeos
FT-IR	– Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier
GOS	– Oligossacarídeos de Galactose
GP	– Grau de Polimerização
IMO	– Isomalto-oligossacarídeos
IN	– Inulina
Ipa	– Corrente de pico Anódica
Ipc	– Corrente de pico Catódica
K ₀	– Constante de Heterogeneidade Padrão
MOS	– Manano - oligossacarídeos
Rm	– Resistência da Membrana
Rsol	– Resistência da solução
Rct	– Resistência de transferência de carga
RMN	– Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear
s-BLM	– Membrana de Bicamada Lipídica Suportada
SOS	– Oligossacarídeos de Soja
VC	– Voltametria Cíclica
VE	– Potencial de Eletropolimerização
XOS	– Xilo-oligossacarídeos
Zw	– impedância de Warburg
ΔE_{pac}	– variação do potencial de pico anódico e catódico
Θ	– fração coberta do eletrodo de platina

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	16
	CAPITULO 1	18
2	OBJETIVOS	19
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	20
3.1	ALIMENTOS FUNCIONAIS	20
3.2	BICAMADA LIPÍDICA	24
3.3	INTERAÇÃO DE MOLÉCULAS COM MEMBRANA E AS FERRAMENTAS UTILIZADAS	
3.4	VOLTAMETRIA.....	27
3.5	VOLTAMETRIA CÍCLICA NO ESTUDO DA INTERAÇÃO DE SUBSTÂNCIAS COM MEMBRANAS DE BICAMADA LIPÍDICA SUPORTADA (S-BLM)	32
3.6	ESPECTROSCOPIA DE IMPEDÂNCIA ELETROQUÍMICA.....	36
3.7	ESPECTROSCOPIA DE IMPEDÂNCIA ELETROQUÍMICA NO ESTUDO DA INTERAÇÃO DE SUBSTÂNCIAS COM MEMBRANAS DE BICAMADA LIPÍDICA SUPORTADA (S-BLM)	39
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	42
4.1	INSTRUMENTAÇÃO	42
4.2	FONTES DE OLIGOSSACARÍDEOS	42
4.3	OUTROS REAGENTES E MATERIAIS.....	42
4.4	CONSTRUÇÃO DO ELETRODO DE PLATINA.....	43
4.5	CALIBRAÇÃO DO POTENCIOSTATO/GALVANOSTATO.....	43
4.6	MÉTODO PARA FORMAÇÃO DA MEMBRANA DE BICAMADA LIPÍDICA SOBRE O	
4.7	CARACTERIZAÇÃO DA s-BLM POR MEIO DE ESPÉCIES ELETROQUÍMICAS DE $Fe(CN)_6^{4-/3-}$	44
4.8	INTERAÇÃO DE OLIGOSSACARÍDEOS PREBIÓTICOS COM MEMBRANA DE BICAMADAS LIPÍDICAS (S-BLM)	45
4.9	AVALIAÇÃO DOS DADOS	46
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	47
5.1	INTERAÇÃO DE OLIGOSSACARÍDEOS PREBIÓTICOS COM MEMBRANA DE BICAMADAS LIPÍDICAS (s-BLM).....	47
5.1.1	<i>Caracterização da membrana de bicamada lipídica suportada no eletrodo Pt</i>	47
5.1.2	<i>Estudos de interação dos oligossacarídeos por meio de voltametria cíclica</i>	51

5.1.2.1	Estudo da interação de quefirano com s-BLM em eletrodo de platina.....	51
5.1.2.2	Interação de fruto-oligossacarídeo de chicória com s-BLM em eletrodo de platina	56
5.1.2.3	Interação de inulina com eletrodo de Pt modificado com a s-BLM	60
5.1.3	<i>Estudos de interação dos oligossacarídeos por espectroscopia de impedância eletroquímica</i>	63
5.1.4	<i>Ensaio de partição octanol / água</i>	64
5.1.5	<i>Mecanismos propostos para de interação entre oligossacarídeos e s-BLM</i>	65
6	CONCLUSÕES	68
	APENDICE	69
	CAPITULO 2	70
7	OBJETIVOS	71
8	REVISÃO	72
8.1.1	<i>Determinação de oligossacarídeos</i>	72
9	MATERIAIS E MÉTODOS	75
9.1	INSTRUMENTAÇÃO	75
9.2	FONTES DE OLIGOSSACARÍDEOS	75
9.3	OUTROS REAGENTES E MATERIAIS.....	75
9.4	CONSTRUÇÃO DE ELETRODOS DE TRABALHO PARA DETERMINAÇÃO DE CARBOIDRATOS EM GERAL.....	75
9.5	AVALIAÇÃO DOS DADOS	77
9.6	EXPERIMENTO DE CRONOAMPEROMETRIA.....	77
10	RESULTADOS E DISCUSSÃO	78
10.1	OTIMIZAÇÃO MULTIVARIADA DA CONFECÇÃO DA PASTA DE CARBONO DO ELETRODO DE TRABALHO PARA DETERMINAÇÃO DE OLIGOSSACARÍDEOS.....	78
10.2	AVALIAÇÃO DA SENSIBILIDADE DO ELETRODO DE PASTA DE CARBONO FRENTE A VÁRIOS CARBOIDRATOS, ENTRE ELES, OLIGOSSACARÍDEOS PREBIÓTICOS	86
11	CONCLUSÕES	92
	APENDICE	93
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	94

1 INTRODUÇÃO

Os alimentos estão entre os inúmeros fatores que afetam a qualidade da vida moderna, de forma que a população tem se conscientizado da importância daqueles contendo substâncias que auxiliam na promoção da saúde, tais como substâncias prebióticas e, em especial, oligossacarídeos funcionais. Tais compostos são conhecidos por proporcionar melhoras no estado nutricional e benefícios adicionais à saúde, como proteção contra carcinogênese, mutagênese, prevenção de lesões causadas por radicais livres, controle da microbiota intestinal, promoção de resistências gastrointestinais, entre outras. Com tais benefícios proporcionados por prebióticos e demais alimentos funcionais, a incidência de morte devido a acidentes cardiovasculares, câncer, acidente vascular cerebral, arterosclerose, enfermidades hepáticas, dentre outros, pode ser minimizada através de bons hábitos alimentares. Embora muito se conheça sobre os benefícios proporcionados por compostos prebióticos, e muito se explore no sentido de criação de novas substâncias para o mercado, pouco se conhece a respeito do mecanismo de ação direta desses sobre a membrana celular e seus constituintes, bem como da matriz extracelular, contato molecular primário de processos bioquímicos de transdução de sinal. Os mecanismos de ação de prebióticos são conhecidos apenas em nível tissular e celular, a grande maioria pertinente à atividade antimicrobiana que esses apresentam. Não obstante, são conhecidos efeitos imunomoduladores, anti-inflamatórios, metabólicos e inibitórios da apoptose celular, cujos mecanismos de ação não levam em conta a plasticidade bioenergética e adaptação biofísica de bicamadas lipídicas. Desses, efeitos antimicrobianos e antiinflamatórios foram identificados com o uso tópico de prebióticos. Nesse sentido, no primeiro capítulo o presente trabalho tem como objetivo o estudo da interação de oligossacarídeos prebióticos com bicamadas lipídicas, tais como o apresentado em sistemas biomiméticos (s-BLM), aplicando as técnicas de voltametria cíclica e espectroscopia de impedância eletroquímica. Efeitos diretos percebidos nas propriedades elétricas de membranas celulares podem abrir novos conceitos para elaboração de fármacos, relacionados ou não ao emprego medicinal de prebióticos, além de contribuir para a elucidação de mecanismos de ação desses compostos em nível molecular. O segundo capítulo tem como objetivo a otimização de um eletrodo de pasta de carbono modificada para detecção de carboidratos em geral incluindo alguns

oligossacarídeos. A voltametria cíclica e espectroscopia de impedância eletroquímica como técnicas de estudos para essa análise apresentam vantagens de rápida aquisição de dados, baixo custo, simplicidade de execução e equipamento pouco oneroso, se comparada a outras técnicas de determinação.

CAPITULO 1

ESTUDO DA INTERAÇÃO DE
OLIGOSSACARÍDEOS PREBIÓTICOS COM
MEMBRANAS DE BICAMADA LIPÍDICA
SUPORTADA EM ELETRODO DE PLATINA POR
VOLTAMETRIA CÍCLICA E ESPECTROSCOPIA
DE IMPEDÂNCIA ELETROQUÍMICA

2 OBJETIVOS

O objetivo geral desse capítulo foi avaliar os efeitos de interação de oligossacarídeos prebióticos em membranas de bicamada lipídica suportada em eletrodo de platina, usando como ferramentas técnicas eletroquímicas de voltametria cíclica e espectroscopia de impedância eletroquímica.

Com relação a parte experimental adotou o seguinte delineamento:

- ✓ Construção de um eletrodo de platina simples;
- ✓ Formação da s-BLM na superfície do eletrodo de Pt de forma reprodutível para realização dos estudos de interação;
- ✓ Avaliação da espessura da s-BLM formada no eletrodo de Pt;
- ✓ Avaliação do efeito do tempo de interação dos oligossacarídeos em estudo frente a s-BLM;
- ✓ Avaliação do efeito da concentração dos oligossacarídeos prebióticos na interação com s-BLM;
- ✓ Elucidação de possíveis mecanismos de ação dos oligossacarídeos prebióticos sobre membranas;

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 ALIMENTOS FUNCIONAIS

Ainda não existe um consenso mundial a respeito do conceito de alimentos funcionais (AF). A definição mais corriqueira afirma, em linhas gerais, que são alimentos ou componentes cujos benefícios vão além da nutrição básica.

Segundo o International Life Sciences Institute North America Food Component Reports, os alimentos capazes de promover um ou mais benefícios à saúde, além da nutrição básica, são considerados Alimentos Funcionais. Tais benefícios adicionais promovidos por esses alimentos ocorrem em virtude da presença de componentes fisiologicamente ativos¹.

Segundo Roberfroid², um alimento pode ser considerado funcional se for demonstrado que o mesmo pode afetar benéficamente uma ou mais funções alvo no corpo, além de possuir os efeitos nutricionais, de maneira que seja tanto relevante para o bem-estar e a saúde quanto para a redução do risco de uma doença. Os alimentos funcionais são alimentos que provêm a oportunidade de combinar produtos comestíveis de alta flexibilidade com moléculas biologicamente ativas, como estratégia para consistentemente corrigir distúrbios metabólicos³, resultando em redução dos riscos de doenças crônicas degenerativas⁴ e manutenção da saúde⁵.

Baseado em uma definição que alimentos funcionais são alimentos acrescidos de ingredientes com um ou mais benefícios a saúde, o mercado global de alimentos funcionais foi estimado em pelo menos 33⁶ e 48⁷ bilhões de dólares nos EUA, respectivamente nos anos de 2000 e 2002. Este é considerado o maior segmento do mercado, seguido pela Europa e Japão. Estima-se que o valor do mercado global esteve por volta de 61 bilhões de dólares em 2004 com taxa anual de crescimento de 11%.

Comparado ao mercado total de alimentos, estima-se que nos EUA o mercado de alimentos funcionais ocupou entre 2 a 3% no ano de 2004 atingindo o dobro em 2008⁸.

Não é surpreendente que no Japão, considerado o local de nascimento dos alimentos funcionais, o mercado desses produtos seja significativo. No total, mais de

1700 produtos de alimentos funcionais foram lançados no Japão entre 1988 e 1998, com uma estimativa ao redor 14 bilhões de dólares em 1999. O mercado foi estimado em US\$ 5 bilhões em 2003 e US\$ 5,73 bilhões em 2006.

Já o mercado europeu para alimentos funcionais esteve entre US\$ 4 e 8 bilhões em 2003, dependendo de quais alimentos eram considerados funcionais. Esse valor aumentou em torno de US\$ 15 bilhões antes de 2006. A parte do mercado atual de alimento funcional ainda está abaixo de 1% do mercado total de alimento e bebidas. Alemanha, França, o Reino Unido e a Holanda representam os países mais importantes dentro do mercado europeu de alimentos funcionais⁹.

Segundo a Associação Brasileira das Indústrias da Alimentação (ABIA) em 2005, o mercado de alimentos funcionais brasileiro foi avaliado em US\$ 600 milhões. Esse mesmo órgão informa que o cenário nacional de produtos “diet & light”, presentes no mercado desde o início da década de 90, atingiu vendas anuais de US\$ 4,2 bilhões, em 2005. Desse volume, o mercado de produtos funcionais representou 14% e na indústria de alimentos, 0,8% do total. Sendo assim, juntos, os segmentos de “diet & light” e funcionais somam 6,3% do volume de vendas da indústria brasileira da alimentação.

Os alimentos funcionais são dispostos em diversas classes, onde as principais constituem alimentos sulfurados, nitrogenados, vitaminas antioxidantes¹¹, compostos fenólicos¹⁰, ácidos graxos poliinsaturados¹¹, fibras, probióticos e prebióticos (revisado na referência 12).

A definição internacional atualmente aceita é de que os probióticos são microrganismos vivos, administrados em quantidades adequadas, que conferem benefícios à saúde do hospedeiro, com a controvérsia contínua sobre se as culturas devem ser viáveis para eficácia em todos os casos. Em um intestino adulto saudável, a microflora predominante se compõe de microrganismos promotores da saúde, em sua maioria pertencente aos gêneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*¹¹. Os iogurtes e leites fermentados são os alimentos mais comuns a serem suplementados com probióticos. Os leites não fermentados, sucos e outros alimentos também podem ser suplementados com probióticos.

Os prebióticos incluem oligossacarídeos não digeríveis, porém fermentáveis, cuja função envolve mudar a atividade e a composição da microbiota intestinal com a perspectiva de promover a saúde do hospedeiro. São conhecidos como benefícios proporcionados pelos prebióticos o controle e estabilização da microbiota intestinal

após o uso de antibióticos, promoção da resistência gastrintestinal à colonização por patógenos, diminuição da concentração dos ácidos acético e láctico de bacteriocinas e outros compostos antimicrobianos, promoção da digestão da lactose em indivíduos intolerantes à lactose, estimulação do sistema imune, alívio da constipação e aumento da absorção de minerais e vitaminas¹².

As fibras dietéticas e os oligossacarídeos não digeríveis são os principais substratos de crescimento dos microrganismos dos intestinos. Os prebióticos estimulam o crescimento dos grupos endógenos de população microbiana, tais como as *Bifidobactérias* e os *Lactobacillos*, que são ditos como benéficos para a saúde humana.

Alguns efeitos atribuídos aos prebióticos são: a modulação de funções fisiológicas chaves, como a absorção de cálcio, o metabolismo lipídico, a modulação da composição da microbiota intestinal, a qual exerce um papel primordial na fisiologia intestinal e a redução do risco de câncer de cólon². Os prebióticos mais eficientes podem reduzir a atividade de organismos potencialmente patogênicos².

Quimicamente os fruto-oligossacarídeos (FOS) são formados por oligômeros de frutose (1-kestose, nistose e frutofuranosil nistose em que as unidades de frutossil são ligadas na posição $\beta(2-1)$ da sacarose, o que os distingue de outros oligômeros). Esse tipo de ligação confere aos FOS a resistência à digestão ou hidrólise digestiva. O grau de polimerização (GP), definido pelo número de unidades de monossacarídeos é usado para definir e classificar as moléculas de fruto-oligossacarídeos de chicória (FOC) e inulina (IN), sendo que os FOC apresentam $GP < 10$ e a Inulina GP de 10 a 60¹³. A Figura 1 representa de forma geral a estrutura de FOC e IN. Devido a esses graus de polimerização a inulina apresenta baixa solubilidade em água, enquanto os FOC são altamente higroscópicos. Na Figura 2 está representada a estrutura conformacional da inulina.

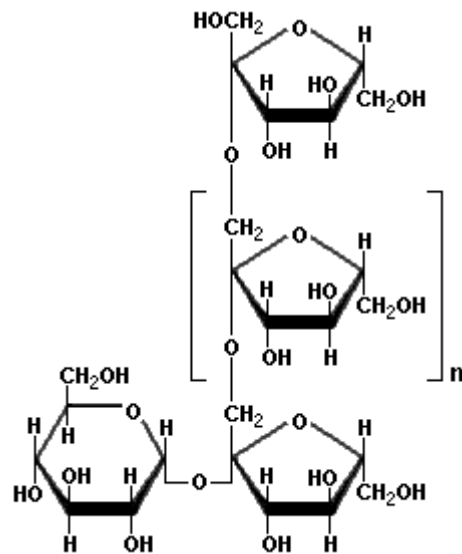


Figura 1 – Representação da estrutura simplificada para fruto-oligossacarídeos.

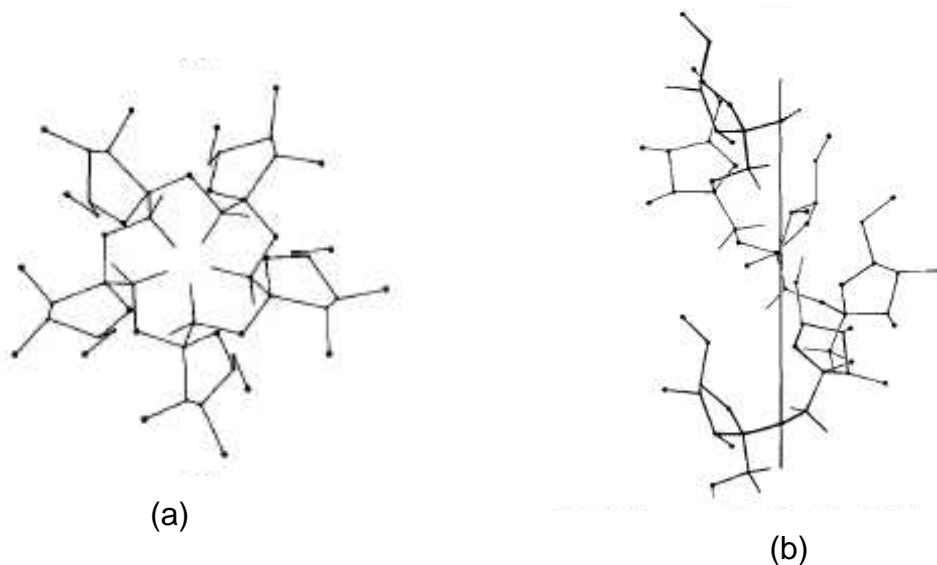


Figura 2 – Representação da estrutura conformacional da Inulina. Cadeia em (a) plano X-Y, (b) plano Y-Z¹⁴.

Na Figura 3 está representada a estrutura proposta por Kooiman, P.¹⁵ para o quefirano de origem láctea. Esse quefirano contém somente D-glicose e D-galactose em uma proporção 1:1. Quefiranos cultivados em meio aquoso apresentam na estrutura glicose, ramnose, galactose e arabinose na proporção 4:2,4:1:2.6¹⁶.

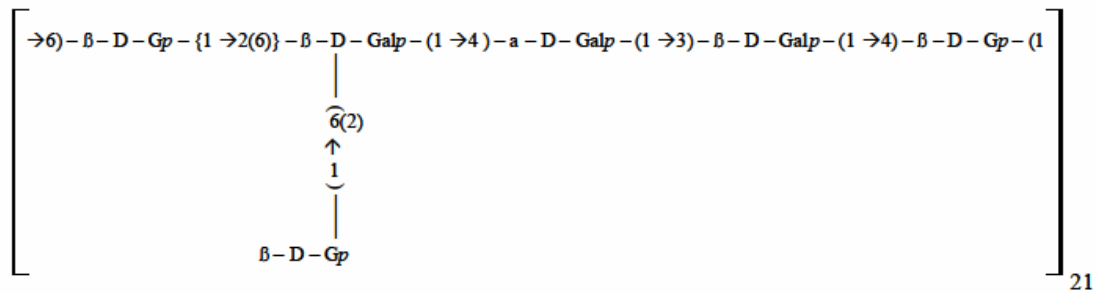


Figura 3 – Estrutura química proposta para o quefirano originado de grãos de quefir em meio lácteo¹⁵.

Esses carboidratos têm apresentado diversos benefícios à saúde. Para o quefirano já foram relatados efeitos na supressão do aumento da pressão sanguínea após 30 dias de tratamento em ratos com hipertensão induzida¹⁷, a redução do estresse, uma vez que apresentam atividades sobre a produção de β -interferon, cortisol e noradrenalina¹⁸, aumento da atividade fagocítica de macrófagos peritoneais e pulmonares,¹⁹ e aumento de células IgA nestes sítios,²⁰ atividade antitumoral,²¹ atividade antimicrobiana,²² atividade anti-inflamatória¹⁶, efeito preventivo sobre diarreias associadas a antibióticos, e favorecimento da flora intestinal normal, protegendo-a contra patógenos exógenos e mantendo seu balanço, entre outras.

Fruto-oligossacarídeos e inulina de chicória têm apresentado habilidades em diminuir a quantidade de lipídeos do sangue, estabilizar a concentração de glicose e proporcionar o aumento do crescimento de bifidobactérias e lactobacilos que melhoram o ambiente intestinal,^{23,24,25} aumento da freqüência de evacuações em voluntários saudáveis²⁶, entre outras.

3.2 BICAMADA LIPÍDICA

A bicamada lipídica compreende a estrutura fundamental de todas as biomembranas. O reconhecimento da bicamada lipídica como um modelo para biomembranas existe há 75 anos ou mais. A origem do conceito bicamada lipídica, entretanto, é muito mais antiga sendo conhecida a mais de três séculos. Tudo começou com o físico e inventor Robert Hooke, que em 1665 implementou o termo célula para descrever uma unidade de estrutura de uma fatia de cortiça que

observou com seu microscópio primitivo. Por acaso, o mesmo Robert Hooke também estudou bolhas de sabão sob o microscópio, e descreveu como observação em 1672 que apareciam em filme de sabão, inicialmente branco, buracos negros que cresciam até ficarem grandes e evidentes. Posteriormente, Isaac Newton estimou a espessura desses com valor de 9,5 nm, o que está de acordo com medidas atuais²⁷ de bicamadas de membrana.

A observação inicial de "buracos negros" nos filmes de sabão teve uma grande influência no desenvolvimento do conceito de bicamada lipídica de biomembranas e sua realização experimental posterior em membranas de bicamada lipídica (bicamadas lipídicas planas e lipossomas esféricos). Neste contexto, muitas são as discussões recentes sobre as automontagens de moléculas (sistemas auto-organizados), ou seja, a agregação de moléculas em estruturas mais ordenadas de forma termodinamicamente estáveis.

Os compostos anfífilos como fosfolipídios podem se auto-organizar ou se auto-montar em estruturas supramoleculares de emulsões, micelas e membranas de bicamada lipídica (lipossomos, membrana de bicamada lipídica planar e esférica). A termodinâmica favorece a auto-organização. Se moléculas anfífilas de fosfolipídios (fosfatidilcolina, por exemplo, PC) estão na água, as cadeias de hidrocarbonetos possuem tendência natural de ir se "afastando" da solução aquosa. Todas as moléculas podem ir para o topo da solução (como o óleo sobre a água), ou podem ter as cadeias apolares apontadas uma para a outra. Com as cadeias de hidrocarbonetos apontadas umas para as outras, as moléculas anfífilas de fosfolipídios podem formar duas configurações diferentes. No primeiro caso pode-se formar uma micela, que pode ser descrito como uma bola com os lipídios onde os grupos polares ficam voltados para o exterior, e as cadeias de hidrocarbonetos apontadas umas para as outras no interior. Em outro caso, os átomos e moléculas podemos se arranjar na superfície da solução ou na interface entre uma solução e um solvente diferente. Na Figura 4 pode observar os tipos principais de estruturas auto-organizadas de lipídeos. Gibbs, Laplace e Young formularam os princípios básicos da química interfacial. O primeiro formulou a termodinâmica de interfaces, enquanto o segundo introduziu o conceito de tensão superficial. A natureza dos fenômenos interfaciais é inerentemente interdisciplinar envolvendo a Física, Química, Biologia e Engenharia.

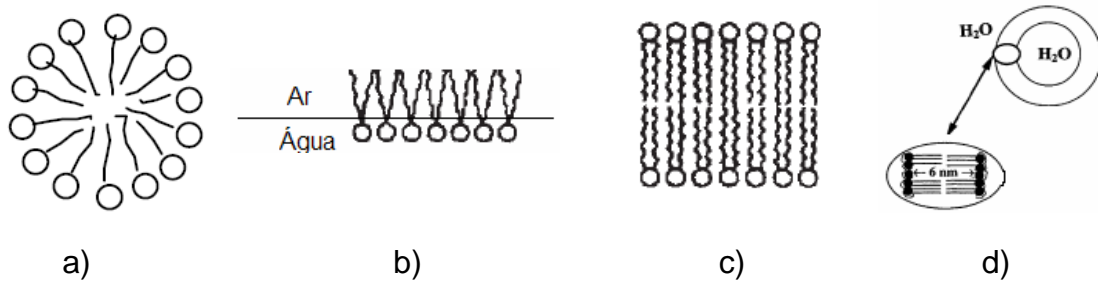


Figura 4 – Representação de estruturas auto-organizadas: (a) micela normal; (b) moléculas de lipídeos organizadas na interface água-ar; (c) bicamada de lipídeos e (d) lipossomo.

3.3 INTERAÇÃO DE MOLÉCULAS COM MEMBRANA E AS FERRAMENTAS UTILIZADAS NESSES ESTUDOS

Alguns compostos fisiologicamente ativos são moléculas anfífilas possuindo um grupo hidrofílico solúvel em água e um grupo hidrofóbico, que podem mostrar efeitos de atividade na estrutura e nas propriedades dinâmicas de membranas por meio de interações. Muitos fenômenos inflamatórios estão correlacionados com a superfície de membranas das células que também atuam como uma barreira encontrada durante o processo de tratamento. A interação de substâncias ativas com superfície de membranas proporciona, entre outros efeitos, mudança na organização, fluidez, alterações na permeabilidade, distribuição da membrana e até a solubilização que muitas vezes está relacionada com os efeitos colaterais de drogas. Desse modo, o estudo da atividade de algumas substâncias com membranas formadas de lipídeos pode proporcionar o entendimento do mecanismo de ação dessas substâncias frente a biomembranas²⁸.

A determinação e quantificação dos vários efeitos de fármacos em membranas e vice-versa é uma condição prévia para a compreensão da ação da droga. Correlacionando o efeito da droga em membranas de composição diferente com as propriedades estruturais de drogas, pode-se conduzir a informações novas. Parâmetros físico-químicos ou espectrais que descrevam a força ou tipo de interação também podem ser usados como “limitação” no processo de modelagem da orientação conformacional da droga no ambiente das membranas. Os métodos físicos freqüentemente usados para a investigação de eventos ou combinações de eventos que conduzem a mudanças nas propriedades da membrana ou conformação

da droga, orientação, e localização no ambiente da membrana são: cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), deslocamento de $^{45}\text{Ca}^{+2}$ em monocamada de fosfolípidios, Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC), Fluorescência, Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FT-IR), Difração de Raio-X e de Nêutrons, Espectrometria de Ressonância de Spin Eletrônico (ESR), Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN), Voltametria Cíclica, entre outras e combinação de técnicas²⁹. Entre as combinações de técnicas, a combinação de Voltametria Cíclica e Espectroscopia de Impedância Eletroquímica (EIS) têm sido empregadas com sucesso na avaliação da interação molécula-membrana com vantagens de alta reprodutibilidade e simplicidade, quando comparada a outras técnicas.

3.4 VOLTAMETRIA

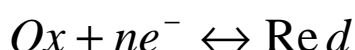
A voltametria é uma técnica eletroanalítica que se baseia nos fenômenos que ocorrem na interface entre a superfície do eletrodo de trabalho e a camada fina de solução adjacente a essa superfície que é classificada como dinâmica. Essa técnica compreende um grupo de métodos eletroanalíticos onde a informação sobre o analito é observada através de medidas de corrente em função do potencial aplicado, ou vice e versa, e em condições que estimulem a polarização de um eletrodo indicador ou de trabalho. Para aumentar a polarização, tem-se usado microeletrodos como eletrodos de trabalho. Esses microeletrodos possuem áreas superficiais máximas de alguns poucos milímetros quadrados e, em algumas aplicações, de poucos micrômetros quadrados ou menos. As técnicas voltamétricas subdividem em voltametria (polarografia) de varredura linear, voltametria por pulso diferencial, voltametria de onda quadrada, voltametria cíclica, voltametria de redissolução e voltametria adsortiva de redissolução³⁰.

A voltametria é largamente usada pelos químicos inorgânicos, físico-químicos e bioquímicos para finalidades não analíticas, incluindo estudos fundamentais de processos de redução e oxidação em vários meios, processos de adsorção em superfícies e mecanismos de transferências de elétrons em superfícies de eletrodos quimicamente modificados. Várias são aplicações analíticas nas áreas ambiental,

alimentícia e farmacêuticas, entre outras³¹. No entanto, a aplicação de voltametria na elucidação de mecanismo de ação de substâncias sobre BLM ainda encontra-se pouco difundida, porém com perspectivas de aumento significativo devido às diversas vantagens inerentes das técnicas voltamétricas.

A voltametria cíclica é a técnica comumente usada para adquirir informações qualitativas e quantitativas sobre os processos eletroquímicos. A eficiência dessa técnica resulta em habilidade em rapidamente fornecer informações sobre a termodinâmica de processos redox, da cinética de reações heterogêneas de transferência de elétrons, e sobre reações químicas acopladas a processos adsorptivos³⁰. Na voltametria cíclica o potencial aplicado varia com o tempo linearmente, chegando ao valor final de potencial e em seguida ao potencial inicialmente aplicado.

Um exemplo de processo eletroquímico que ocorre na interface eletrodo solução está representado na reação abaixo:



Onde Ox é a forma oxidada com carga, Red é a forma reduzida com carga e ne^{-} é o número de elétrons envolvidos no processo de oxi-redução³².

A etapa inicial da voltametria cíclica proporciona a formação da dupla camada elétrica próxima a superfície do eletrodo. Posteriormente, quando é atingido o potencial de oxidação da espécie eletroativa Red a corrente cresce rapidamente. O aumento da camada de depleção, que ocorre em seguida, reduz o processo de difusão. Esse processo é determinante no transporte das espécies eletroativas à superfície do eletrodo e, conseqüentemente, observa-se uma diminuição da intensidade de corrente. Após a inversão do sentido da varredura de potencial, inicia-se a redução catódica da espécie Ox produzida na etapa anterior.

A resposta do sistema eletroquímico à perturbação depende da velocidade de varredura e do intervalo de potencial estudado. Por exemplo, com o aumento da velocidade de varredura de potencial há menor tempo para as espécies eletroativas alcançarem o equilíbrio na superfície do eletrodo e, assim, reações que parecem reversíveis a baixas velocidades de varredura podem ser quase-reversíveis a altas velocidades. Isso faz com que a voltametria cíclica seja uma técnica bastante

versátil no estudo de mecanismos de reações e de identificação de espécies em solução³².

Considerando-se que a reação, não seja precedida nem seguida por uma reação química e que a solução não é agitada e possua um excesso de eletrólito suporte para evitar efeito da migração, os processos possíveis no sistema global são a reação de transferência de carga e a difusão. A corrente que atravessa o eletrodo é determinada pelo transporte da espécie eletroativa à interface (condutor iônico/condutor de elétrons). Considerando que as concentrações são uniformes em toda a solução antes de iniciada a eletrólise, e que há a condição linear semi-infinita, teremos um processo eletroquímico limitado por difusão ou por transferência de carga³³.

Nos processos limitados por difusão considera-se que a velocidade do processo de transferência de elétron é maior que a de transporte de massa. Assim, em todos os potenciais e velocidade de varredura, o processo de transferência de elétrons na superfície está em equilíbrio, e observa-se que a corrente de pico (I_p / A) é proporcional à concentração da espécie eletroativa ($c_0 / \text{mol.cm}^{-3}$), à raiz quadrada da velocidade de varredura ($v / \text{V.s}^{-1}$), do coeficiente de difusão da espécie eletroativa ($D_0 / \text{cm.s}^{-1}$) e da área do eletrodo (A / cm^2) como exposto na equação de Randles-Sevcik para sistemas reversíveis:

$$I_p = 2,69 \times 10^5 n^{3/2} A D_0^{1/2} c_0^\infty v^{1/2}$$

Nota-se também que a corrente de pico cresce linearmente com a raiz quadrada da velocidade de varredura ($v^{1/2}$). Em sistemas reversíveis, a razão entre as correntes de pico catódico e anódico é igual a uma unidade e independe da velocidade de varredura de potencial. Nos voltamogramas experimentais, um dos testes de reversibilidade do sistema consiste na elaboração de um gráfico I_p em função de $v^{1/2}$, que deve ser linear e passar pela origem, ou alternativamente deve resultar numa relação ($I_p / v^{1/2}$) constante. Se essa condição for satisfeita, outros métodos devem ser testados para confirmar a reversibilidade do processo. Entre eles, a invariância do potencial de pico (E_p) com a variação da velocidade de varredura. Assim temos que, para um sistema reversível, E_p não deve variar com v , $\Delta E_p = E_{pa} - E_{pc} = 59/n \text{ mV}$ (a 298K), $I_p \propto v^{1/2}$, $|I_{pa} / I_{pc}| = 1$, independente de v e $(E_{pc} - E_{p/2c}) \cdot n = 59 \text{ mV}^{32}$.

Para processos limitados pela transferência de cargas, a velocidade de transferência de elétrons é insuficiente para manter o equilíbrio nernstiano na superfície do eletrodo, ocasionando alterações no formato dos voltamogramas cíclicos, em relação aos dos sistemas reversíveis. Quando em baixas velocidades de varredura, a velocidade de transferência de elétron é maior que a de transferência de massa, e é encontrado um voltamograma cíclico reversível. Com o aumento da velocidade de varredura, a velocidade do transporte de massa torna-se comparável à velocidade de transferência de elétrons. Conseqüentemente ao aumento de v , tem-se um aumento na separação dos picos catódico e anódico (ΔE_p). Em sistemas totalmente irreversíveis o pico inverso não é observado e E_p varia com a velocidade de varredura segundo a equação³⁴:

$$E_p^c = K - \left(\frac{2,3RT}{2\alpha_c n_\alpha F} \right) \log v$$

onde:

$$K = E^0 - \frac{RT}{\alpha_c n_\alpha F} \left[0,78 - \frac{2,3}{2} \log \left(\frac{\alpha_c n_\alpha F D}{K^0 RT} \right) \right]$$

sendo que K a constante de equilíbrio, E^0 o potencial formal padrão (V), R a constante dos gases, α_c o coeficiente de transferência de carga, F a constante de Faraday ($C \cdot mol^{-1}$), K^0 a constante cinética de heterogeneidade padrão e n_α o número de elétrons envolvidos na etapa determinante da reação. Dessa equação observa-se que, a 25 °C, o potencial de pico catódico altera-se negativamente de $30/(\alpha_c n_\alpha)$ mV para cada variação de dez unidades em v . Temos então que, para identificar o comportamento irreversível do sistema, deve-se observar os seguintes critérios: o pico inverso não deve aparecer no voltamograma, $I_p^\infty \propto v^{1/2}$, E_p^c altera-se $30/(\alpha_c n_\alpha)$ mV para variação de dez unidades em v (298K) e $|E_p/E_{p/2}| = 48/(\alpha_c n_\alpha)$ mV (a 298K)³².

Alguns processos que são reversíveis a baixas velocidades de varredura que se tornam irreversíveis para altas velocidades de varredura e passam por uma região conhecida como quase-reversível para valores intermediários, são limitados simultaneamente pela transferência de cargas e por difusão. A transição de

reversibilidade ocorre quando a velocidade relativa de transferência de elétron comparada a de transporte de massa é insuficiente para manter o equilíbrio nernstiano na superfície do eletrodo. Na região de quase-reversibilidade, tanto a velocidade de transferência de elétron quanto a velocidade de transporte de massa contribuem para a corrente observada no voltamograma. Nessa região, I_p não é proporcional a $v^{1/2}$. Dessa forma temos que, para sistemas quase-reversíveis o ΔE_p aumenta com o aumento de v , $E_{pa} - E_{pc}$ aproxima-se de $(59/n)$ mV com a diminuição de v (a 298K), I_p aumenta com $v^{1/2}$ de forma não proporcional, $|I_p^a / I_p^c| = 1$ quando $\alpha_c = \alpha_a = 0,5$ e E_p^c desloca-se para valores mais negativos com o aumento de v .

Todos os processos de cinética de eletrodo heterogênea são descritas pela equação de Butler-Volmer:

$$i = F A k^0 [C_O(0,t) e^{-\alpha f (E-E^{0'})} - C_R(0,t) e^{(1-\alpha) f (E-E^{0'})}]$$

Quando a célula eletroquímica está em equilíbrio i_c é igual a i_a que corresponde à corrente de troca (i_0). Nesse caso a equação pode ser expressa de forma simplificada como:

$$i_0 = F A k^0 C_O^{*(1-\alpha)} x C_R^{*\alpha}$$

onde C_j^* (mol cm^{-3}) é a concentração para a espécie j na solução. A corrente de troca (i_0) pode ser obtida experimentalmente a partir do gráfico de Tafel (Figura 5). Esse gráfico é a representação do logaritmo da resposta de corrente obtida experimentalmente em função do sobrepotencial (η). Conhecendo-se as concentrações das espécies na solução e obtendo-se o valor de i_0 pelo método gráfico de Tafel é possível calcular o valor da constante padrão de heterogeneidade (K^0) que pode ser utilizada para a compreensão da cinética de transferência de elétrons na interface eletrodo solução³².

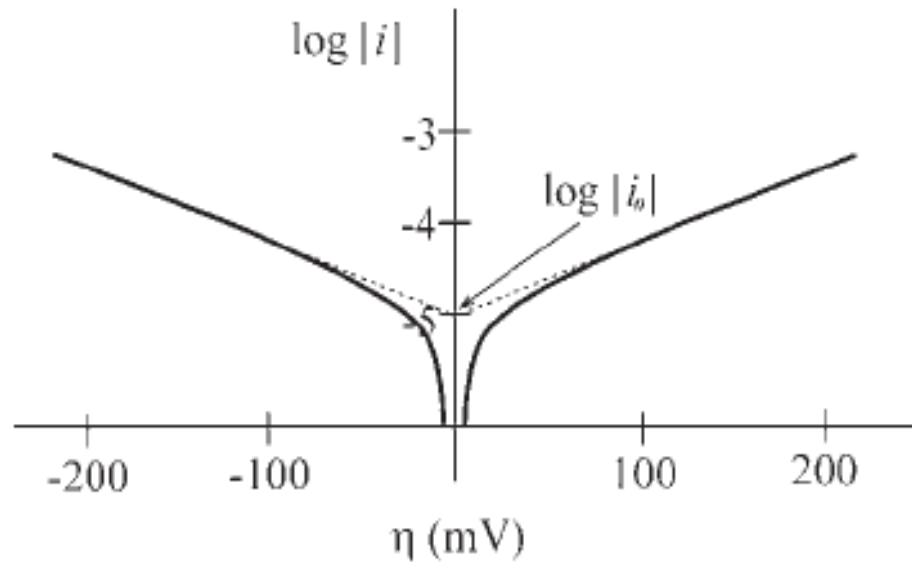


Figura 5 – Gráfico de Tafel (extraído da referência 32).

3.5 VOLTAMETRIA CÍCLICA NO ESTUDO DA INTERAÇÃO DE SUBSTÂNCIAS COM MEMBRANAS DE BICAMADA LIPÍDICA SUPORTADA (S-BLM)

As membranas biológicas possuem alta complexidade. Devido a isso, há grande interesse no uso de modelos que imitem as membranas celulares (aplicação de membranas biomiméticas). Os modelos mais estudados incluem vesículas de lipídeos, monocamada de Langmuir-Blodgett, filme de lipídeo fundido, membrana de bicamada lipídica (*do inglês: bilayer lipid membrane – BLM*), membrana de bicamada lipídica suportada (*do inglês: supported bilayer lipid membrane – s-BLM*). Entre essas, a s-BLM destaca-se uma vez que o substrato sólido utilizado como suporte proporciona maior estabilidade à sua estrutura frágil, sem que cause alterações nos seus aspectos funcionais. Além disso, as s-BLM destacam-se devido à facilidade e reprodutibilidade de preparação, estabilidade mecânica em longo prazo e disponibilidade para análise eletroquímica e detecção em superfície³⁵. Assim, usando-se um suporte sólido com alta estabilidade em diversos meios eletrolíticos e alta capacidade de adsorção de espécies orgânicas e inorgânicas como a Pt, pode-se realizar uma sondagem dos efeitos de interação proporcionados por algumas substâncias frente a s-BLM³⁶. A avaliação dos efeitos de substâncias frente a s-BLM é conduzida usando-se um marcador eletroquímico. Nesses estudos, avaliam-se a

penetração de íons sondas na s-BLM antes e após a interação com substâncias. Os marcadores eletroquímicos ao atingirem o suporte sólido são oxidados ou reduzidos durante a varredura de potencial. Assim, informações da interação substância-BLM são traduzidas em sinais eletroquímicos.

Em um de seus trabalhos, Du, L.³⁷ e colaboradores mostraram a interação de ibuprofeno com BLM suportado em eletrodo de carbono vítreo (ECV). No estudo de interação, eles avaliaram os efeitos da concentração de ibuprofeno e os voltamogramas cíclicos estão representados na Figura 6. A partir desses resultados os autores sugeriram o possível mecanismo de ação do ibuprofeno sobre a s-BLM. Segundo eles, em baixas concentrações de ibuprofeno os picos de corrente anódicos e catódicos (I_{p_a} e I_{p_c}) diminuíram e a separação dos picos, $\Delta E_{p_{ac}}$, aumentou em comparação ao da s-BLM sem interação indicando que houve uma estabilização da membrana proporcionando a diminuição da permeação dos íons marcadores de $Ru(NH_3)_6^{+3}$ pela s-BLM e, conseqüentemente, a diminuição de I_p e aumento de $\Delta E_{p_{ac}}$. Em concentrações maiores, houve um aumento dos valores de I_p e uma diminuição dos valores de $\Delta E_{p_{ac}}$, o que mostrou que o aumento da concentração de ibuprofeno proporciona a formação de poros e até mesmo a solubilização da s-BLM. Esse efeito foi considerado pelos autores como semelhante ao “efeito detergente”. Um estudo semelhante foi realizado por Laputková, G. e Sabo, J.³⁸ que avaliaram por VC o efeito da concentração de glicose e insulina sobre BLM modificada com ácido antraquinona-2-sulfônico e suportada em eletrodo de platina.

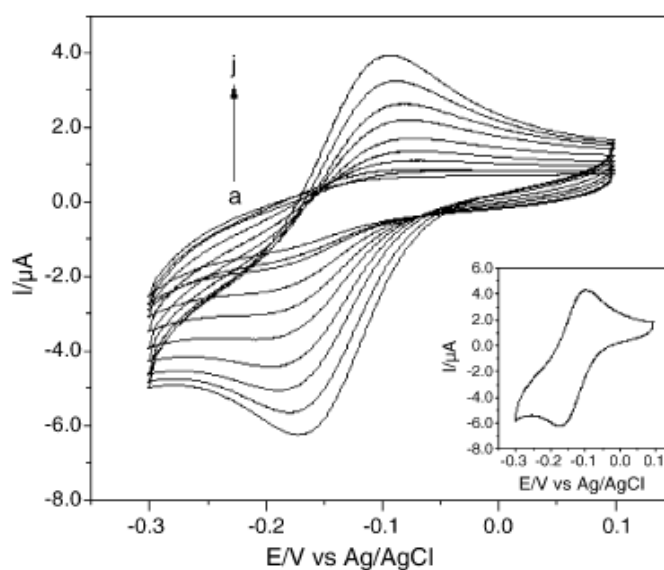


Figura 6 – Voltamogramas cíclicos para o ECV modificado com BLM em solução de 0,5 mM de $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6^{3+}$ em 0,1 M de KCl após interação com: (a) 0,5 mM, (b) 0,0 mM, (c) 1,0 mM, (d) 1,8 mM, (e) 2,6 mM, (f) 3,4 mM (g) 4 mM, (h) 4,5 mM, (i) 6mM e (j) 10 mM de ibuprofeno. Inseto: Voltamograma cíclico do ECV não modificado. Velocidade de varredura de potencial: $50\text{mV}\cdot\text{s}^{-1}$ ³⁷.

Liu, Xiaohua e co-autores³⁹ investigaram a interação de surfactina, ácido lipopeptídico de caráter anfifílico, com s-BLM por meio de técnicas eletroquímicas. No estudo foi avaliado o efeito proporcionado pelo tempo de interação da substância, bem como o efeito da concentração de surfactina. Verificou-se como mecanismo de ação que, inicialmente, a surfactina insere-se na membrana e posteriormente proporciona a formação de poros causando no estágio final de interação a destruição da s-BLM. Em outro trabalho, Liu, Xiaohua e outros colaboradores⁴⁰ investigaram o comportamento da clorpromazina (CPZ) na interação com s-BLM. Os dados experimentais, baseados na resposta de VC dos íons de $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6^{3+}$ e da oxidação da clorpromazina no eletrodo de carbono vítreo indicaram que a interação de CPZ com s-BLM depende do tempo de interação e da concentração de CPZ. Nesse caso, o efeito de interação foi dividido em três etapas dependentes do tempo. No primeiro estágio, a baixas concentrações de CPZ, há apenas a penetração de pequena quantidade de CPZ na s-BLM e não houve alteração na resposta de VC com aumento do tempo de interação. Na segunda etapa, em concentrações intermediárias de CPZ e no intervalo de tempo de 10 min, houve a formação de defeitos na s-BLM devido à penetração de uma maior quantidade de moléculas de CPZ. Por fim, altas concentrações de CPZ proporcionam a solubilização da s-BLM.

Huang⁴¹, W. e co-autores estudaram o comportamento da concentração da nisina frente a s-BLM. A nisina é um peptídeo antibacteriano positivamente carregado que se liga a membranas negativamente carregadas de bactérias gram-positivas. No presente estudo os autores relataram que a nisina promove a formação de poros na s-BLM e que essa formação de poros é dependente da concentração de nisina. Semelhante ao trabalho de Liu, Xiaohua e outros colaboradores mostraram que em baixas e médias concentrações de nisina há a formação de poros, e em altas concentrações, há um efeito semelhante ao efeito detergente com a solubilização da s-BLM.

Ma, Y. e colaboradores⁴² estudaram a ação do surfactante brometo de hexadeciltrimetilamônio (BHTA) sobre s-BLM. Os resultados mostraram que o BHTA se liga aos íons marcadores de ferri/ferrocianeto facilitando sua transposição pela membrana. Em concentrações mais elevadas o BHTA proporcionou a formação de poros na s-BLM, e causa até mesmo a destruição por completo da s-BLM. Outro resultado interessante mostrou que, quando a s-BLM danificada (portadora de poros) é colocada em solução de KCl 0,1 M os poros são fechados devido ao reajuste (auto-organização) das moléculas de fosfatidilcolina na superfície do eletrodo de Pt. A partir desse resultado, os autores inferiram que o reajuste da s-BLM se deve ao processo reversível de formação da membrana.

Han, X. et al⁴³ avaliaram a interação de íons de lantanídeos com s-BLM usando como marcador eletroquímico os íons $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/-4-}$. Eles verificaram que os íons de lantanídeos causam alterações na conformação da s-BLM e como consequência desta alteração há posteriormente a formação de poros na s-BLM. Os íons de lantanídeos estudados foram o La^{+3} , Tb^{+3} e o Eu^{+3} e todos demonstraram efeitos, dependentes da concentração, sobre a s-BLM.

Em um recente trabalho, Lu, X. e colaboradores⁴⁴ investigaram a ação da quercetina sobre s-BLM. Neste estudo foi verificado que a quercetina proporciona a formação de poros na s-BLM, desestabilizando-a. Segundo Lu, X. este estudo pode ser útil para entender a atividade biológica da quercetina em vivo.

Como verificado, em muitos casos a interação de espécies químicas com bicamadas de lipídeos proporciona a formação de poros. Uma aproximação mais detalhada que permite a quantificação do tamanho dos defeitos levou a usar a suposição que o transporte das espécies redox por difusão controlada ocorre na ordem de microeletrodos. Isso permite aplicação da teoria de Amatore et al⁴⁵. De

acordo com essa teoria, a análise da magnitude e da posição do potencial de oxidação dos íons marcadores com respeito a seu potencial formal em um eletrodo modificado permite obter o raio efetivo do poro através da equação:

$$\theta = 1 - (0.6 i_{\text{lim}} r) / (FACD)$$

onde D é o coeficiente de difusão do íon marcador, concentração da espécie eletroativa, i_{lim} é a densidade de corrente limitante e A a área do eletrodo. F possui seu significado convencional.

Nota-se em todos esses trabalhos que o estudo de s-BLM por voltametria cíclica pode proporcionar informações importantes para se entender parte dos mecanismos de ação de substâncias sobre membranas e que as informações podem evidenciar os mecanismos de ação sobre membranas biológicas uma vez que as s-BLM imitam membranas biológicas.

3.6 ESPECTROSCOPIA DE IMPEDÂNCIA ELETROQUÍMICA

A impedância, de forma generalizada, é a medida de uma resistência. Observa-se desse modo que os fenômenos que ocorrem na interface eletrodo/solução são interpretados utilizando-se elementos elétricos, tais como, resistores e capacitores³³. Esse método envolve a aplicação de uma pequena perturbação, que pode ser do potencial aplicado ou da corrente aplicada ou, em eletrodos hidrodinâmicos, da velocidade de convecção. A aplicação de uma perturbação pequena é muito interessante uma vez que, essas perturbações estão na região limite (pequena), e as soluções das equações matemáticas que as representam, são mais simples⁴⁶.

A impedância eletroquímica fornece geralmente uma forma senoidal que pode diferir em fase e em amplitude do sinal aplicado, e a medida da diferença de fase e amplitude possibilita a análise do processo do eletrodo em termos das contribuições da difusão, da cinética, da dupla camada, de reações homogêneas acopladas, entre outras. Já são conhecidas importantes aplicações para a impedância eletroquímica

como em estudos de corrosão, sólidos iônicos, eletrólitos sólidos, polímeros condutores, interfaces líquido/líquido e, em especial destacamos a aplicação em estudo de membranas⁴⁶.

A espectroscopia de impedância eletroquímica é um método efetivo por avaliar as características de eletrodos com superfícies modificadas. Os espectros de impedância, obtidos quando se varia a frequência, são geralmente apresentados em gráficos de Nyquist, que relacionam a impedância imaginária (Z_{im}) e a real (Z_{re}). Outro tipo de gráfico, o diagrama de Bode, relaciona a impedância ou o ângulo de fase com a frequência, a vantagem desse gráfico é que a dependência com a frequência é mostrada claramente, além do espaçamento logarítmico permitir uma visualização melhor dos processos. No caso de um gráfico de Bode temos que o ângulo de fase de 0° relaciona-se a um resistor puro e o ângulo de 90° relaciona-se a um capacitor puro. Para a impedância de Warburg o ângulo de fase é de 45° , lembrando que esse ângulo é a defasagem entre a tensão e a corrente⁴⁶.

Na Figura 7a-b, apresenta-se exemplo de um circuito RC em série e na Figura 7c-d um circuito RC em paralelo, mostrando o aspecto dos respectivos gráficos Nyquist e de Bode ângulo de fase.

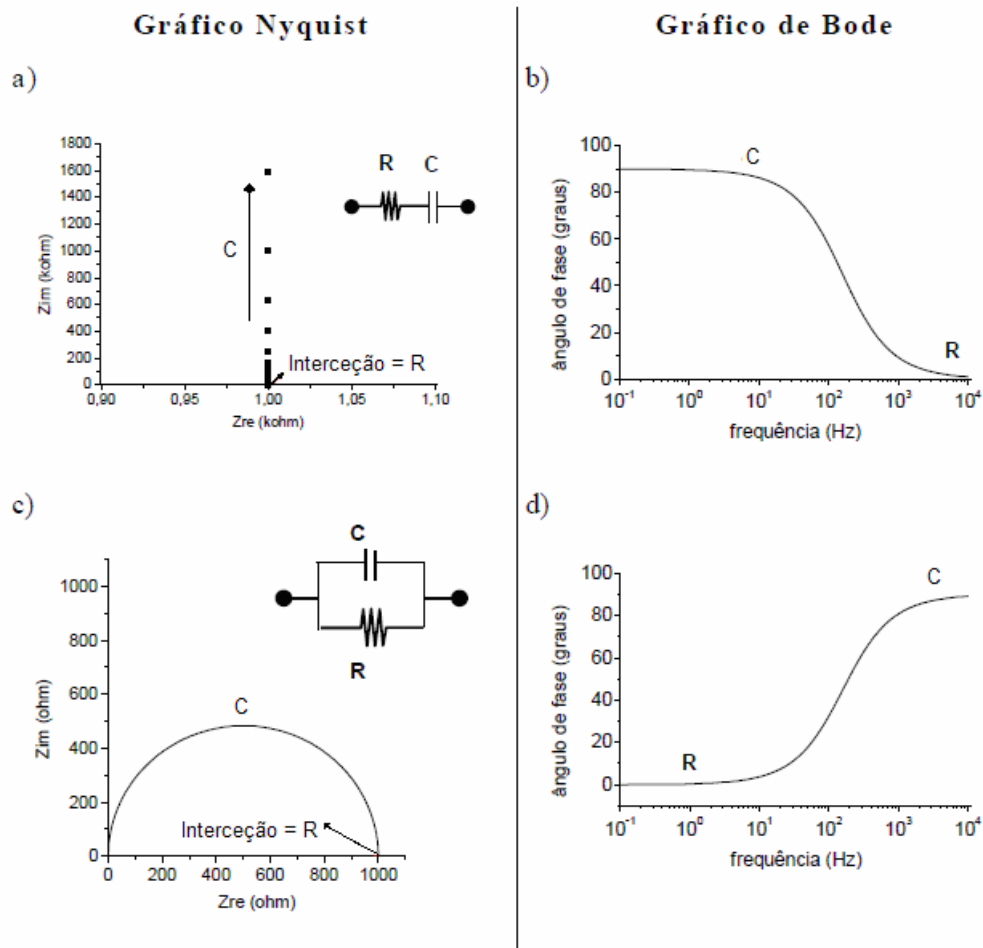


Figura 7 – (a) Gráfico Nyquist de um circuito RC em série, (b) e o seu respectivo gráfico de Bode ângulo de fase, (c) Gráfico Nyquist de um circuito RC em paralelo, (d) e o seu respectivo gráfico de Bode ângulo de fase (retirado da referência 46 com alterações).

A Figura 7 mostra o comportamento de elementos de circuito puros e na Figura 8 apresentam-se os gráficos para o circuito de Randles, que é uma representação típica de uma interface eletrodo/solução, onde além da resistência e da capacitância também se apresenta à impedância de Warburg.

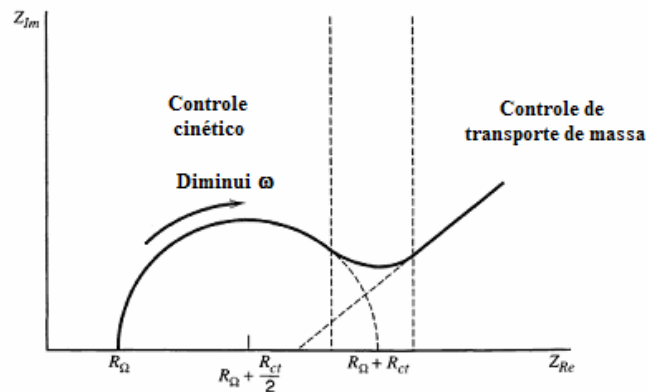


Figura 8 – Gráfico Nyquist para o circuito de Randles⁴⁶.

A análise do gráfico Nyquist mostrado na Figura 8 evidencia duas regiões distintas, uma de controle cinético, em alta frequência e outra de controle de transporte de massa, em baixa frequência. A primeira região é formada por um semicírculo, cujo diâmetro é dado pelos valores de R_{Ω} e R_{ct} . A descrição do semicírculo começa com um deslocamento no eixo x, devido a R_{Ω} e passa por um máximo que é igual $\omega = 1/R_{ct} \cdot C_{dl}$. Na parte linear do gráfico ou na região de controle de transporte de massa observa-se à impedância de Warburg. A inclinação da reta é igual a uma unidade, se somente tiver a influência de Z_W .

3.7 ESPECTROSCOPIA DE IMPEDÂNCIA ELETROQUÍMICA NO ESTUDO DA INTERAÇÃO DE SUBSTÂNCIAS COM MEMBRANAS DE BICAMADA LIPÍDICA SUPOSTADA (S-BLM)

A espectroscopia de impedância eletroquímica é um método efetivo para sondar as características dos eletrodos com superfícies modificadas, e frequentemente é aplicada como uma técnica complementar a voltametria cíclica³⁷. Além disso, é uma técnica conhecida por ser bastante sensível às modificações que ocorrem na interface eletrodo/solução e a adsorção de fosfolipídios para formação da membrana ocorre nessa interface por isso, essa técnica é de grande interesse para estudo da interação de substâncias com s-BLM. Na maioria dos trabalhos a espectroscopia de impedância eletroquímica é utilizada para obtenção da capacitância da membrana e resistência de transferência de elétrons. Indiretamente a partir da capacitância da membrana calcula-se a espessura (d) da s-BLM. A

determinação da espessura da s-BLM é a principal aplicação da espectroscopia de impedância eletroquímica e essa informação permite a comparação com a espessura de membranas biológicas.

Em dois trabalhos distintos P. Diao,⁴⁷ e D. Jiang,⁴⁸ e colaboradores estudaram a interação de íons Ca^{2+} sobre s-BLM por meio de voltametria cíclica e espectroscopia de impedância eletroquímica. Nesses trabalhos a técnica de impedância não foi aplicada como técnica complementar, mas sim, foi utilizada para obter informações tanto sobre a espessura da membrana, como também dos efeitos de interação dos íons Ca^{2+} sobre a s-BLM. A Figura 9 representa três possibilidades estudadas por P. Diao, para transferência de elétrons do par redox sobre em eletrodos cobertos com s-BLM após interação com íons Ca^{2+} . Os resultados sugeriram que os íons Ca^{2+} proporcionam a formação de canais na s-BLM, e que tais canais são formados devido à interação dos íons Ca^{2+} com a cabeça polar das moléculas de fosfolipídios como pode ser observado na Figura 9c. A possibilidade de tunelamento de elétrons sobre a bicamada lipídica ou monocamada lipídica foi considerada pequena. A Figura 10 apresenta o gráfico de Nyquist para o estudo interação de Ca^{2+} com a s-BLM na presença e ausência de EDTA mostrando que o EDTA inibe a ação dos íons Ca^{2+} na s-BLM.

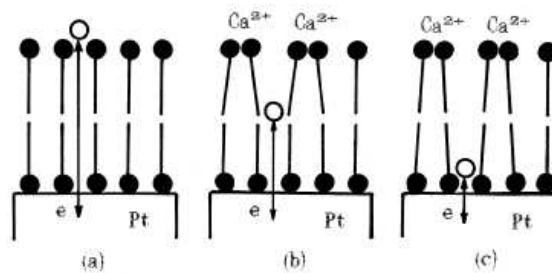


Figura 9 – Esquema representativo das três possibilidades de transferência de elétrons de Pt-BLM em 1mMol.L^{-1} de $\text{Fe}(\text{CN})_6^{-3/4}$ em $\text{KCl } 0,1 \text{ M}$ contendo íons Ca^{2+} . (a) tunelamento eletrônico através da membrana de bicamada lipídica, (b) tunelamento eletrônico através de uma monocamada lipídica, (c) transferência de elétrons na superfície do eletrodo de Pt quando o par redox atravessa por poros na membrana de bicamada lipídica. (o) representa o par redox. (Figura 5 da referência 47)

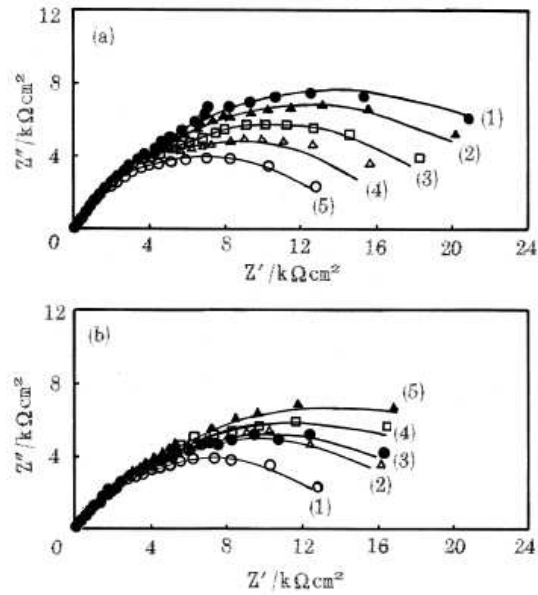


Figura 10 – Gráfico de Nyquist do eletrodo de Pt-BLM em (a) em 1mol.L^{-1} de $\text{Fe}(\text{CN})_6^{-3/4}$ em KCl $0,1\text{ M}$ contendo diferentes concentrações de íons Ca^{+2} : (1) $0,5\text{ mM}$, (2) $1,1\text{ mM}$, (3) $2,4\text{ mM}$, (4) $4,0\text{ mM}$, (5) $7,6\text{ mM}$; (b) em 1mol.L^{-1} de $\text{Fe}(\text{CN})_6^{-3/4}$, KCl $0,1\text{ M}$ e $8,0\text{ mM}$ de Ca^{+2} contendo diferentes concentrações de EDTA: (1) 0 mM , (2) $2,2\text{ mM}$, (3) $4,3\text{ mM}$, (4) $7,8\text{ mM}$ e (5) $12,5\text{ mM}$. (Figura 7 da referencia 47).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 INSTRUMENTAÇÃO

Foi utilizado ao longo do experimento de voltametria cíclica um sistema potenciostato/galvanostato PG-39MCSV, Omnimetra Instrumentos Científicos Ltda (Nova Friburgo, Rio de Janeiro). Para os experimentos envolvendo espectroscopia de impedância eletroquímica foi utilizado o sistema potenciostato/galvanostato AutoLab 128N interfaceado a um microcomputador para controle do potencial e aquisição dos dados. A aquisição e análise dos dados foram realizadas com auxílio do software FRA (Frequency Response Analysis System Software).

4.2 FONTES DE OLIGOSSACARÍDEOS

A inulina e fruto-oligossacarídeos de chicória foram obtidas da empresa Sigma-Aldrich[®] (Stlouis, EUA). As amostras de quefirano usadas foram obtidas por MOREIRA, M.E.C., et. al a partir do cultivo e isolamento com caracterização apresentada em seu trabalho¹⁶. Todas as soluções aquosas foram preparadas em água bi-destilada.

4.3 OUTROS REAGENTES E MATERIAIS

A l- α -fosfatidilcolina, colesterol e o fio de platina foram obtidas da empresa Sigma-Aldrich[®]. Os reagentes, cloroformio, ferricianeto e ferrocianeto de potássio, KCl, n-octanol, α -nafitilamina, éter etílico, ácido sulfúrico e cloreto de níquel, foram obtidos da empresa VETEC[®] (Rio de Janeiro, Brasil). Para polimento do eletrodo e platina foram utilizadas lidas d'água (graduação 400, 1000, 1200 e 2000) adquiridas em lojas de materiais de construção em Alfenas, MG. Todos os demais reagentes

utilizados no desenvolvimento deste trabalho possuem grau analítico e, ainda, todas as soluções foram preparadas utilizando água destilada.

4.4 CONSTRUÇÃO DO ELETRODO DE PLATINA

Para construção do eletrodo de platina (EPt), um fio de platina de 0,5 mm de diâmetro e 1 cm de comprimento foi soldado a um fio de cobre de 0,5 mm de diâmetro e 5 cm de comprimento, e posteriormente foram fixados em um tubo de vidro, de 3 mm de diâmetro interno e 5 cm de comprimento, por meio de mistura de resina epóxi e ácido fluorídrico. Posteriormente a etapa de secagem, o eletrodo foi polido respectivamente com papel abrasivo (lixas d'água) com graduações de 400, 1000, 1200 e 2000. O eletrodo foi polido posteriormente com alumina e foi colocado em solução de H_2SO_4 1,0 mol.L⁻¹ onde foram realizadas medidas de voltametria cíclica para a limpeza final da superfície da platina. A superfície do eletrodo foi limpa a cada dia antes de cada série de experimentos, executando-se réplicas de varredura (por aproximadamente 20 min a 500 mV/s) entre potenciais de adsorção e desorção de hidrogênio (-0,4 a 1,5 V) em soluções de 1,0 mol.L⁻¹ de H_2SO_4 ⁴⁹. A reprodutibilidade da superfície do eletrodo foi conferida medindo-se altura dos picos de oxidação/redução de uma solução de ferricianeto/ferrocianeto de potássio 1mM em KCl 0,1 M.

O eletrodo de referência utilizado foi o de Ag/AgCl/saturado com KCl. Como contra-eletrodo (CE) foi utilizado um eletrodo de platina com área superficial superior a 1,0 mm².

4.5 CALIBRAÇÃO DO POTENCIOSTATO/GALVANOSTATO

O sistema PG-39 foi devidamente calibrado empregando-se o registro elétrico e químico do sinal de corrente obtido em ensaios distintos. Para o primeiro foi conectado às extremidade das garras RE1-WE e RE2-CE um resistor de 100 Ω seguindo-se rampa linear de -0,1 a +0,1 V a 100 mV/s. O recíproco da inclinação do

gráfico de potencial aplicado pela corrente experimental resultante foi contrastada com o valor do resistor empregado.

Para a calibração química foi empregado 5 mL de soluções de ferricianeto de potássio a 5 mM em KCl 1 M, seguindo-se por imersão da superfície de contato dos eletrodos de trabalho (Pt), auxiliar (Pt) e de referência (Ag/AgCl), próximos um do outro, e monitoramento do sinal eletroquímico. Esse foi obtido por voltametria cíclica a 200 mV/s e faixa de -0,2 a +0,6 V. O sinal de reversibilidade característico foi utilizado como critério para análises paramétricas ulteriores dos eletrodos, como potencial de pico anódico e catódico, potencial formal padrão E^0 e separação de picos (ΔE). Os dados de calibração química foram contrastados com valores tabelados da literatura³².

4.6 MÉTODO PARA FORMAÇÃO DA MEMBRANA DE BICAMADA LIPÍDICA SOBRE O ELETRODO DE PT

Uma quantidade previamente medida de l- α -fosfatidilcolina (FC) e colesterol (CL) foram dissolvidos em clorofórmio obtendo uma solução com concentração de 20 mg.mL⁻¹ de FC e 7mg.mL⁻¹ de CL. Uma gota desta solução (5 μ L) foi adicionada na superfície do eletrodo de platina e posteriormente foi rapidamente transferido para uma solução de KCl 0,1 mol L⁻¹. A membrana de bicamada lipídica (s-BLM) é formada espontaneamente após 20 min^{49,50}.

4.7 CARACTERIZAÇÃO DA s-BLM POR MEIO DE ESPÉCIES ELETROQUÍMICAS DE Fe(CN)₆^{4-/3-}

Nesta etapa foram aplicadas as técnicas de voltametria cíclica e impedância eletroquímica. No estudo voltamétrico a integridade da s-BLM e a permeabilidade para íons de Fe(CN)₆^{4-/3-} foram avaliadas por meio de varredura de potencial na faixa de -140 a 500 mV a uma velocidade de varredura de 50mV.s⁻¹ usando solução 1 mM de Fe(CN)₆^{4-/3-} em 0,1 M de KCl onde o par redox de Fe(CN)₆^{4-/3-} foi utilizados para sondar as características das s-BLM. Quando o eletrodo de Pt não

está modificado com a s-BLM os íons marcadores proporcionam como resposta voltamogramas cíclicos onde aparecem respostas de correntes faradaicas (regida pela lei de Faraday) devido ao processo de oxidação do íons $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ na voltametria cíclica direta e de redução dos íons de $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ na etapa inversa como apresentado na reação³⁷:



Quando tem-se a formação da s-BLM as espécies utilizadas como íons-sondas ($\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ e $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$) são impedidas de transferirem elétrons diretamente por meio de reação de oxidação/redução na interface eletrodo/solução. Nesse caso, a única resposta de corrente esperada é a corrente capacitiva, já que não haverá processos faradaicos de oxidação/redução³⁷. Desse modo, a formação da bicamada lipídica é considerada eficiente quando as correntes de picos anódica/catódica geradas pelos íons $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ e $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ forem suprimidas consideravelmente.

Para uma avaliação final das características da s-BLM, a técnica de impedância eletroquímica também foi utilizada. As medidas de impedância foram realizadas com aplicação de um potencial de 235 mV em uma faixa de frequência de 100 kHz a 420 mHz com uma amplitude de sinal de 10 mV. O objetivo do emprego dessa técnica foi de avaliar a integridade e a permeabilidade da s-BLM frente íons de $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-/3-}$ (sonda eletroquímica), bem como obter informações das características físicas como a capacitância da membrana (C_m), resistência da membrana (R_m) e, indiretamente, a espessura da membrana (d).

4.8 INTERAÇÃO DE OLIGOSSACARÍDEOS PREBIÓTICOS COM MEMBRANA DE BICAMADAS LIPÍDICAS (S-BLM)

Neste trabalho foram estudados os efeitos de interação frente a s-BLM de três tipos de oligossacarídeos com propriedades prebióticas: fruto-oligossacarídeo de chicória, inulina, e quefirano. Primeiramente foi avaliado o efeito proporcionado pela variação do tempo de interação dos oligossacarídeos prebióticos com a s-BLM.

Nesse estudo o eletrodo suportado com a BLM foi introduzido em uma solução 0,1 mmol.L⁻¹ de KCl contendo o oligossacarídeo em uma concentração fixa e foram realizadas medidas de VC por tempos crescentes. Foram verificados os tempos em que a interação proporcionou uma recuperação de I_p de cerca de 30% comparado ao voltamograma do eletrodo de Pt sem a membrana. Esses tempos de recuperação de I_p de cerca de 30% foram fixados para cada carboidrato estudado para a realização de outros ensaios para avaliação dos efeitos da variação da concentração dos oligossacarídeos. A avaliação dos efeitos sobre a s-BLM devido a interação com oligossacarídeos prebióticos foram verificadas por meio da diferença das medidas de voltametria cíclica e impedância eletroquímica para o par redox $Fe(CN)_6^{4-/3-}$ antes e após a imersão do eletrodo de Pt modificado nas soluções dos oligossacarídeos estudados.

4.9 AVALIAÇÃO DOS DADOS

Os experimentos relativos ao estudo da interação de oligossacarídeos prebióticos com s-BLM foram realizados em triplicata. Os dados foram apresentados como média. Todos os voltamogramas cíclicos foram tratados, e as figuras obtidas foram processadas por meio do pacote gráfico e estatístico ORIGEM[®] (OriginLab versão 8,0, Northampton, MA, EUA).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 INTERAÇÃO DE OLIGOSSACARÍDEOS PREBIÓTICOS COM MEMBRANA DE BICAMADAS LIPÍDICAS (s-BLM)

5.1.1 Caracterização da membrana de bicamada lipídica suportada no eletrodo Pt

Segundo Wang, J. e colaboradores⁴⁹ os voltamogramas cíclicos permitem concluir se as membranas lipídicas foram formadas na superfície do eletrodo. Na Figura 11 está representado o voltamograma cíclico do eletrodo de platina em uma solução de $1.0 \text{ mmol.L}^{-1} \text{ K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]/\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ (1:1) e 0.1 mol.L^{-1} de KCl entre o intervalo de potencial de -140 e 500 mV. A velocidade de varredura de potencial utilizada foi de 50 mV.s^{-1} proporcionando separação de picos ΔE_{pac} e I_{pa}/I_{pc} respectivamente de 96 mV e 1,02. Outros ensaios foram realizados variando-se a velocidade de varredura de potencial (dados não apresentados por serem bem conhecidos na literatura e terem sido realizados para avaliar se o sistema era compatível com a literatura). Os voltamogramas cíclicos obtidos não apresentaram variação de potencial de pico de oxidação/redução e foram consistentes com um processo de transferência de elétrons reversível e sem complicação cinética³⁴.

Na Figura 11 b esta apresentado o voltamograma cíclico obtido para o eletrodo de Pt após a modificação com a s-BLM. Comparando a Figura 11a com a Figura 11b podemos observar que as os picos de corrente / potencial devido aos processos de transferência de carga foram suprimidos. Esse perfil é compatível com sistemas capacitivos onde tem-se a formação de um filme sobre a superfície do eletrodo impedindo que os íons troquem carga com o eletrodo.

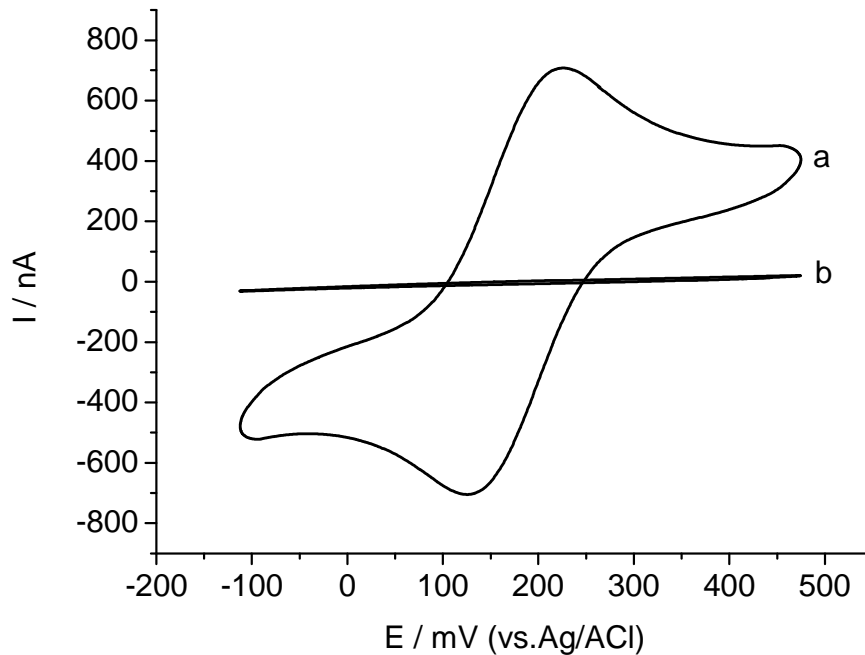


Figura 11 – Resposta para voltametria cíclica do (a) eletrodo de Pt, (b) eletrodo de platina modificado com s-BLM em solução de $1.0 \text{ mmol.L}^{-1} \text{ K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]/\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ (1:1) e 0.1 mol.L^{-1} de KCl. Velocidade de varredura de potencial de 50 mVs^{-1} .

A espectroscopia de impedância é um método efetivo para avaliar as características de um eletrodo com superfície modificada onde os dados de impedância experimentalmente obtidos podem ser analisados por um circuito elétrico equivalente que consiste em ideal e não-ideal análogo aos processos físicos e químicos reais⁵¹. A Figura 12 ilustra os resultados de espectroscopia de impedância de um eletrodo nu (a) e um eletrodo modificado com s-BLM (b) em solução de 1.0 mmol.L^{-1} de $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]/\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ (1:1) em KCl 0.1 mol.L^{-1} .

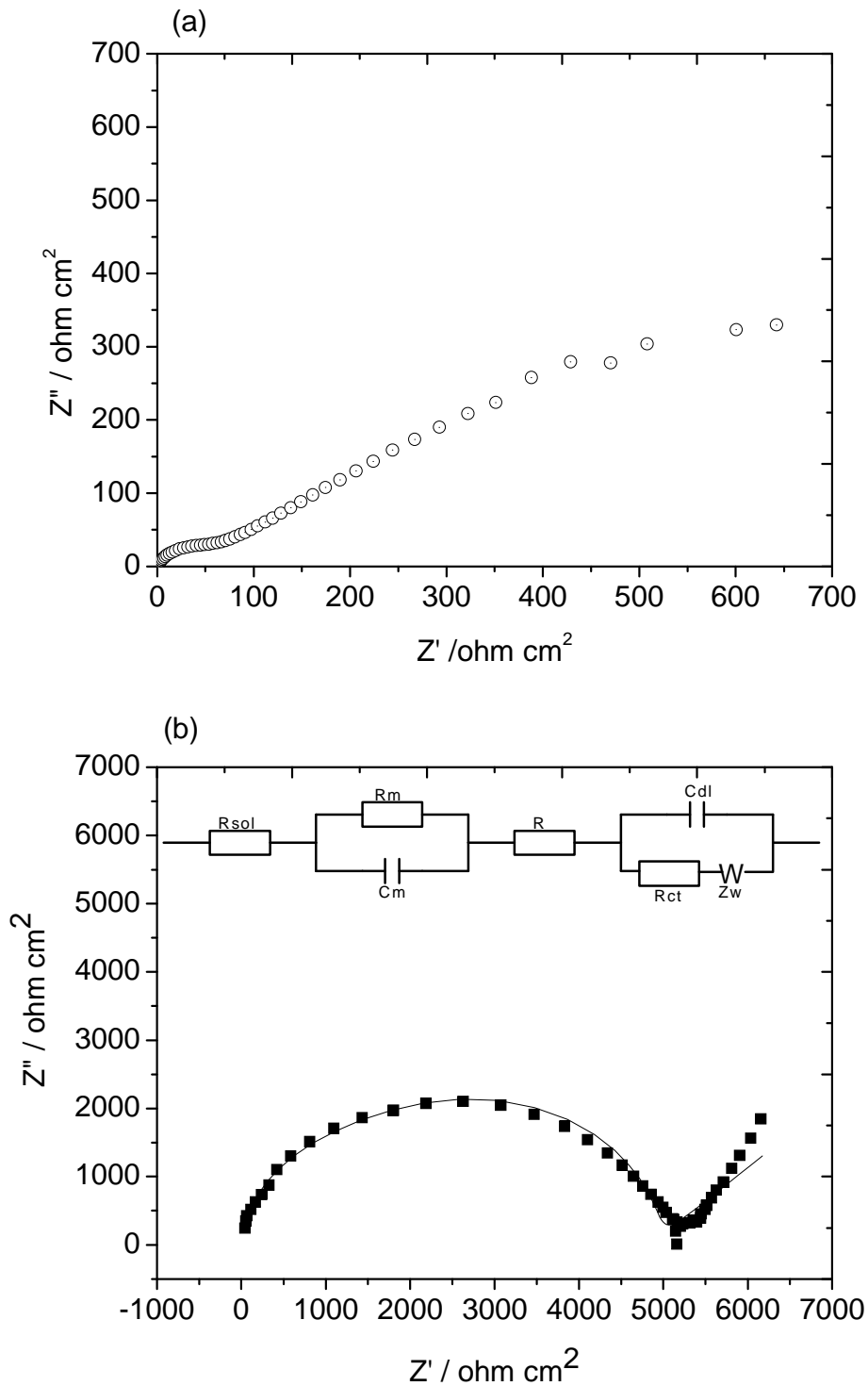


Figura 12 – Espectro de impedância do eletrodo de platina 1.0 mmol.L^{-1} de $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]/\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ (1:1) em $\text{KCl } 0.1 \text{ mmol.L}^{-1}$: (a) eletrodo de Pt; (b) eletrodo de Pt modificado com s-BLM: (■) dados experimentais, (—) ajuste da simulação do circuito equivalente de Randle's. Inserto, o circuito elétrico equivalente de Randle's.

Nota-se que o eletrodo de Pt exibe um perfil com um pequeno semi-círculo e, posteriormente, uma reta indicando que o processo é controlado pela difusão dos íons-sondas (FIGURA 12a)⁵². Porém, após a modificação com a s-BLM (FIGURA

12b), é observada uma diferença significativa nos espectros de impedância. Para o eletrodo modificado, o diagrama de Nyquist apresenta características de um eletrodo revestido com filme resistivo, pois os valores de impedância real são relativamente altos. Nota-se também que o eletrodo modificado apresenta um semi-círculo. O primeiro sistema capacitivo (altas frequências) é atribuído a membrana e o outro (médias frequências) é atribuído a interface eletrodo/solução devido às características porosas da s-BLM. Perto da origem é sondado por frequências mais altas com medidas que significam que a dinâmica de transferência de elétrons possui limitação cinética em uma superfície lisa⁵². O semicírculo observado com o eletrodo modificado indica que a s-BLM impede a transferência de elétron dos íons-sondas no processo eletroquímico.

Para adquirir as informações quantitativas sobre as propriedades da membrana, foi realizada uma simulação do circuito elétrico equivalente de Randle's que melhor se ajustou aos dados experimentais (FIGURA 12 b linha contínua). Nessa simulação foi utilizado o software FRA. O circuito equivalente modificado está inserido na Figura 12 b, que é muito semelhante ao circuito equivalente apresentado por Huang e colaboradores⁴¹. Através da simulação confirma-se que a s-BLM é formada pela resistência da solução (R_{sol}), dois capacitores em série ($R_m C_m$ e $R_{ct} C_{dl}$) e a impedância de Warburg (Z_w). A impedância de Warburg evidência a presença de alguns defeitos na estrutura da s-BLM. A resistência R intercalando os capacitores está relacionada a defeitos na s-BLM que proporciona em alguns pontos, monocamadas.

Os valores de R_{sol} , C_m , R_m , R , R_{ct} , C_{dl} e Z_w da s-BLM e os erros percentuais obtidos a partir da simulação do circuito elétrico equivalente são respectivamente 0,128 mohm cm² (0,0%), 0,16 µF.cm² (0,0%), 3,46 kohm cm² (0,0%), 12,75 ohm.cm² (0,0%), 1,39 k ohm.cm² (2,8%), 0,11 µF.cm² (3,3%), e 0,17 mohm (4,6%).

A espessura d da membrana lipídica pode ser estimada a partir do valor da capacitância da membrana e da constante dielétrica da membrana (k) por meio da equação:

$$C_m = \frac{\epsilon_0 k}{d}$$

onde, ϵ_0 é a permissividade no vácuo ($8,85 \times 10^{-14} \text{ F cm}^{-1}$) e k é a constante dielétrica da s-BLM (2,05)⁵³. Usando essa equação foi possível estimar o valor de $11,3 \pm 0,6 \text{ nm}$. Esse valor está muito próximo a faixa de 4-10 nm que é considerada a espessura de bicamadas lipídicas para a fosfatidilcolina^{54,55}.

5.1.2 Estudos de interação dos oligossacarídeos por meio de voltametria cíclica

5.1.2.1 Estudo da interação de quefirano com s-BLM em eletrodo de platina

Como já discutido na revisão apresentada nesse trabalho, a voltametria cíclica é um método eletroquímico que tem sido aplicada convenientemente para se obter informações sobre a integridade de s-BLM após interação com espécies ativas em membranas. Nesse sentido, foi avaliado o efeito do tempo de interação do quefirano frente a s-BLM onde o eletrodo modificado com a s-BLM foi inserido em uma solução de quefirano $0,04 \text{ g.L}^{-1}$ por tempos crescentes de 0, 5, 10, 15, 30 e 50 minutos. As respostas de voltametria cíclica estão apresentadas na Figura 13. Nota-se na Figura 13 (linha b) que 5 min de interação já possibilitou o aparecimento de respostas de corrente faradaica (I_{p_a} e I_{p_c}) devido ao processo de oxidação/redução do par iônico $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$. Nota-se também que, com o aumento do tempo de interação as correntes faradaicas (FIGURA 14), aumentaram, indicando que o quefirano proporciona algum efeito sobre a membrana possibilitando a permeação dos íons $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ para entrarem em contato direto com a superfície da Pt.

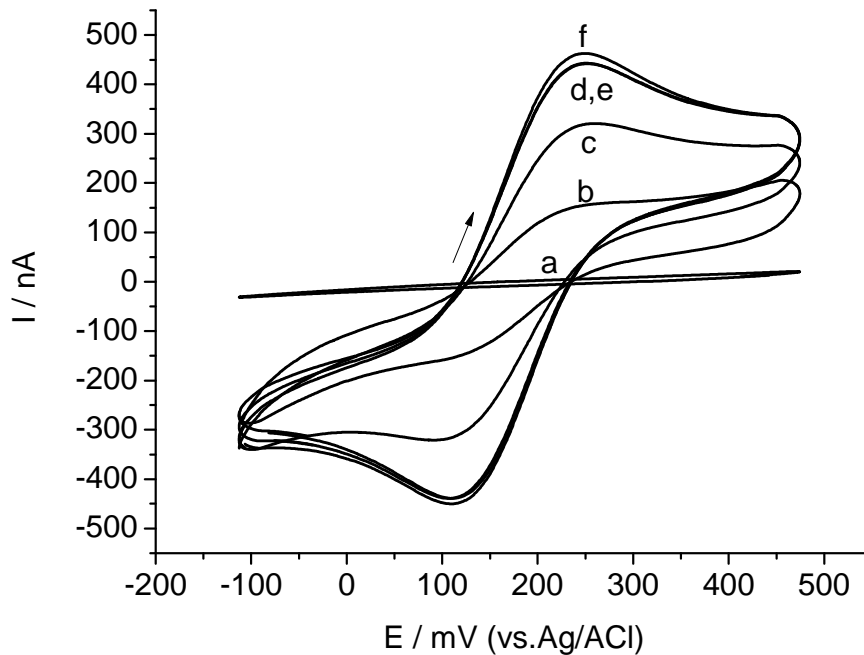


Figura 13 – Voltamogramas cíclicos obtidos para uma solução de 1.0 mmol.L^{-1} $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]/\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ (1:1) em 0.1 mol.L^{-1} de KCl , para o eletrodo de modificado com a s-BLM após a interação com $0,04 \text{ g.L}^{-1}$ kefirano por tempos crescentes: (a) 0 min, (b) 5 min, (c) 10 min, (d) 15 min, (e) 30 min, (f) 50min. Velocidade de varredura de potencial de 50 mV.s^{-1} .

Na Figura 14 estão apresentados os valores de corrente de pico e os valores de ΔE_p em função do tempo de interação. Podemos observar nessa figura que o aumento do tempo de interação do quefirano com a s-BLM proporcionou uma diminuição do ΔE_p . Isso implica que com o aumento do tempo de interação houve um aumento da velocidade de transferência de elétrons do par iônico na interface Pt/solução⁴⁹ indicando que houve alterações na s-BLM que favorecem a transferência de carga.

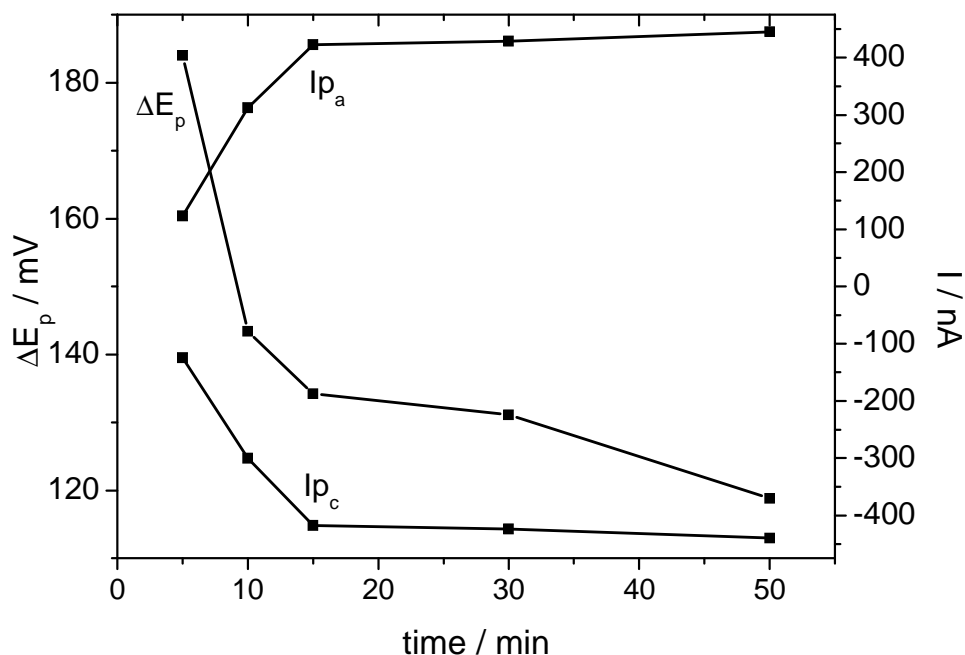


Figura 14 – Correntes de pico (I_{p_a} e I_{p_c}) e ΔE_p do eletrodo de Pt modificado com a s-BLM para uma solução $1.0 \text{ mmol.L}^{-1} \text{ Fe(CN)}_6^{-3/4}$ em $\text{KCl } 0.1 \text{ mol.L}^{-1}$ em função do tempo de interação com uma solução de quefirano $0,04 \text{ g.L}^{-1}$.

Outro estudo foi conduzido para avaliar os efeitos da concentração de quefirano sobre s-BLM. Nessa etapa, foi fixado como tempo de interação 5 min, uma vez que esse tempo foi suficiente para promover uma recuperação do sinal de I_{p_a} de aproximadamente 30%, o que permite avaliar concentrações inferiores e superiores a $0,04 \text{ g.L}^{-1}$. As respostas de VC estão registradas na Figura 15. Não foram observadas alterações nas respostas de voltametria cíclica para concentrações de quefirano inferiores a $0,04 \text{ g.L}^{-1}$ (dados não apresentados).

Podemos observar na Figura 16 (linhas a-f) que o aumento da concentração de quefirano usada na interação com a s-BLM promoveu um aumento na intensidade das correntes de pico (I_{p_a} e I_{p_c}). Simultaneamente podemos observar uma diminuição nos valores de $\Delta E_{p_{ac}}$. Usando-se o método gráfico de Tafel para os voltamogramas da Figura 15 foi possível verificar um aumento nos valores de K_0 ($2,1 \times 10^{-4}$ e $7,6 \times 10^{-4} \text{ cm.s}^{-1}$ respectivamente para as concentrações de quefirano de $0,04$ e $0,2 \text{ g.L}^{-1}$). Essas alterações nos valores de $\Delta E_{p_{ac}}$, I_p e K_0 indicam um aumento na velocidade de transferência de elétrons⁴⁹.

A partir da equação de Randles-Sevcik e conhecendo os parâmetros cinéticos para os íons $\text{Fe(CN)}_6^{4-/3-}$ foi possível estimar a área ativa do eletrodo de Pt. De

posse dos valores estimados de área foi possível calcular a fração da área do eletrodo coberta (θ) com a BLM e podemos aplicar a teoria de Amatore⁴⁵ para estimar o raio do poro formado na s-BLM. No estudo do tempo de interação para uma concentração de $0,04 \text{ g.L}^{-1}$ de quefirano a fração coberta após 50 min de interação foi estimada em 40%. Para o estudo do efeito da concentração, obtemos uma área coberta de aproximadamente 37% para uma concentração de $0,20 \text{ g.L}^{-1}$. O raio do poro estimado foi de 33 \AA . Esses estudos mostram que houve uma interação entre o quefirano e a s-BLM de forma dependente do tempo de interação e da concentração de quefirano. Além disso, a interação proporcionou a remoção de moléculas de fosfolipídios da superfície do eletrodo de Pt permitindo a difusão das espécies eletroquímicas até a superfície do eletrodo possibilitando a transferência de carga.

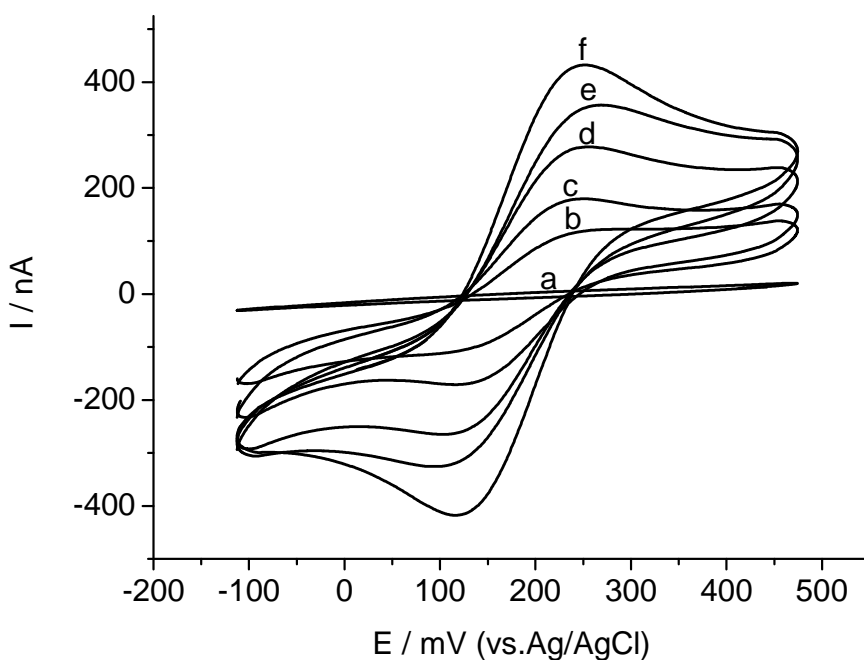


Figura 15 – Voltamogramas cíclicos obtidos para solução de $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]/\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ (1:1) contendo $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$, para eletrodo Pt modificado com s-BLM após interação com crescentes concentrações de quefirano por um tempo de 5 min: (a) $0,00 \text{ } \mu\text{mol.L}^{-1}$, (b) $0,04 \text{ g.L}^{-1}$, (c) $0,08 \text{ g.L}^{-1}$, (d) $0,12 \text{ g.L}^{-1}$, (e) $0,16 \text{ g.L}^{-1}$ e (f) $0,20 \text{ g.L}^{-1}$. Velocidade de varredura de 50 mV.s^{-1} .

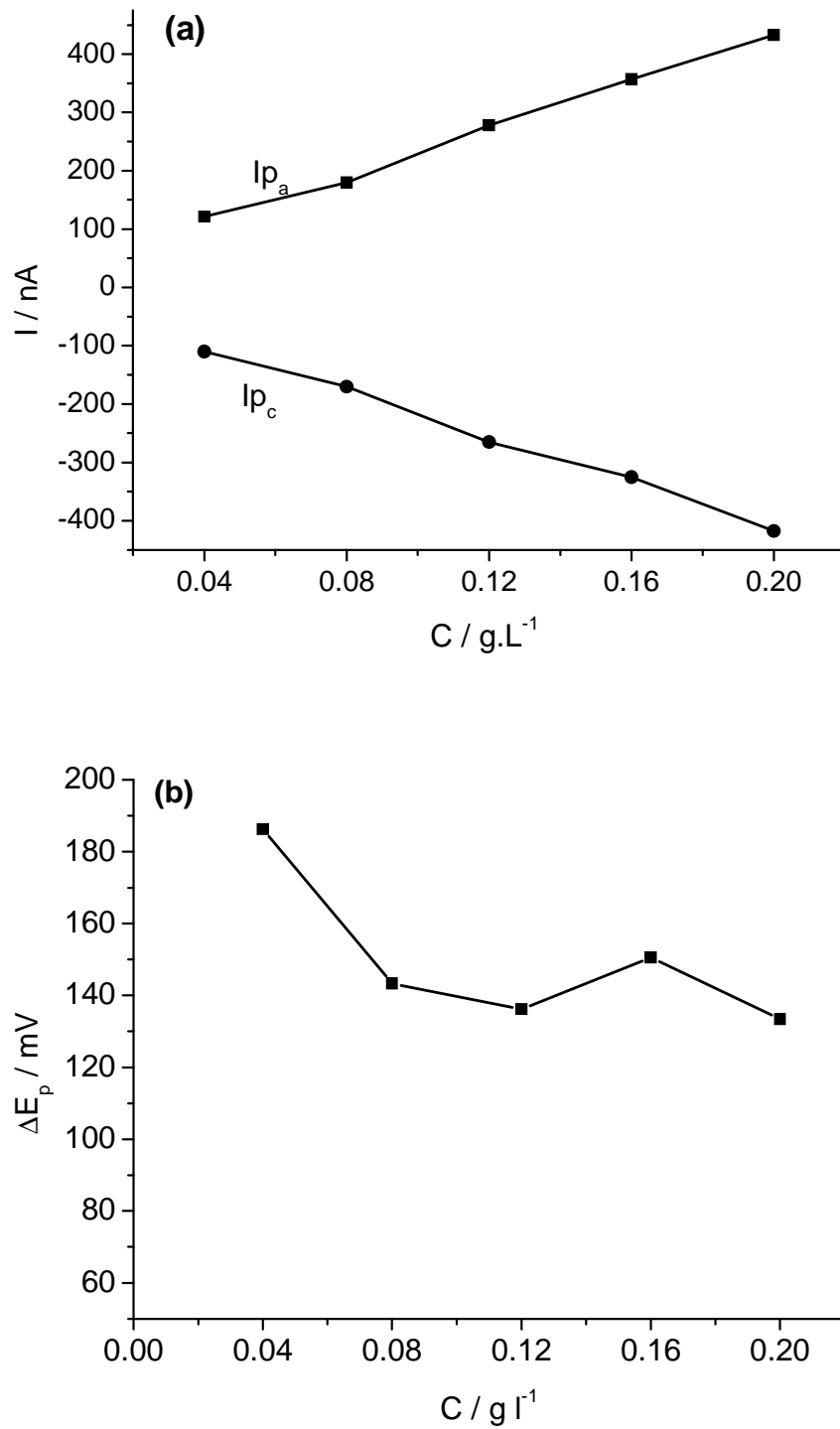


Figura 16 - Correntes de pico (I_{p_a} e I_{p_c}) (a) e ΔE_p (b) do eletrodo de Pt modificado com a s-BLM para uma solução $1.0 \text{ mmol.L}^{-1} \text{ Fe(CN)}_6^{-3/4}$ em $\text{KCl } 0.1 \text{ mol.L}^{-1}$ em função da concentração de quefirano para um tempo de interação de 5 min.

5.1.2.2 Interação de fruto-oligossacarídeo de chicória com s-BLM em eletrodo de platina

Da mesma forma que o estudo realizado para o quefirano, os efeitos do tempo de interação e da concentração do FOC sobre s-BLM foram avaliados. Inicialmente, o eletrodo de Pt modificado com a s-BLM foi colocado em contato direto com uma solução de FOC $7,50 \text{ g.L}^{-1}$ em $\text{KCl } 0,1 \text{ mmol.L}^{-1}$. Após o tempo de interação de 5, 10, 15, 30 e 50 min foram realizadas medidas de voltametria em uma solução de $\text{Fe(CN)}_6^{4-/3-}$ 1 mmol.L^{-1} em $\text{KCl } 0,1 \text{ mmol.L}^{-1}$ e os resultados estão apresentadas na Figura 17. Nota-se que após um tempo de interação de 5 min foi possível verificar o aparecimento de correntes faradaicas devido ao processo eletroquímico do par redox que ocorre na interface eletrodo Pt/solução. Esse resultado indica que, os íons de $\text{Fe(CN)}_6^{4-/3-}$ que não atingiam a superfície do eletrodo de Pt (s-BLM antes da interação com os FOC), passam a atingir a superfície do eletrodo de Pt e realizarem o processo de transferência de carga.

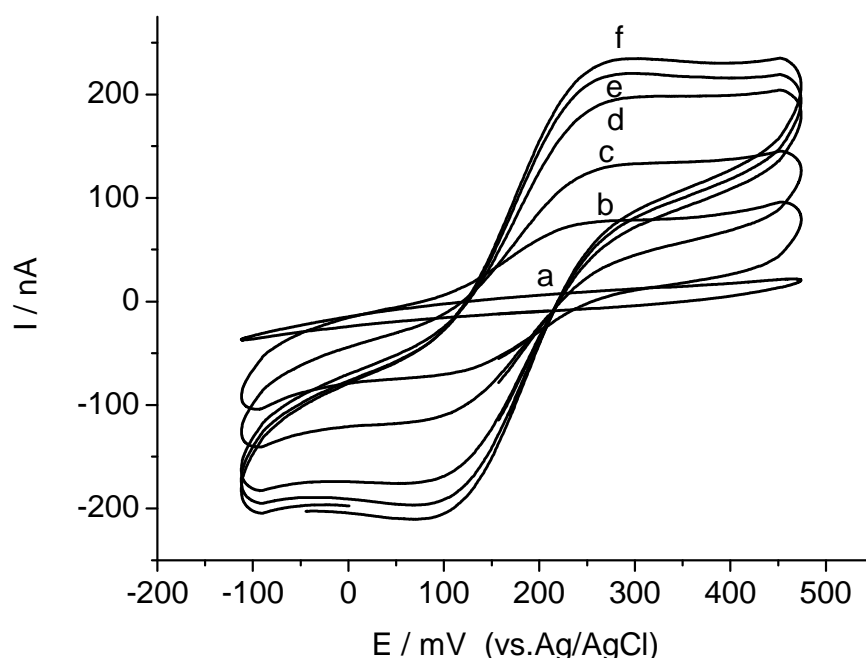


Figura 17 – Voltamogramas cíclicos obtidos a partir de uma solução de $1,0 \text{ mmol.L}^{-1}$ $\text{K}_3[\text{Fe(CN)}_6]/\text{K}_4[\text{Fe(CN)}_6]$ (1:1) em $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ de KCl , para o eletrodo de Pt suportado por membrana de bicamada lipídica após a interação com $7,5 \text{ g.L}^{-1}$ FOC por tempos crescentes respectivamente de 0 min, 5 min, 10 min, 15 min e 30 min. Velocidade de varredura de potencial de 50 mV.s^{-1} .

Na Figura 18 está representados os valores de correntes de pico (I_{p_a} e I_{p_c}) obtidas a partir dos voltamogramas cíclicos da Figura 17 em função do tempo de interação. Nota-se que após 15 min de interação entre FOC e s-BLM, há uma pequena variação nos valores de corrente de pico indicando que o tempo de aproximadamente 20 min foi suficiente para atingir um equilíbrio para a interação. Os resultados mostram que houve alteração na estrutura da s-BLM após a interação com FOC de forma a permitir que os íons-sondas atinjam a superfície do eletrodo de Pt⁵⁰. Os picos de corrente devido a transferência de carga dos íons de $\text{Fe}(\text{CN})_6^{-3/4-}$ obtidos nos voltamogramas da Figura 17 mesmo após a interação com FOC não ficaram bem definidos. Esses resultados indicam uma dificuldade no processo de transferência de carga. Nesse estudo não foi observado grandes alterações nos valores de ΔE_p e também não observou-se grandes aumentos nos valores de I_p .

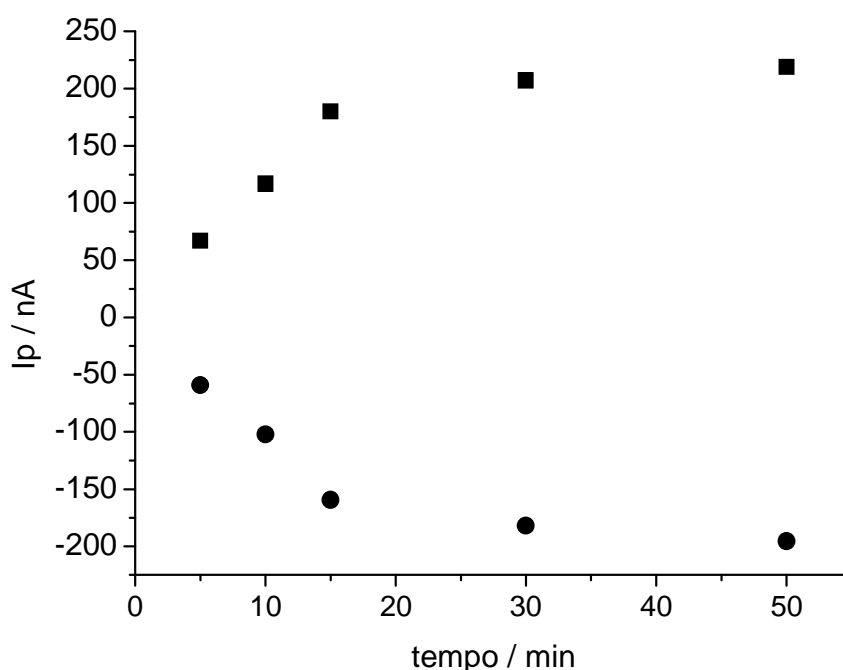


Figura 18 – Correntes de pico (I_{p_a} e I_{p_c}) do eletrodo de Pt modificado com a s-BLM para uma solução $1.0 \text{ mmol.L}^{-1} \text{ Fe}(\text{CN})_6^{-3/4-}$ em $\text{KCl } 0.1 \text{ mol.L}^{-1}$ em função do tempo de interação de uma solução de $7,5 \text{ g.L}^{-1}$ FOC.

Em outro estudo, foi avaliado o efeito da concentração de FOC na interação com a s-BLM. A concentração de FOC foi variada até a concentração de $12,5 \text{ g.L}^{-1}$ mantendo o tempo de interação constante em 20 min. Esse tempo foi escolhido uma vez que proporciona uma recuperação aproximada de 30% dos valores de corrente

de pico permitindo a avaliação de concentrações inferiores e superiores a que foi usada no estudo do efeito de tempo de interação. Os voltamogramas cíclicos obtidos estão apresentados na Figura 19. Podemos observar claramente que, para concentrações de FOC a partir de $2,50 \text{ g.L}^{-1}$ temos um aumento na resposta de corrente em função do potencial. Para concentrações inferiores a $2,50 \text{ g.L}^{-1}$ de FOC não foi observado nenhuma alteração nas respostas de VC. Nota-se que com o aumento das concentrações de FOC uma maior quantidade de íons $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-/3-}$ atingem a superfície do eletrodo de Pt resultando num aumento nas correntes de pico (FIGURA 19). Esses valores mais intensos de corrente de pico e os perfis dos VC nos ajudam a compreender o processo que ocorre na interface eletrodo/membranas. Os voltamogramas mais reversíveis (Figura 19 linhas de d-f) (com menores valores de ΔE_p e I_{pa}/I_{pc} mais próximos de 1) indicam que parte da superfície do eletrodo de Pt está descoberta o que permite um maior acesso dos íons sonda ao eletrodo de Pt resultando em maiores correntes de pico ^{36,56}.

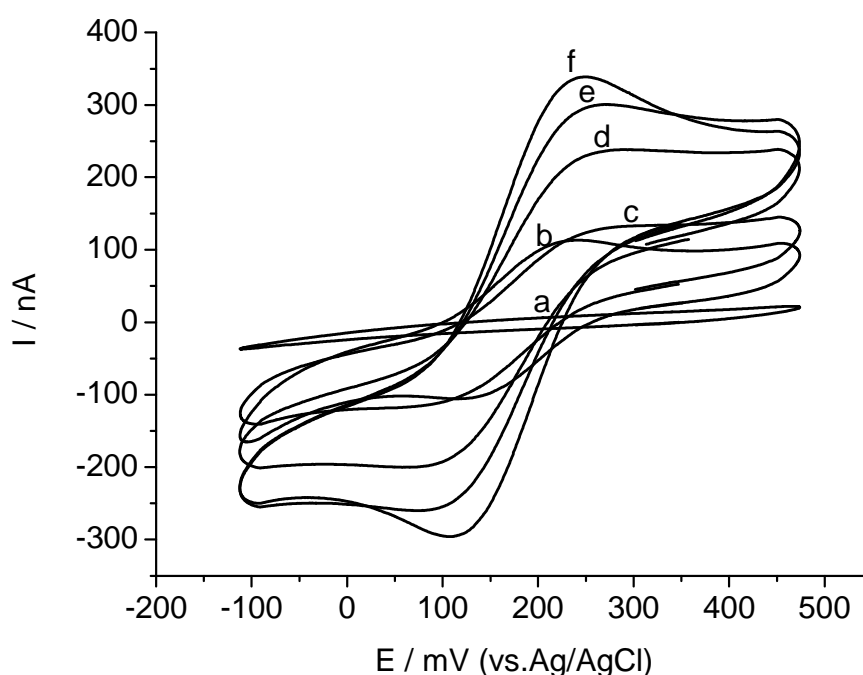


Figura 19 – Voltamogramas cíclicos obtidos para uma solução de $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]/\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ (1:1) contendo $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ de KCl, para eletrodo Pt modificado com s-BLM após interação com concentrações crescentes de FOC por 20 min: (a) $0,00 \text{ g.L}^{-1}$, (b) $2,50 \text{ g.L}^{-1}$, (c) $5,00 \text{ g.L}^{-1}$, (d) $7,50 \text{ g.L}^{-1}$, (e) $10,0 \text{ g.L}^{-1}$ e (f) $12,5 \text{ g.L}^{-1}$. Velocidade de varredura de 50 mVs^{-1} .

Podemos observar na Figura 20 que quando se aumenta a concentração de FOC de $2,50\text{g.L}^{-1}$ para $5,00\text{g.L}^{-1}$ temos um pequeno aumento de I_p e um aumento no valor de ΔE_p . Esse resultado indica uma alteração na estrutura da s-BLM de forma que seja necessária a aplicação de um maior potencial no sistema para que ocorra o processo de oxirredução dos íons de $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-/3-}$ na superfície do eletrodo. Tal resultado é compatível com outros estudos que relatam uma estabilização^{41,42} ou reorganização da s-BLM³⁷. Em concentrações superiores a $5,00\text{g.L}^{-1}$ o aumento da corrente de pico associado a diminuição do ΔE_p indicam um aumento no número de defeitos na s-BLM que favorecem a transferência de carga na Pt (aumento na velocidade de transferência de elétrons)⁵⁶. O aumento da velocidade de transferência de carga pode ser confirmado pelo aumento nos valores de K_0 indo de $1,7 \times 10^{-4}$ a $5,3 \times 10^{-4}\text{cm.s}^{-1}$ para concentrações de FOC respectivamente de $5,00$ e $12,5\text{g.L}^{-1}$.

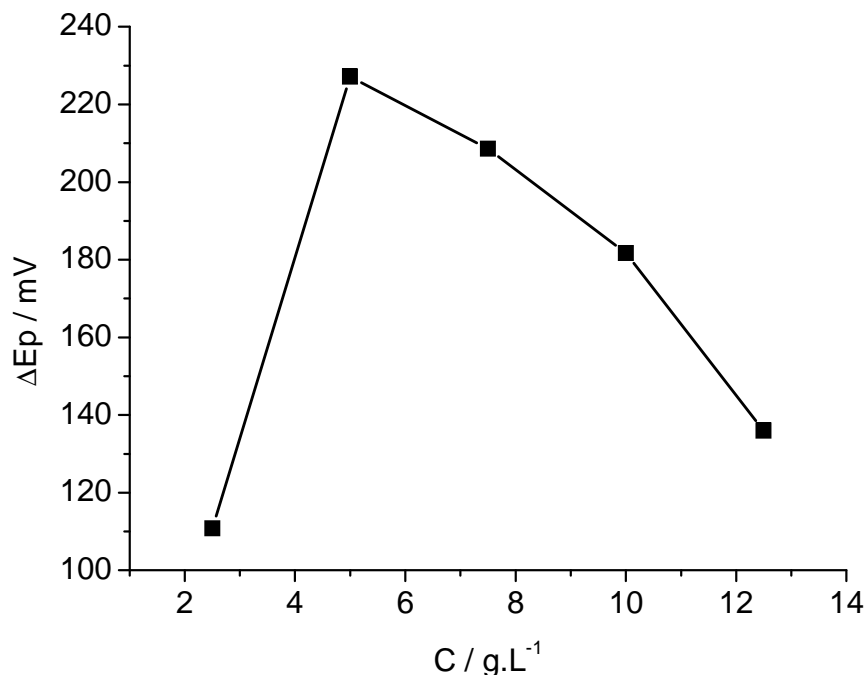


Figura 20 – ΔE_p para o eletrodo de Pt modificado com a s-BLM em uma solução $1,0\text{mmol.L}^{-1}$ $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ em $\text{KCl } 0,1\text{mol.L}^{-1}$ em função da concentração de fruto-oligosacarídeos de chicória para um tempo de interação de 20 min.

Os efeitos de interação de FOC com a s-BLM são compatíveis com estudos onde ocorreram formações de poros na s-BLM, e que, o aumento no número de poros é dependente da concentração do FOC e do tempo de interação. Devido a

uma recuperação da corrente de pico de oxidação chegando a valores de 51% para concentração de FOC de $12,5 \text{ g.L}^{-1}$ pode evidenciar que a formação de poros deve-se a remoção dos fosfolipídeos da superfície do eletrodo. O raio dos poros determinado pela teoria de Amatore foi de 33 \AA .

5.1.2.3 Interação de inulina com eletrodo de Pt modificado com a s-BLM

Nesse estudo a formação de defeitos sobre a s-BLM também foi avaliada por voltametria cíclica usando solução de ferri/ferrocianeto de potássio como par redox. Para avaliação da influência do tempo de interação do oligossacarídeo com a s-BLM, manteve-se constante a concentração de inulina em 1 g.L^{-1} enquanto que o tempo de interação foi aumentado (5 a 50 min). Os voltamogramas cíclicos estão apresentados na Figura 21. Nota-se que, o aumento do tempo de interação proporciona um aumento nos valores de I_p . O aumento dos valores de I_p relacionam-se a uma maior transferência de carga dos íons de $\text{Fe}(\text{CN})_6^{-4}$ com o eletrodo de Pt e é compatível com os demais estudos apresentados nesse trabalho. Os resultados indicam que houve alterações s-BLM de forma a permitir que os íons-sondas atravessassem a membrana entrando em contato direto com a superfície do eletrodo de Pt realizando a transferência de elétrons. Avaliando se os valores de ΔE_p para os voltamogramas obtidos na Figura 21 nota-se que ao se aumentar o tempo de interação de 5 para 10 min temos um aumento de ΔE_p indicando um diminuição do processo de transferência de carga. Para o tempo de 15 min, temos uma diminuição do ΔE_p correspondente a um aumento na velocidade de transferência de carga. Para tempos superiores nota-se novamente um aumento nos valores de ΔE_p com um pequeno aumento de I_p . Tais resultados nos levam a inferir que após um primeiro contato ($t=5\text{min}$) houve a formação de defeitos na s-BLM devido à interação levando a maiores valores de I_p e menores valores de ΔE_p . De 5 a 10 min e para tempos superiores a 15 min é provável que a estrutura da s-BLM deve ter sofrido alterações que dificultam a penetração dos íons-sondas na s-BLM. Duas possibilidades distintas podem explicar as alterações na membrana. Pode haver a adsorção de moléculas de inulina na s-BLM⁴¹ ou rearranjo da bicamada⁴².

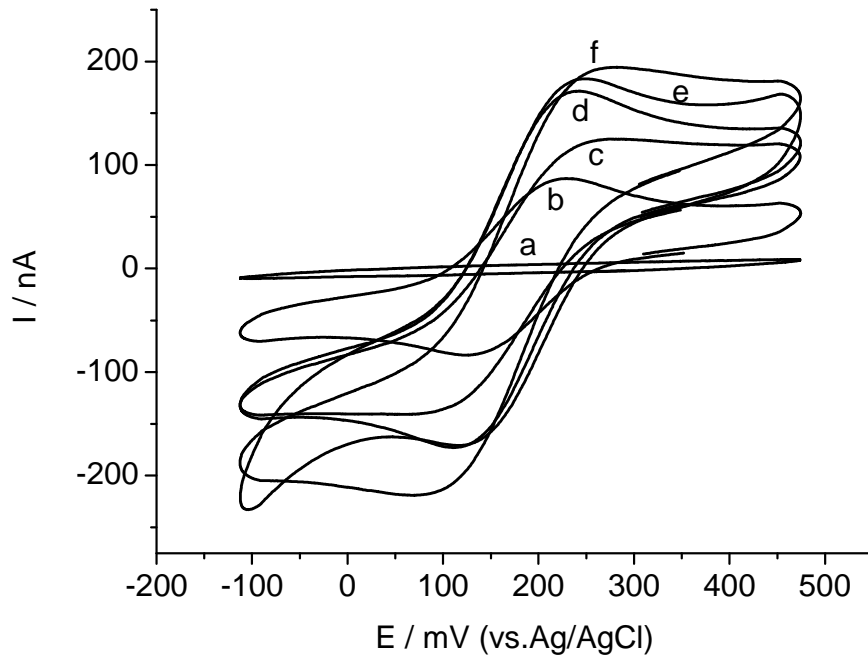


Figura 21 – Voltamogramas cíclicos obtidos em uma solução de $1.0 \text{ mmol.L}^{-1} \text{ K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6] / \text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ (1:1) em 0.1 mol.L^{-1} de KCl, para o eletrodo de Pt modificado com a s-BLM após a interação com $1,00 \text{ g.L}^{-1}$ inulina por tempos crescentes: (a) 0 min, (b) 5 min, (c) 10 min, (d) 15 min, (e) 30 min e (f) 50min. Velocidade de varredura de 50 mVs^{-1} .

Em outra etapa do estudo foi avaliado o efeito da concentração de inulina na formação de poros na s-BLM. Os voltamogramas cíclicos estão apresentados na Figura 22. Pode-se notar que, o aumento da concentração de inulina usada na interação com a s-BLM proporcionou aumento nos valores de I_p (FIGURA 23) e uma pequena diminuição nos valores de ΔE_p . Assim, pode-se verificar que a formação de defeitos na s-BLM, responsável pelo favorecimento da transferência de carga dos íons marcadores com o eletrodo de Pt, é dependente da concentração de inulina usada na interação.

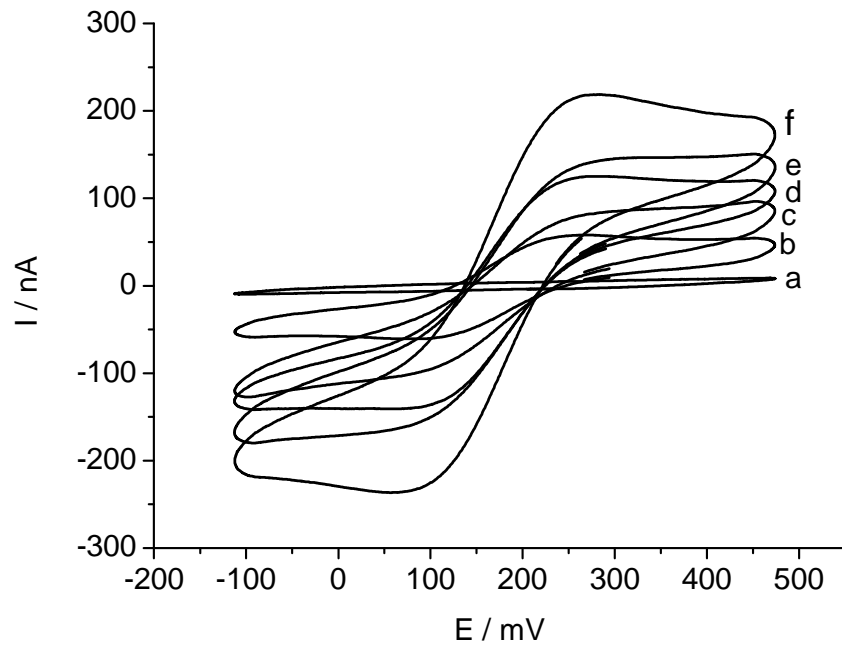


Figura 22 – Voltamogramas cíclicos obtidos para solução de $K_3[Fe(CN)_6]/K_4[Fe(CN)_6]$ (1:1) contendo $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$, em um eletrodo Pt modificado com s-BLM após interação com diferentes concentrações Inulina por 10 min: (a) $0,00 \text{ g.L}^{-1}$, (b) $0,40 \text{ g.L}^{-1}$, (c) $0,70 \text{ g.L}^{-1}$, (d) $1,00 \text{ g.L}^{-1}$, (e) $1,30 \text{ g.L}^{-1}$, (f) $1,60 \text{ g.L}^{-1}$. Velocidade de varredura de 50 mVs^{-1} .

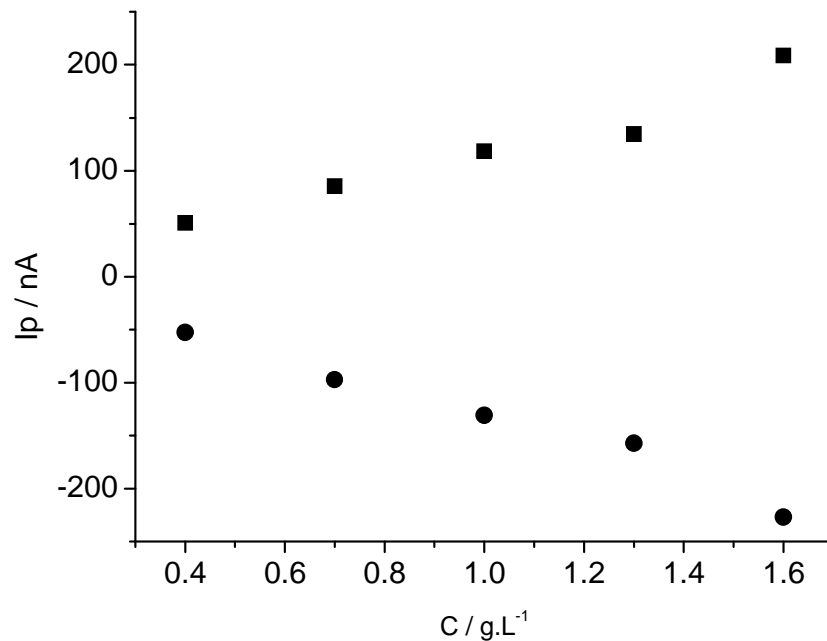


Figura 23 – Correntes de pico (I_{p_a} e I_{p_c}) do eletrodo de Pt modificado com a s-BLM para uma solução $1,0 \text{ mmol.L}^{-1} Fe(CN)_6^{3-/4}$ em $KCl 0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ em função da concentração de inulina usada na interação após interação por 10 min.

5.1.3 Estudos de interação dos oligossacarídeos por espectroscopia de impedância eletroquímica

A Figura 24 mostra os resultados de impedância eletroquímica para s-BLM, antes da interação (a) e após a interação com amostras dos carboidratos (b-d). As medidas foram realizadas em solução de 1mM $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-/3-}$ e 0.1M KCl. Comparando a Figura 24 a com a Figura 24b-d, observa-se que após a interação com os carboidratos houve uma diminuição significativa da impedância real caracterizando assim que a s-BLM apresenta poros o que facilita a transferência de carga entre os íons de $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-/3-}$ e o eletrodo de Pt⁵⁷. Devido a diminuição mais acentuada nos valores de impedância real nota-se que quefirano foi o oligômero que proporcionou o maior numero de poros na s-BLM seguido pela inulina. Assim, os resultados indicam que a interação dos oligossacarídeos com s-BLM proporciona a formação de poros na s-BLM permitindo a transferência de carga entre sondas e o eletrodo de Pt e esses resultados são consistentes com os obtidos pela técnica de voltametria cíclica.

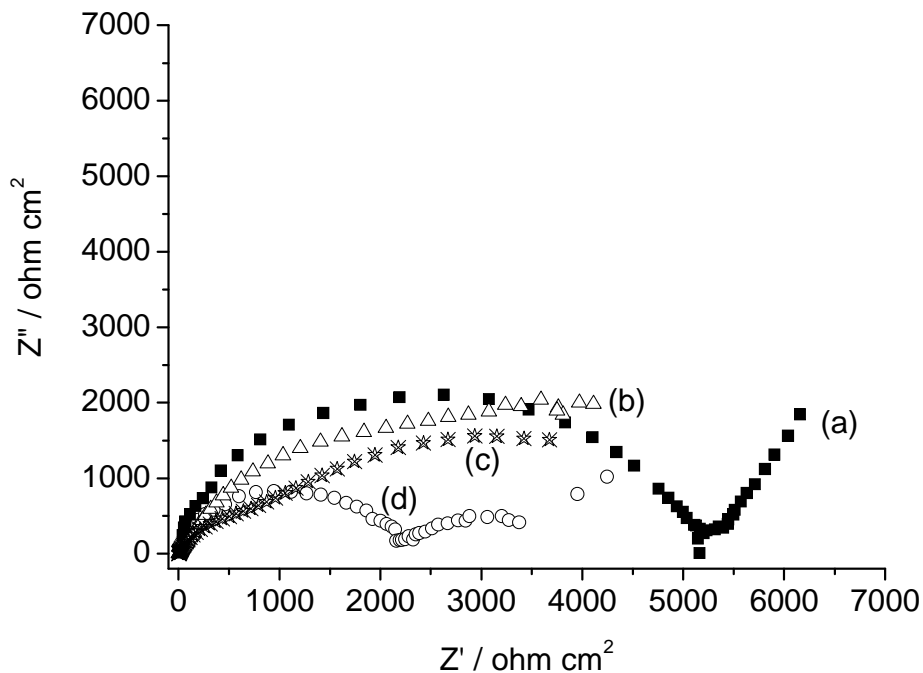


Figura 24 – Espectro de impedância do eletrodo de Pt em solução 1.0 mmol.L⁻¹ de $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]/\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ (1:1) e KCl 0.1 mol.L⁻¹ para: (a) eletrodo de Pt modificado com s-BLM; (b) s-BLM após interação com FOC 5,0 g.L⁻¹, (c) s-BLM após interação com IN 1,0 g.L⁻¹ e (d) s-BLM após interação com quefirano 0,04 g.L⁻¹. Tempo de interação de 10min.

5.1.4 Ensaio de partição octanol / água

Para uma melhor compreensão das propriedades dos carboidratos e das possíveis interações entre eles e a s-BLM foram realizados ensaios de coeficiente de partição octanol/água. Nesse estudo foram utilizados 10 mL de solução aquosa do carboidrato e 10 mL de octanol saturado com água. Para o quefirano, 48 h após a mistura, ainda era evidente um anel de emulsão (octanol, água e carboidrato) na interface octanol/água e um pequeno precipitado no fundo do tubo. Pela Figura 25 a notamos que um mês após a mistura o anel de emulsão desapareceu e formou no fundo um precipitado branco. Para inulina e FOC 48 horas após a mistura tínhamos apenas duas fases sendo uma aquosa e outra uma emulsão branca. Após um mês (FIGURA 25 c e d), a emulsão prevaleceu. No entanto, já foi possível visualizar o aparecimento de 3 fases distintas (octanol, emulsão e fase aquosa). Foi realizado também um ensaio usando Triton X - 100 mmol.L^{-1} (FIGURA 25 d). Nesse experimento observou-se também a formação de um anel de emulsão na interface que pode ser observada após um mês da mistura. Foi realizado outro experimento com concentrações de carboidratos com diluição de cem vezes. As observações foram semelhantes ao estudo anterior, porém o anel da emulsão possuiu uma espessura bem menor se comparado ao experimento anterior. Para verificar a presença de carboidratos na emulsão foi realizado um teste qualitativo a partir da reação de Seliwanoff onde foi constatado a presença de carboidratos na emulsão. Apesar de não ter sido possível obter o coeficiente de partição, podemos verificar que os oligossacarídeos estudados possuem propriedades de interagir com a fase orgânica.

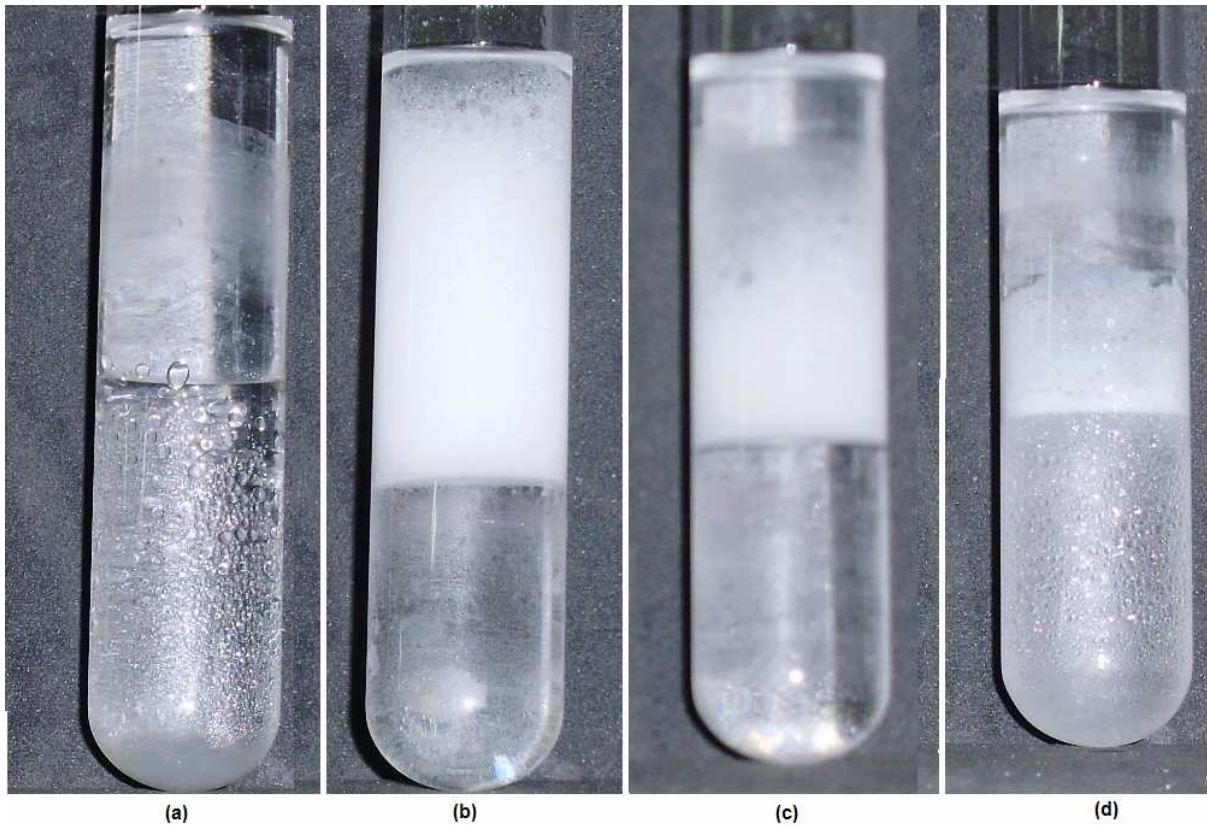


Figura 25 – Fotos dos experimentos de partição octanol/água para os oligossacarídeos após um mês de equilíbrio a temperatura ambiente. Ensaio com soluções: (a) Quefirano $0,8 \text{ g.L}^{-1}$, (b) FOC $1\% \text{ (m/v)}$, (c) inulina $1\% \text{ (m/v)}$ e (d) triton X-100 20 mmol.L^{-1} .

5.1.5 Mecanismos propostos para de interação entre oligossacarídeos e s-BLM

Alguns possíveis mecanismos de interação de substâncias com s-BLM foram relatados na literatura: a adsorção de moléculas sobre a s-BLM e estabilização⁴², formação de canal^{58,59}, formação de poros^{37, 41, 42, 44} e efeito detergente^{41, 28}. Adsorção e estabilização da s-BLM foi relatada em estudos eletroquímicos onde houve um aumento dos valores ΔE_p e diminuição do valor de I_p ³⁷. Sato e colaboradores⁵⁸ relataram que ao se incorporar moléculas ionóforas em BLM houve a formação de canais seletivos para íons. Esses canais normalmente são pequenos o que proporcionaria pequenos aumentos nos valores de corrente, o que não foi observado.

Dados obtidos usando espectroscopia no infravermelho (IR) sugeriram que a interação entre carboidratos e fosfolipídios (dados obtidos com amostra seca) envolve ligações de hidrogênio entre o grupo fosfato da cabeça fosfolipídeos e os

grupos hidroxila dos carboidratos^{60,61}. Acredita-se também que o açúcar polihidroxilado substitui a água e mantém o espaçamento lateral entre grupos de lipídios (cabeça polar) no estado seco, minimizando as interações de van der Waals das cadeias de hidrocarbonetos⁶². Devido a essas interações, em meio aquoso, as moléculas de oligossacarídeos (quefirano, inulina e FOC) podem inicialmente substituir as moléculas de água na estrutura da s-BLM (em concentrações baixas de carboidrato) formando um tapete-ligado (FIGURA 26 b)²⁸. Em uma segunda etapa, devido à minimização das interações de van der Waals entre as cadeias de hidrocarbonetos dos fosfolipídios, os oligômeros devem penetrar na s-BLM alterando a estrutura da s-BLM e iniciando a formação de poros (**Figura 26 c**). Isso permite a difusão dos íons-sondas até a superfície do eletrodo e a realização do processo de transferência de carga desses íons na interface do eletrodo de Pt. Na última etapa, em concentrações maiores (superior a $0,08 \text{ g.L}^{-1}$ para o quefirano, $0,70 \text{ g.L}^{-1}$ para inulina e $5,0 \text{ g.L}^{-1}$) as moléculas de carboidrato que estão sobre a superfície da BLM atingem uma concentração crítica e ocorre um efeito semelhante ao efeito detergente (FIGURA 4 d). O mecanismo de formação de tapete ligado para a interação dos oligossacarídeos estudados com a s-BLM, proposto neste trabalho, é similar ao relatados por alguns peptídeos ativos e é semelhante a tensoativos clássicos²⁸. Aplicando-se a teoria de Amatore e colaboradores⁴⁵ o raio dos poros formados na s-BLM foi estimado para todos os prebióticos estudados com valor médio 33 \AA . Esse valor foi independente da concentração usada na interação.

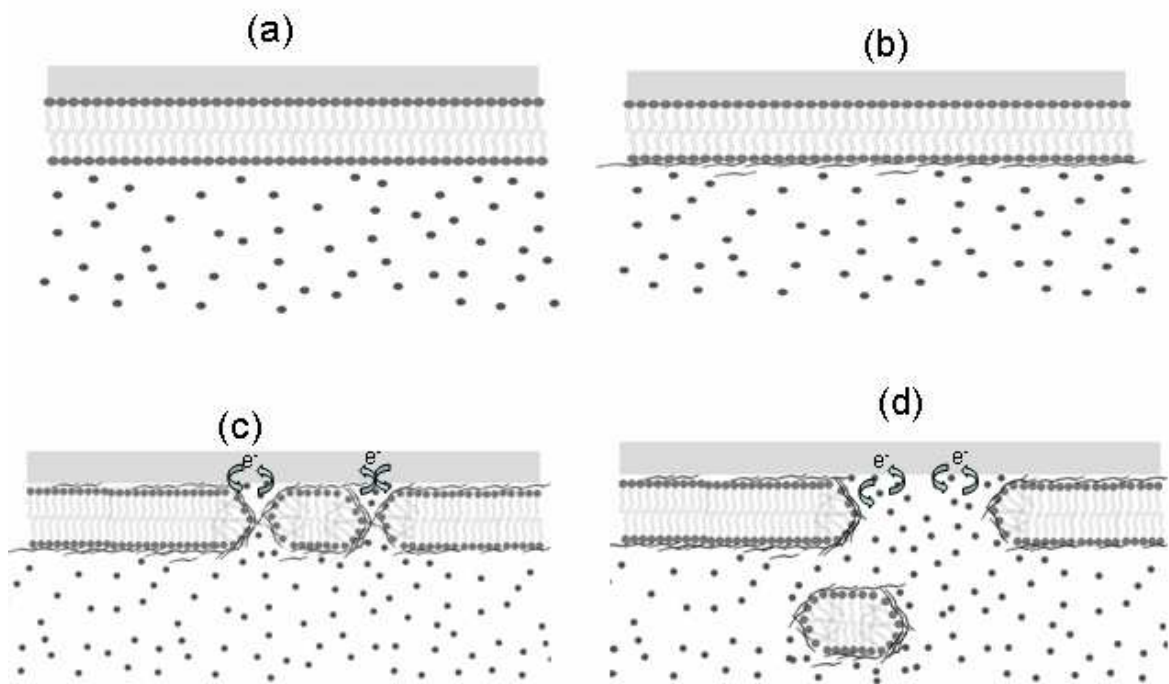


Figura 26 – Mecanismo proposto para a interação dos oligossacarídeos e a membrana (b) as moléculas de oligossacarídeos se alinham na superfície da membrana (c) penetração e formação de poros e em (d) quando uma concentração crítica é atingida ocorre um efeito semelhante ao efeito detergente, onde os oligossacarídeos e componentes da membrana formam agregados que saem da membrana, causando até mesmo a destruição.

6 CONCLUSÕES

Baseado nos experimentos podemos fazer as seguintes conclusões:

- ✓ O eletrodo de platina foi construído e apresentou as características de reversibilidade necessárias para a realização do estudo de interação;
- ✓ A membrana de bicamada lipídica foi formada na superfície do eletrodo de Pt de forma reprodutível e estável o que possibilitou a realização dos ensaios de interação;
- ✓ A espessura da s-BLM formada foi de 11,3 nm que é muito próximo dos valores aceitos para bicamadas lipídicas;
- ✓ Foi verificado que o aumento do tempo de interação dos carboidratos com a s-BLM proporciona um aumento da quantidade de poros formados na membrana até que o número de poros mante-se constante (tempos próximos a 30 min);
- ✓ De forma semelhante aos resultados obtidos para o tempo de interação, a formação de poros na s-BLM é dependente da concentração de oligossacarídeos. Os efeitos de formação de poros na s-BLM foram mais pronunciados para o quefirano seguido respectivamente pela inulina e pelo;
- ✓ A partir dos resultados foi possível propor um mecanismo de ação dos oligossacarídeos prebióticos frente a s-BLM. Sugere-se que o mecanismo de interação pode envolver ligações de hidrogênio entre os grupos hidroxilas dos carboidratos e o grupo fosfato do fosfolípido, com substituição de moléculas de água na estrutura da s-BLM que causa a minimização das interações de van der Waals entre as cadeias de hidrocarbonetos. O modelo proposto para a interação foi o de tapete-ligado que é dividido em três etapas dependentes da concentração dos carboidratos;
- ✓ O modelo proposto de avaliação da interação de oligossacarídeos com a membrana é um modelo físico-químico simples que pode ser útil para o entendimento da atividade biológica desses prebióticos diretamente sobre biomembranas.

APENDICE

ARTIGO SUBMETIDO À REVISTA BIOELECTROCHEMISTRY EM 12/09

Kefiran can disrupts cell membrane through induced pore formation

Abstract

Kefiran, an exopolysaccharide isolated from kefir d'aqua grains, is well-known to have antiinflammatory and antimicrobial activities, although its mechanism of action directly on biomembranes is unknown. The influence of kefiran on 1- α -phosphatidylcholine / cholesterol supported bilayer lipid membrane on Pt electrode was studied by voltammetry and electrochemical impedance spectroscopy. The interaction of the oligosaccharide with s-BLM promoted the access of $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3- / 4-}$ probe ions to the electrode surface. It was found that kefiran could induce molecular pores at s-BLM surfaces for 5 min at 11.4 $\mu\text{mol/L}$. The suggested mechanism seems to involve some hydrogen bonding between the carbohydrate and the phosphate head group of the phospholipid with a carpet-like model of interaction. The overall results can help in the knowledge about direct molecular interactions between prebiotic oligosaccharides and cell surfaces, both related to the biological activity of this group in several experimental models.

CAPITULO 2

OTIMIZAÇÃO MULTIVARIADA DE UM
ELETRODO DE PASTA DE CARBONO
MODIFICADO PARA DETECÇÃO DE
CARBOIDRATOS EM GERAL E
OLIGOSSACARÍDEOS PREBIÓTICOS POR
MEIO DE VOLTAMETRIA CÍCLICA E
CRONOAMPEROMETRIA

7 OBJETIVOS

O objetivo geral desse capítulo foi otimizar um eletrodo de pasta de carbono modificado para quantificação de carboidratos em geral e oligossacarídeos quefirano, inulina e FOC.

- ✓ Os experimentos foram delineados da seguinte forma:
- ✓ Otimização de um eletrodo para a quantificação de carboidratos em geral e oligossacarídeos (inulina, frutooligossacarídeos de chicória e kefir);
- ✓ Caracterização do eletrodo construído por voltametria cíclica;
- ✓ Determinar os parâmetros eletroanalíticos para quantificação de carboidratos por VC;
- ✓ Aplicar o eletrodo otimizado para quantificar os oligossacarídeos inulina, frutooligossacarídeos de chicória e quefirano por cronoamperometria.

8 REVISÃO

8.1.1 Determinação de oligossacarídeos

Inicialmente nós apresentaremos uma breve revisão sobre as técnicas mais utilizadas para a quantificação de carboidratos.

Como apresentado no mercado de alimentos funcionais, os fruto-oligossacarídeos (FOS) são considerados os principais prebióticos em estudo. Neste sentido, tanto para a elucidação do mecanismo de ação dos oligossacarídeos, quanto para o controle de qualidade dos alimentos funcionais, a determinação de fruto-oligossacarídeos perfaz nos dias atuais de grande importância.

Várias são as técnicas para determinação de oligossacarídeos, onde a maioria baseia-se em sistemas de separação, cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), de ultra-eficiência (CLUE), cromatografia gasosa (CG) e eletroforese capilar (EC), com aplicação de várias técnicas para detecção (espectrometria de massas, amperometria, ultravioleta, entre outras) são conhecidas. A Tabela 1 apresenta técnicas desenvolvidas para quantificação de oligossacarídeos em amostras diversas.

Como apresentado na Tabela 1, são vários os objetivos para o desenvolvimento de técnicas para a quantificação de oligossacarídeos, indo desde a investigação da origem botânica de amostras de mel⁷³, até como indicadores de doenças de armazenamento lisossomal em útero⁷⁹.

Em muitos trabalhos, a elucidação da estrutura de oligossacarídeos^{63,64,65,66,67,68} é apresentada. Em alguns casos, além da estrutura, são abordadas as determinações da constante de dissociação entre glicoproteínas e oligossacarídeos⁶⁹, grau de polimerização e peso molecular de oligossacarídeos^{70,71} e o mapeamento de oligossacarídeos em glicoproteínas⁷².

Tabela 1 – Técnicas analíticas desenvolvidas para determinação de oligossacarídeos.

Técnicas	Detecção*	Aplicação	Referências
CLAE	PAD	Investigação do perfil de oligossacarídeos em amostras de mel para verificar a origem floral do mel	73
FN-CLAE	PAD	Determinação de impurezas (maltose, maltohexaose, maltotetrose, etc) em amostras de α -ciclodextrinas.	74
FR-CLUE	Fluorescência	Determinação de asparagina ligada a oligossacarídeos em glicoproteínas.	75
MALDI-TV-EM	EM-TV	Caracterização de oligossacarídeos (inulim e amido) em algumas amostras de vegetais.	76
CLAE	Ultravioleta	Avaliação do perfil de oligossacarídeos padrões em mel.	77
CGAR	DIC	Determinação de oligossacarídeos com grau de polimerização até sete por cromatografia gasosa convencional (baixa temperatura).	78
ISE-EM/EM	EM	Determinação de oligossacarídeos e glicolipídeos em fluido amniótico como indicadores de doenças de armazenamento lisossomal em útero.	79
(2D-CLAE-ISE-TV-EM)	EM-TV	Determinação “on-line” de asparagina ligada a oligossacarídeos em glicoproteínas.	80
HPLC	PAD	Otimização de um método de extração de oligossacarídeos da família da rafinose em ervilhas e avaliação dos efeitos de perda de oligossacarídeos após branqueamento das ervilhas.	81
HPLC	PAD	Quantificação de oligossacarídeos individuais em leite humano, usando cromatografia de permeação em gel para separação de oligossacarídeos ácidos, neutros e lactose e quantificação posterior em CLAE com detecção amperiométrica pulsada.	82
HPLC	Fluorescência	Desenvolvimento um método para determinação de monossacarídeos e oligossacarídeos por CLAE usando gradiente de eluição e pós coluna de derivação fluorescente.	83
IC-RMN	RMN	Determinação de nano mols de heparina por RMN de hidrogênio após separação/pré-concentração “on-line” por isotacoforese capilar.	84
ISE-CID-EM/EM	EM/EM	Determinação de oligossacarídeos derivados de alginato e elucidação da estruturados oligossacarídeos.	85
LC-EM	EM	Desenvolvimento de um método para determinar oligossacarídeos não derivatizados, em baixas concentrações, por LC-EM em matrizes complexas como água do mar e água intersticial de sedimentos	86
ISE-CID-EM/EM	EM/EM	Estratégias para determinação de oligossacarídeos sializados para análise do tipo de cadeia e grupo sanguíneo junto com padrões ramificados.	87
CLE	UV	Avaliação da técnica de exclusão em alta e baixa pressão para determinação de oligossacarídeos de hepararina em amostras biológicas.	88

* PAD-deteção amperiométrica pulsada; FN-CLAE – Cromatografia líquida de alta eficiência de fase normal; MALDI-TV-EM – espectrometria de massas dessorção/ionização a laser auxiliado por matriz com analisador de tempo de voo; CGAR – cromatografia de alta resolução; DIC – detector de ionização em chama; ISE-EM/EM – espectrometria de massas tandem com ionização por spray de elétrons.

Como pode ser observada pela Tabela 1, a maioria dos métodos para determinação de oligossacarídeos envolve estratégias de alto custo, tanto para a aquisição dos equipamentos como para manutenção dos mesmos, e a maioria são morosos (devido ao alto tempo gasto por técnicas cromatográficas). Além disso, ainda são poucas as técnicas que objetivam a determinação de oligossacarídeos, o que torna difícil os estudos para a elucidação dos mecanismos de ação e controle de qualidade de alimentos funcionais baseados em oligossacarídeos. Sendo assim, o desenvolvimento de novas técnicas para quantificação de oligossacarídeos, que sejam de baixo custo e rapidez, perfaz ainda como um grande desafio.

Nesse sentido, as técnicas eletroanalíticas oferecem uma série de vantagens tais como (i) seletividade e especificidade das determinações, resultante da oxirredução das espécies analíticas de interesse em um potencial aplicado específico; (ii) seletividade decorrente dos processos de oxirredução do analito em eletrodo de trabalho feito com material específico; (iii) grande sensibilidade e baixos limites de detecção resultante das técnicas de pré-concentração e modos de aquisição de sinal que proporciona ambiente com baixo sinal de fundo e baixo custo para aquisição de equipamentos, comparado a métodos cromatográficos e demais apresentados na Tabela 1.

9 MATERIAIS E MÉTODOS

9.1 INSTRUMENTAÇÃO

Foi utilizado ao longo do experimento de voltametria cíclica um sistema potenciostato/galvanostato PG-39MCSV, Omnimetra Instrumentos Científicos Ltda (Nova Friburgo, Rio de Janeiro).

9.2 FONTES DE OLIGOSSACARÍDEOS

A inulina e fruto-oligossacarídeos de chicória foram obtidas da empresa Sigma-Aldrich® (Stlouis, EUA). As amostras de quefirano usadas foram obtidas por MOREIRA, M.E.C., et. al a partir do cultivo e isolamento com caracterização apresentada em seu trabalho¹⁶. Todas as soluções aquosas foram preparadas em água bi-destilada.

9.3 OUTROS REAGENTES E MATERIAIS

Todos os demais reagentes utilizados no desenvolvimento deste trabalho possuem grau analítico e, ainda, todas as soluções foram preparadas utilizando água destilada.

9.4 CONSTRUÇÃO DE ELETRODOS DE TRABALHO PARA DETERMINAÇÃO DE CARBOÍDRATOS EM GERAL

Os eletrodos de trabalho foram construídos baseando-se no trabalho de Ojani⁸⁹ onde, primeiramente, a confecção da pasta de carbono passou por uma etapa de otimização utilizando planejamento fatorial e matriz de Doehlert.

No procedimento de preparo da pasta, uma quantidade de α -naftilamina foi primeiramente dissolvida em 5mL de éter etílico e misturado com o pó de grafite em almofariz. Após a evaporação do solvente foi somado então a quantidade de aglutinante e procedeu-se a mistura até a formação de uma pasta homogênea. A pasta preparada foi firmemente introduzida na ponta de um tubo de vidro (4,0 mm diâmetro interno) e um fio de cobre foi introduzido na outra extremidade do tubo para estabelecer o contato elétrico. A superfície fresca do eletrodo foi polida com o atrito em uma superfície de papel vegetal (até que uma superfície brilhante foi observada).

Para se obter o eletrodo de pasta de carbono modificado a superfície polida passou por uma etapa de eletropolimerização que foi conduzida em solução de 0,2 mol.L⁻¹ de HClO₄ em potencial de eletropolimerização (VE) por 250s. Posteriormente, o eletrodo foi imerso em uma solução de cloreto de níquel II por 30 min para adsorção dos íons níquel na superfície do eletrodo.

De acordo com estudos prévios realizados por Ojani e colaboradores⁸⁹, tem-se que os carboidratos são oxidados em pHs altos em eletrodos incorporados com Ni(II). Por isso, todas as leituras foram realizadas em soluções preparadas em 0,1 mol.L⁻¹ de NaOH. No sentido de se obter uma maior sensibilidade para o eletrodo, esse foi otimizado passando inicialmente por uma etapa de avaliação das variáveis que são significativas para a confecção da pasta. Nesse estudo foi utilizado um experimento fatorial 2⁴ que foi realizado em duplicata e em ordem aleatória usado como padrão uma solução de glicose 1,0 mmol.L⁻¹ em NaOH 0,1 mol.L⁻¹ e como branco uma solução de NaOH 0,1 mol.L⁻¹. As medidas de voltametria cíclica foram realizadas com uma velocidade de varredura de 50 mV.s⁻¹ entre o intervalo de potenciais de 100 a 650 mV. As variáveis estudadas e seus níveis máximo e mínimo são apresentadas na Tabela 2.

Tabela 2 – Variáveis com seus respectivos níveis empregados no planejamento fatorial 2⁴ utilizado na otimização da construção do eletrodo de trabalho.

Variáveis	Níveis	
	Mínimo (-)	Máximo (+)

Tipo de Aglutinante (TA)	Óleo mineral	Silicone
Concentração do Aglutinante (CA) (%)	10	30
Concentração do Complexante (CC) (%)	0,40	0,60
Potencial de Eletropolimerização (VE) (mV)	650	750

A partir dos resultados obtidos deste planejamento fatorial foi possível determinar a influência das variáveis no sistema em estudo. Adicionalmente, após o conhecimento das variáveis significativas, a otimização final foi realizada com emprego de matriz de Doehlert e metodologia de superfície de resposta.

9.5 AVALIAÇÃO DOS DADOS

Os experimentos relativos ao estudo da interação de oligossacarídeos prebióticos com s-BLM foram realizados em triplicata. Os dados foram apresentados como média. Os tratamentos dos dados do estudo fatorial e superfície de resposta, apresentados no apêndice, foram realizados por meio do pacote STATISCA[®] (StatSoft versão 7,0, Tulsa, EUA). Todos os voltamogramas cíclicos foram tratados, e as figuras obtidas foram processadas por meio do pacote gráfico e estatístico ORIGEM[®] (OriginLab versão 8,0, Northampton, MA, EUA).

9.6 EXPERIMENTO DE CRONOAMPEROMETRIA

Nos ensaios de cronoamperometria foi utilizado NaOH 0,1 M como solução branco com a aplicação de um potencial fixo de 450 mV. Após a estabilização dos valores de corrente em função do tempo foram adicionadas concentrações crescentes dos oligossacarídeos estudados (soluções preparadas em meio NaOH 0,1M). No momento da adição de concentrações a coleta de dados é pausada e inicia-se uma agitação com auxílio de agitador magnético a 20 rpm. Após 20 s de agitação inicia-se novamente a coleta de dados que ocorre por 50 s. Posteriormente a coleta de dados é pausada novamente onde é adicionada mais uma concentração

crescente. Os valores de corrente máxima observada são extraídos dos cronoamperogramas e apresentados em função da concentração.

10 RESULTADOS E DISCUSSÃO

10.1 OTIMIZAÇÃO MULTIVARIADA DA CONFECÇÃO DA PASTA DE CARBONO DO ELETRODO DE TRABALHO PARA DETERMINAÇÃO DE OLIGOSSACARÍDEOS

O planejamento fatorial completo 2^4 empregado para avaliar os efeitos das variáveis em estudo se encontra na Tabela 3. A resposta analítica avaliada foi a diferença entre a corrente de pico anódica da amostra e do branco ($\Delta I_{p_a} = I_{p_a(\text{amostra})} - I_{p_a(\text{branco})}$).

Tabela 3 – Planejamento fatorial completo 2^4 usado para avaliar o efeito das variáveis na construção do eletrodo de pasta de carbono modificado para determinação de oligossacarídeos.

Ensaio	TA	CA	CC	VE	$\Delta I_{p_a}/ \mu A$
1	+	+	+	+	0,958/1,151
2	-	+	+	+	0,797/0,454
3	+	-	+	+	2,857/2,363
4	-	-	+	+	19,92/19,81
5	+	+	-	+	0,220/0,079
6	-	+	-	+	1,173/0,8833
7	+	-	-	+	5,837/4,834
8	-	-	-	+	11,57/11,42
9	+	+	+	-	0,810/0,330
10	-	+	+	-	0,974/0,544
11	+	-	+	-	10,51/10,37
12	-	-	+	-	3,175/2,998
13	+	+	-	-	2,010/1,529
14	-	+	-	-	2,923/2,703

15					3,444/3,038
16	+	-	-	-	4,775/4,551

TA = tipo de aglutinante; CA = concentração do aglutinante; CC = concentração complexante; VE = potencial de eletropolimerização; $\Delta I_{p_a} = I_{p_a}(\text{glicose em NaOH}) - I_{p_a}(\text{NaOH})$ (variação da corrente de pico anódica).

A significância das variáveis além do efeito das interações foi averiguada por meio da análise de variância (ANOVA) e representada pelo diagrama de Pareto (FIGURA 27), utilizando intervalo de confiança de 95%.

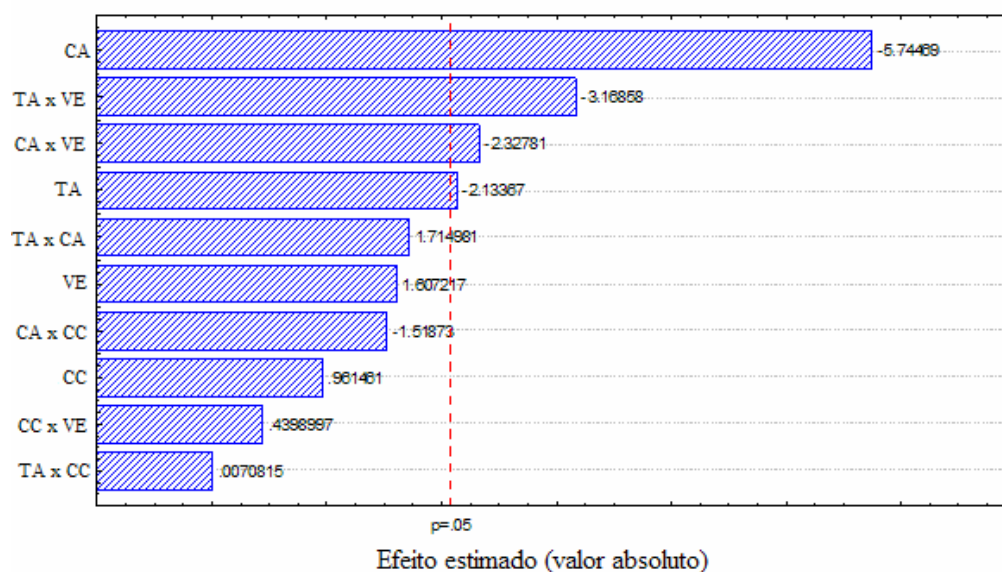


Figura 27 – Diagrama de Pareto dos efeitos para as variáveis estudadas na confecção do eletrodo modificado para determinação de oligossacarídeos.

De acordo com o diagrama de Pareto, a significância das variáveis ocorre quando o comprimento das barras horizontais é superior à linha vertical em vermelho, que representa o quantil da distribuição t com um nível de significância de 5% ($p=0,05$). Com isso, o efeito principal negativo (-5,74) obtido para a CA indica que, elevando os níveis dessa variável (10 para 30), ocorre um decréscimo considerável no sinal analítico. Tal comportamento revelou que a pasta de carbono formada com uma menor quantidade de aglutinante permite uma formação mais eficiente do filme polimérico, além de proporcionar uma maior exposição do complexante α -naftilamina que é responsável pela adsorção de Ni^{+2} que atua na oxidação dos carboidratos.

O efeito do tipo de aglutinante (TA) também se mostra significativo, com efeito negativo (-2,13) para respostas ΔI_{p_a} . Assim, como o menor nível é representado

pelo óleo mineral e o efeito é negativo temos que o uso de óleo mineral proporciona melhores resultados na formação da pasta de carbono modificada com o filme polimérico.

A interação significativa TA-VE, com valor negativo (-3,16), pode ser facilmente compreendida considerando que, para o aglutinante óleo mineral (nível menor), a aplicação de potenciais mais altos para eletropolimerização (750 mV) em meio altamente oxidante (HClO_4 0,2 mol.L⁻¹) pode levar a oxidação tanto do óleo mineral quanto do complexante α -naftilamina, o que proporcionaria uma menor adsorção de íons Ni^{+2} na superfície do eletrodo e conseqüentemente, uma menor oxidação de carboidratos com uma menor resposta analítica resultante.

Já para a interação significativa CA-VE, com valor negativo (-2,32), pode ser compreendida considerando que, para concentrações maiores de aglutinante (30%) o complexante deve ficar envolvido pelo aglutinante a ponto de impedir sua polimerização e/ou complexação com os íons Ni^{+2} . Do mais, a pasta torna-se menos condutora. Assim, o efeito negativo da interação CA-VE em seus níveis menores (10%, 650mV) proporcionou uma resposta analítica maior, resultado de uma maior exposição do complexante para a eletropolimerização. Com disso, temos uma maior complexação dos íons Ni^{+2} e conseqüentemente uma maior oxidação de carboidratos e uma maior resposta analítica. Por fim, as últimas variáveis avaliadas, concentração de complexante e potencial de eletropolimerização não se mostraram significativas no sistema em estudo (efeitos inferiores ao nível de significância p de 0,05). Desse modo, adotaram-se o uso de óleo mineral como aglutinante e concentração de complexante de 0.44%⁸⁹.

Diante dos resultados obtidos acerca das variáveis e interações significativas na confecção da pasta de carbono, partiu-se para a execução do planejamento Doehlert, visando encontrar os níveis ótimos para as variáveis significativas que foram pré-avaliadas no ensaio anterior.

Nesta etapa seguinte da otimização, as variáveis CA e VE foram estudadas, executando sete experimentos (TABELA 4).

Tabela 4 – Matriz de Doehlert usada na otimização da confecção da pasta de carbono e os resultados obtidos no experimento.

Ensaio	CA (%)	VE (mV)	ΔI_{Pa}
5	8 (-0.5)	700 (0.866)	14,85
7	16 (0.5)	700 (0.866)	25,56
6	20 (1)	600 (0)	11,71
1	16 (0.5)	500 (-0.866)	15,73
3	8 (-0.5)	500 (-0.866)	4,365
6	4 (-1)	600 (0)	7,667
2	12 (0)	600 (0)	53,69
8	12 (0)	600 (0)	57,09
4	12 (0)	600 (0)	62,29

*Os números entre parênteses representam os níveis codificados das variáveis enquanto que os números precedidos representam os níveis reais da matriz de Doehlert.

No experimento disposto na Tabela 4, cinco níveis foram avaliados para a variável mais significativa (CA), enquanto apenas três foram empregados para o VE.

Os dados obtidos na execução dos sete experimentos que compõem esta matriz de Doehlert geraram a equação:

$$I_{Pa} = -1191.6 + 18.875 CA - 0.75002CA^2 + 3.7233 VE - 0.0030563EV^2 - 0.00040937 CA.VE$$

que representa a relação entre as variáveis estudadas (CA e VE) e a resposta analítica (I_{Pa}).

A ANAVA (Tabela 5) foi empregada para avaliar a significância do modelo quadrático representado pela equação **Erro! Fonte de referência não encontrada..**

Tabela 5 – ANAVA obtida para o modelo quadrático gerado pela matriz de Doehlert

Efeitos	Soma dos quadrados	Graus de liberdade	Média dos quadrados	Teste F	Nível de probabilidade (p)
CA	75,807	1	75,807	4,0409	0,182123
CA ²	2764,973	1	2764,973	147,3866	0,006717
VE	103,175	1	103,175	5,4997	0,143657
VE ²	1992,789	1	1992,789	106,2254	0,009283
CA x VE	0,107	1	0,107	0,0057	0,946610
Falta de ajuste	54,192	1	54,192	2,8887	0,231304
Erro puro	37,520	2	18,760		
Total	4248,745	8			

$R^2 = 0,9784$ e R^2 ajustado = 0,9424

De acordo com a ANAVA, nota-se que o nível de probabilidade (p) para a falta de ajuste ($p = 0,231$) não é significativa ao nível de 95% de confiança revelando que o modelo não apresenta falta de ajuste.

A representação gráfica do modelo quadrático válido é dada pela superfície de resposta mostrada na Figura 28.

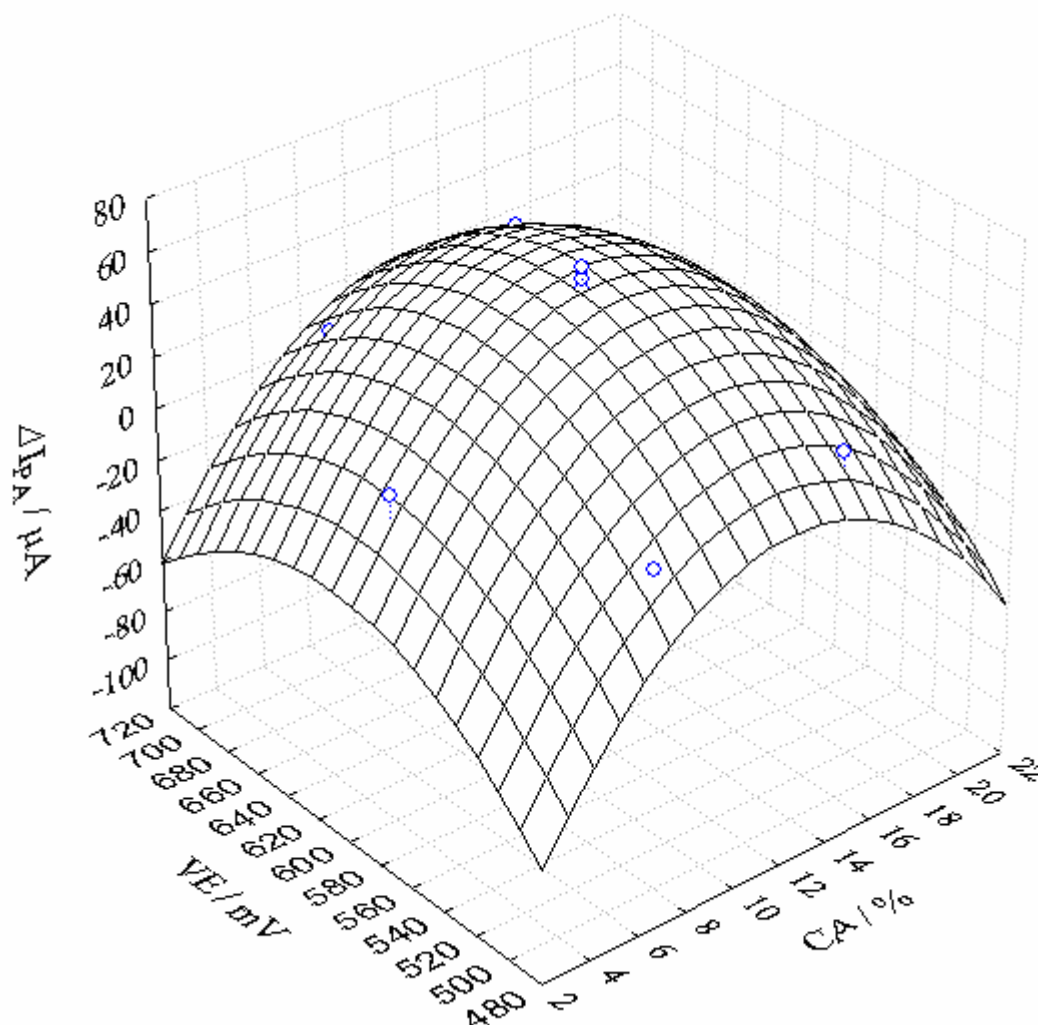


Figura 28 – Superfície de resposta obtida a partir do modelo quadrático representado pela **Erro! Fonte de referência não encontrada.**

A Figura 28 indica uma região de ótimo para ambas variáveis testadas, cuja presença dos valores máximos pôde ser constatada aplicando a primeira e segunda derivada da **Erro! Fonte de referência não encontrada.** ou simplesmente através dos módulos do programa que permite o cálculo direto. Os valores de máximo para o CA e a VE foram 12,4% e 608 mV , respectivamente.

Na Figura 29 estão apresentadas as respostas de voltametria cíclica obtidas para o eletrodo de pasta de carbono modificado, após otimização, em (a), solução de NaOH 0,1 mol.L⁻¹ e em (b), glicose 1mmol.L⁻¹ em NaOH 0,1 mol.L⁻¹. Pode-se notar na Figura 29 linha a que a resposta de VC do eletrodo exibe os picos anódico e catódico bem definidos associados ao par redox de Ni(II)/Ni(III). No entanto, na presença de glicose (FIGURA 29 linha b) há um aumento na corrente de pico

anódica e uma diminuição da corrente de pico catódica. Este comportamento é compatível a da oxidação mediada por catalisador que é regenerado após a oxidação do analito. O mecanismo de oxidação para este tipo de eletrodo já foi discutido por Ojani e colaboradores⁸⁹ e está representado na equação:

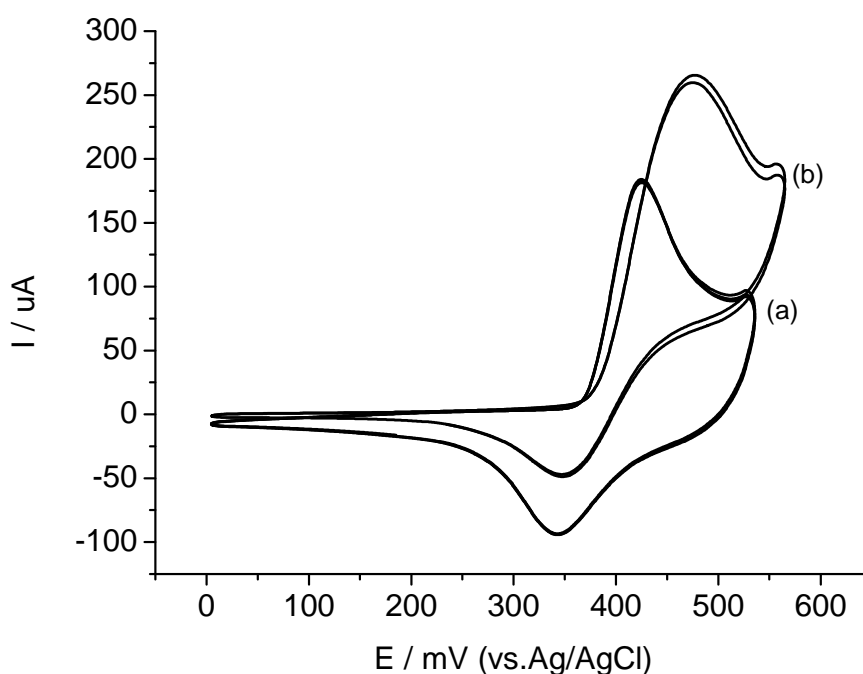
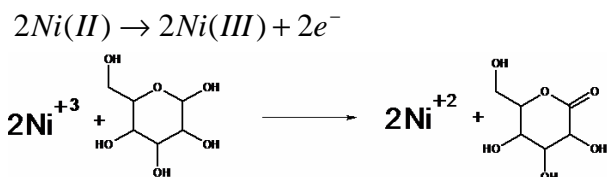


Figura 29 – Resposta eletroquímica para o eletrodo de pasta de carbono otimizado para: (a) solução de NaOH 0,1 mol.L⁻¹; (b) solução de glicose 1 mmol.L⁻¹ em NaOH 0,1 mol.L⁻¹.

Os voltamogramas cíclicos obtidos em solução de glicose 1 mmol.L⁻¹ com o eletrodo de pasta de carbono modificado para várias velocidades de varredura de potencial estão apresentados na Figura 30 (linha a) e, como pode ser notado, com aumento na velocidade de varredura de potencial, o potencial de pico para oxidação catalítica da glicose também aumenta, sugerindo uma limitação cinética na reação entre a glicose e os ions Ni⁺² do eletrodo. A partir da equação de Randles-Sevcik (**Erro! Fonte de referência não encontrada.**) sabemos que a linearidade da

corrente de pico anódica em função da raiz quadrada da velocidade de varredura de potencial (FIGURA 30 linha b) indica que o processo de transferência de massa para interface eletrodo/solução é limitado por difusão.

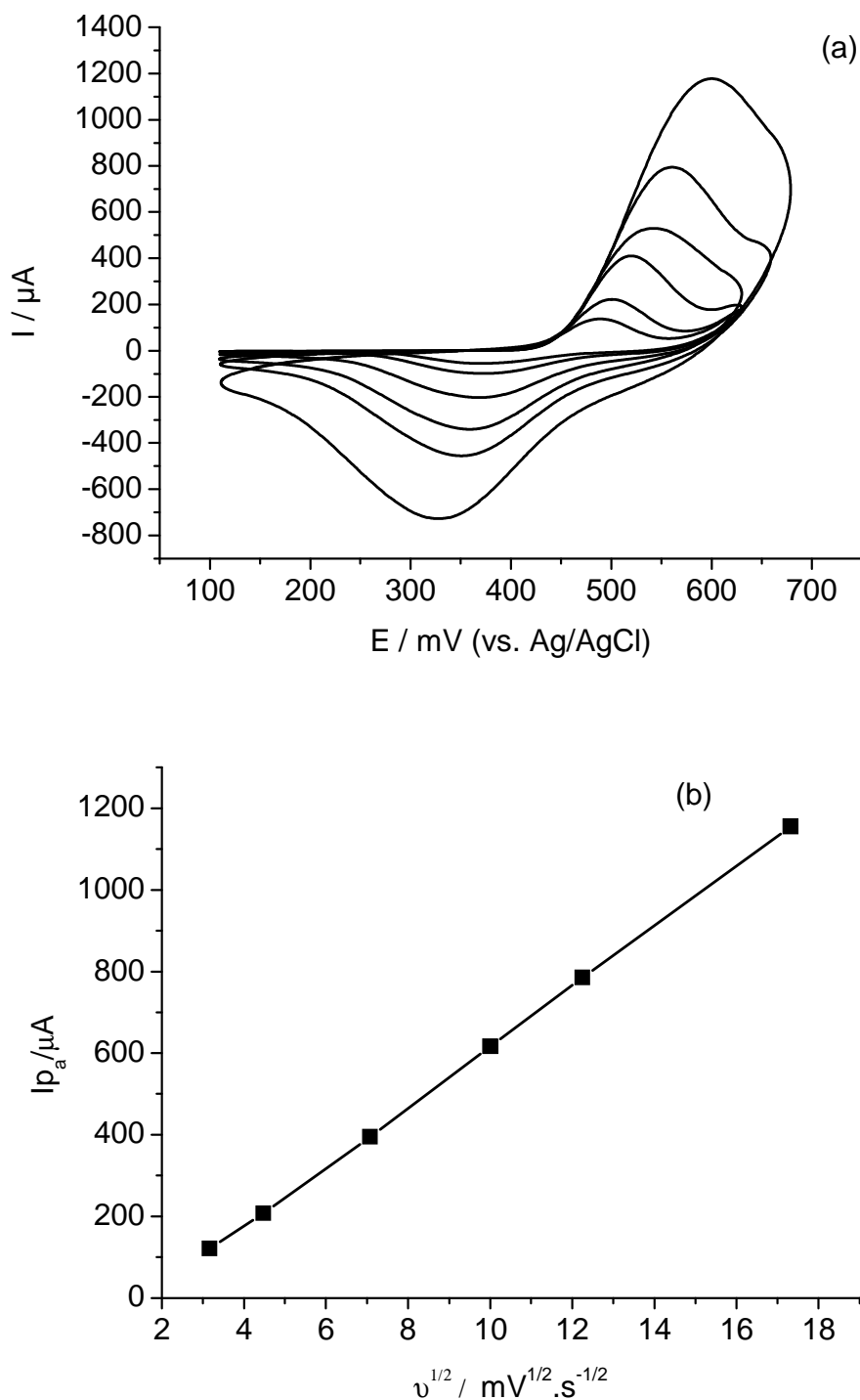


Figura 30 – (a) Dependência dos picos de correntes com a variação das taxas de varredura, taxas de varreduras: (A) 10, (B) 20, (C) 50, (D) 100, (E) 300 mV s^{-1} em solução glicose 1,00 m mol L^{-1} em NaOH 0,1 mol L^{-1} . (b) Gráfico de I_{p_a} vs $v^{1/2}$.

10.2 AVALIAÇÃO DA SENSIBILIDADE DO ELETRODO DE PASTA DE CARBONO FRENTE A VÁRIOS CARBOIDRATOS, ENTRE ELES, OLIGOSSACARÍDEOS PREBIÓTICOS

A sensibilidade do eletrodo frente à oxidação de glicose foi avaliada para uma faixa de concentrações de 0,25 a 1 mmol.L⁻¹ em NaOH 0,1 mol.L⁻¹. Os voltamogramas cíclicos estão apresentados na Figura 31. Inserido no VC temos apresentada à curva de calibração linear obtida a partir das correntes de pico anódico de cada concentração.

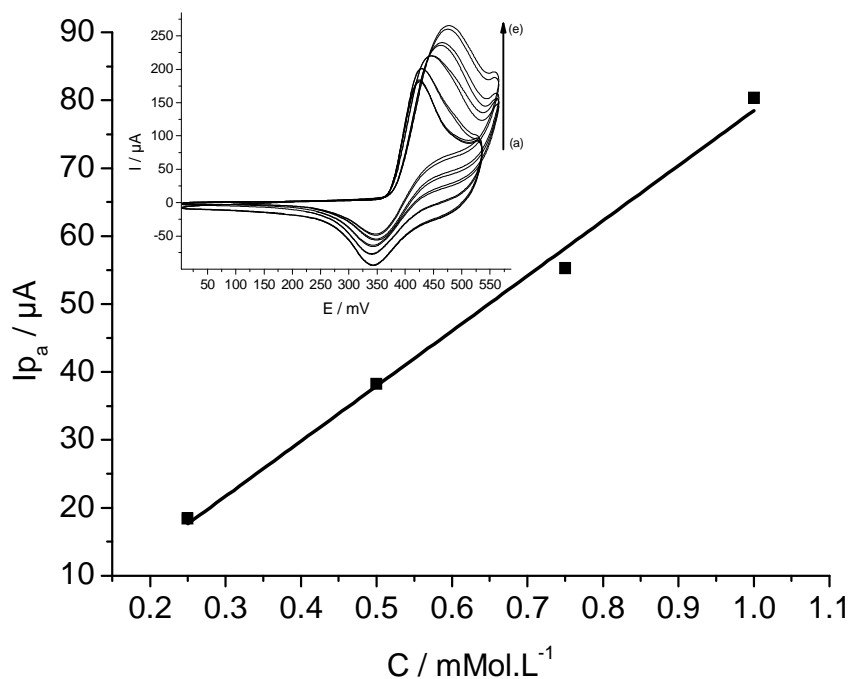


Figura 31 – Curva de calibração obtida a partir dos valores de corrente de pico anódico do eletrodo de pasta de carbono modificada para diferentes concentrações de glicose em NaOH 0,1 mol.L⁻¹: (a) 0,00; (b) 0,25; (c) 0,50; (d) 0,75 e (e) 1 mmol.L⁻¹ de glicose. Inseto estão apresentados os voltamogramas cíclicos obtidos.

A curva de calibração representativa das respostas de I_{p_a} está apresentada na equação:

$$I_{p_a} = 81,13 [\text{glicose}] - 2,643$$

que proporcionou um coeficiente de correlação linear de 0,991.

Como pode se notado, o eletrodo modificado apresenta resposta linear para glicose com um bom coeficiente de correlação linear. Assim sendo, foi realizado a avaliação da sensibilidade de vários outros carboidratos, entre eles, os oligossacarídeos prebióticos de interesse. Os resultados obtidos estão expressos na Tabela 6.

Tabela 6 – Parâmetros obtidos para a quantificação de vários carboidratos com o eletrodo de pasta de carbono modificado.

Açúcares	Inclinação ($\mu\text{A}/\text{mMol.L}^{-1}$)	R^2	LD (mMol.L^{-1})
Glicose	81,13	0,991	0,0407
Lactose	45,61	0,962	0,0723
Maltose	58,78	0,985	0,0561
Raminose	78,25	0,969	0,0422
Sacarose	41,12	0,999	0,0803
Galactose	90,79	0,998	0,0363
Frutose	111,6	0,979	0,0296
Arabinose	58,50	0,989	0,0564
Fucose	47,07	0,995	0,0701
Manose	38,55	0,994	0,0856
Trealose	55,19	0,980	0,0597
Xilose	70,62	0,994	0,0467
Oligossacarídeos	Inclinação ($\mu\text{A}/\text{mg.L}^{-1}$)	R^2	LD (mg.L^{-1})
ALG	_____	_____	_____
MOS	_____	_____	_____
kefiano	0,4819	0,979	4,856
FOC	0,01225	0,993	191,0
IN	0,00287	0,998	637,6

A partir da Tabela 6 verificou-se que o eletrodo de pasta de carbono modificado é sensível para vários carboidratos, não sendo sensível apenas para os oligossacarídeos alginato (ALG) e mananoligossacarídeo (MOS). Alguns carboidratos estudados nesse trabalho já haviam sido estudados com aplicação desse eletrodo por Ojani e colaboradores⁸⁹.

Em outro ensaio foi realizado um estudo de cronoamperometria para os oligossacarídeos prebióticos em um potencial fixo de 425 mV. Esse potencial corresponde o potencial de oxidação desses carboidratos verificado por voltametria ciclica. A Figura 32 representa os resultados obtidos para o quefirano. A partir desse

experimento foi obtido uma resposta linear com coeficiente de correlação linear (R^2) igual a 0,9951.

Para o fruto-oligossacarídeos de chicória as respostas estão apresentadas na Figura 33. Observa-se uma linearidade para uma faixa de concentração indo de 10,0 a 100 mg.L⁻¹ com um coeficiente de correlação de 0,9953.

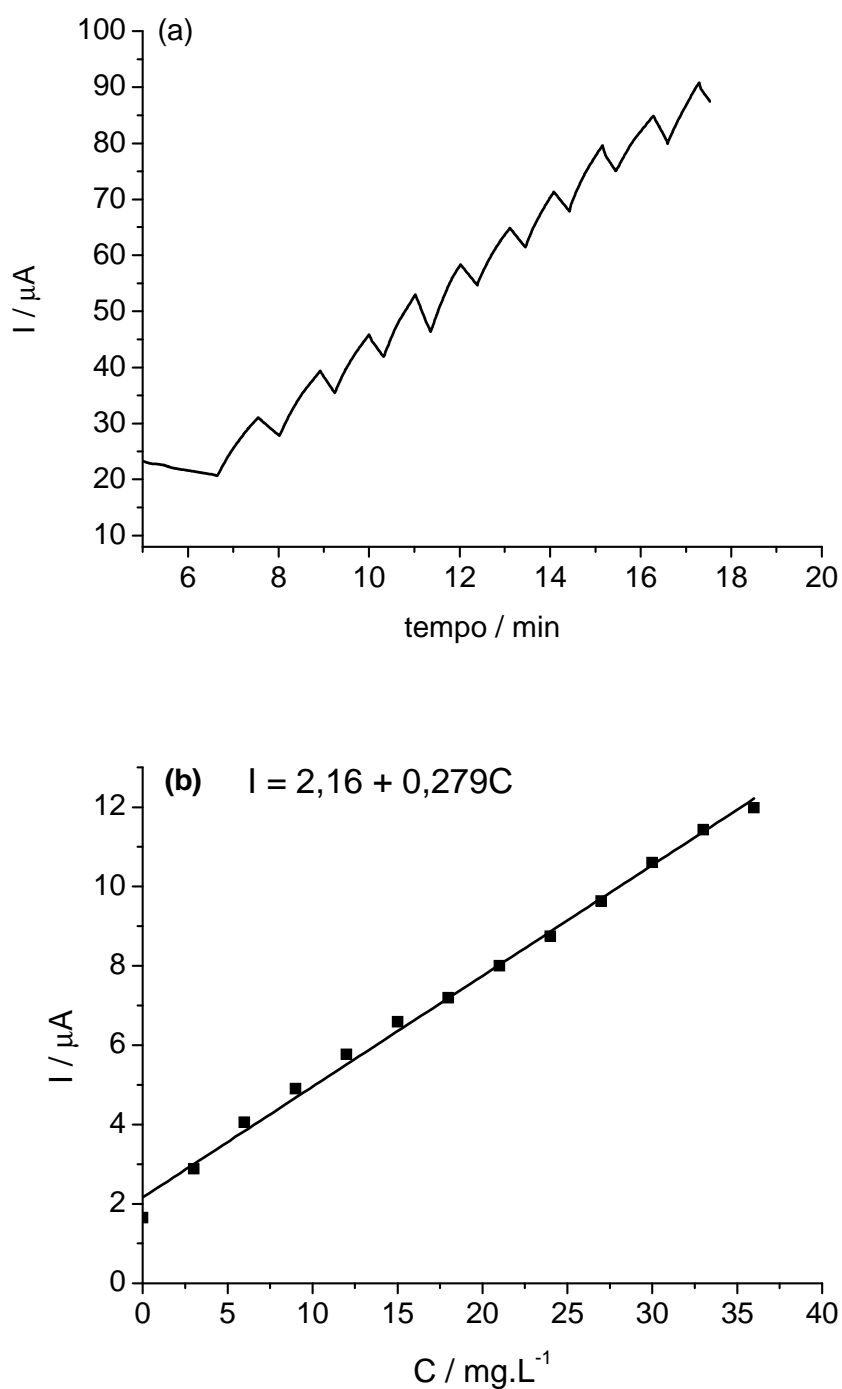


Figura 32 – (a) Resposta de corrente-tempo para uma solução de NaOH 0,1 M no eletrodo otimizado

com a adição de volumes constantes de solução de quefirano em NaOH 0,1M correspondente a um aumento de 3 mg.L^{-1} . A faixa de concentrações foi de 3 a 36 mg.L^{-1} . (b) Curva de calibração linear obtida com os valores de corrente máxima obtida injeção de alíquotas. As medidas foram conduzidas em um potencial fixo de 425 mV.

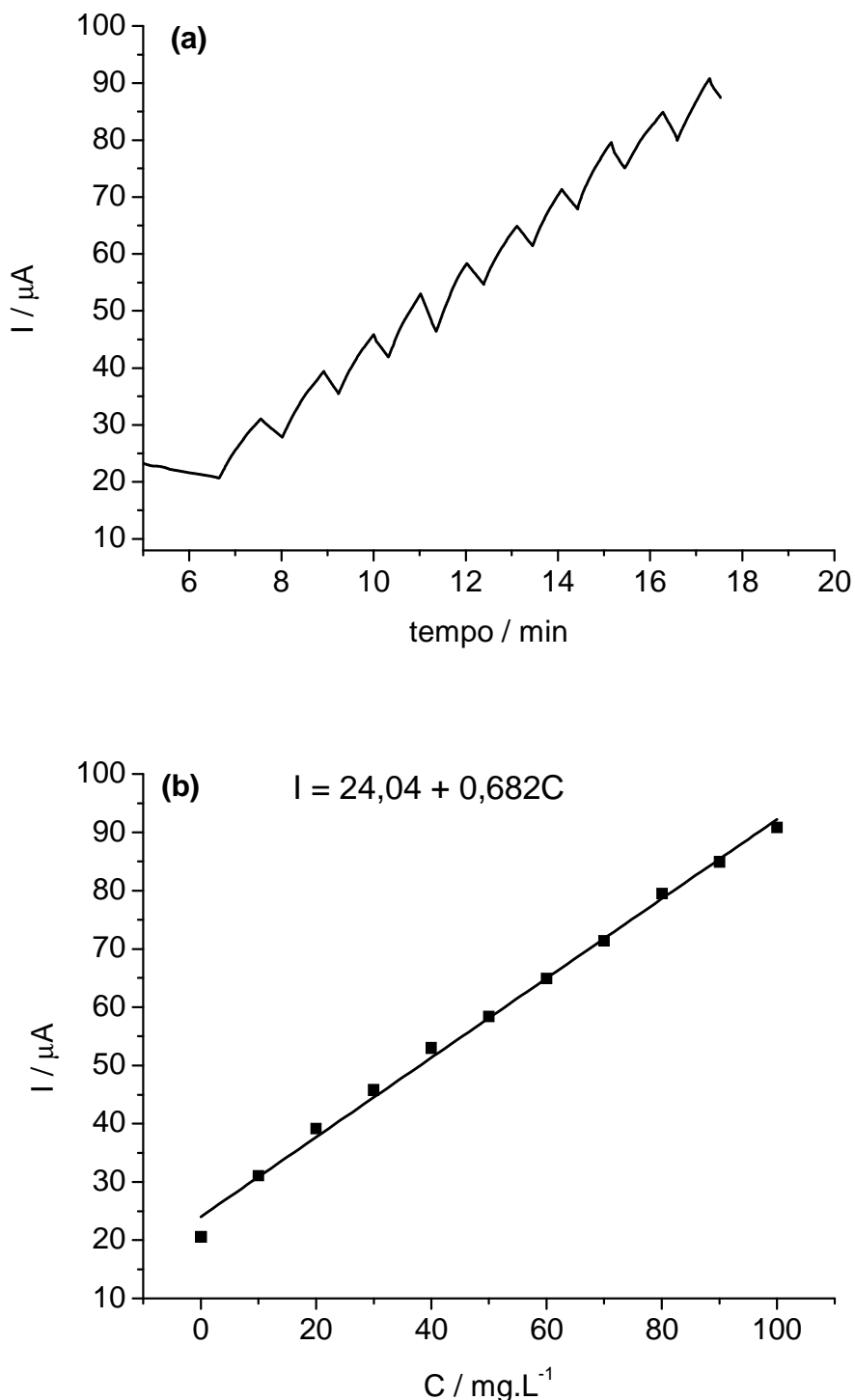


Figura 33 – (a) Resposta de corrente-tempo para uma solução de NaOH 0,1 M no eletrodo otimizado com a adição de volumes constantes de solução de FOC em NaOH 0,1M correspondente a um aumento de $10,0 \text{ mg.L}^{-1}$. A faixa de concentrações foi de $10,0$ a $100,0 \text{ mg.L}^{-1}$. (b) Curva de calibração linear obtida com os valores de corrente máxima obtida injeção de alíquotas. As medidas foram conduzidas em um potencial fixo de 425 mV.

mV.

No estudo realizado para a inulina (FIGURA 34) foi obtido respostas de corrente com uma correlação linear de 0,9904 para uma faixa de concentração de 200 a 2600 mg.L⁻¹. Esses resultados nos mostram que o eletrodo otimizado é promissor para a quantificação dos oligossacarídeos inulina, quefirano e FOC e pode ser aplicado para estudos envolvendo esses carboidratos. Como desvantagem do eletrodo, temos o fato dele não ser específico, respondendo para vários carboidratos como foi mostrado nesse trabalho. Dessa forma, esse eletrodo é um eletrodo geral que pode ser aplicado para quantificar os carboidratos puros em banho ou na saída de sistemas de separação.

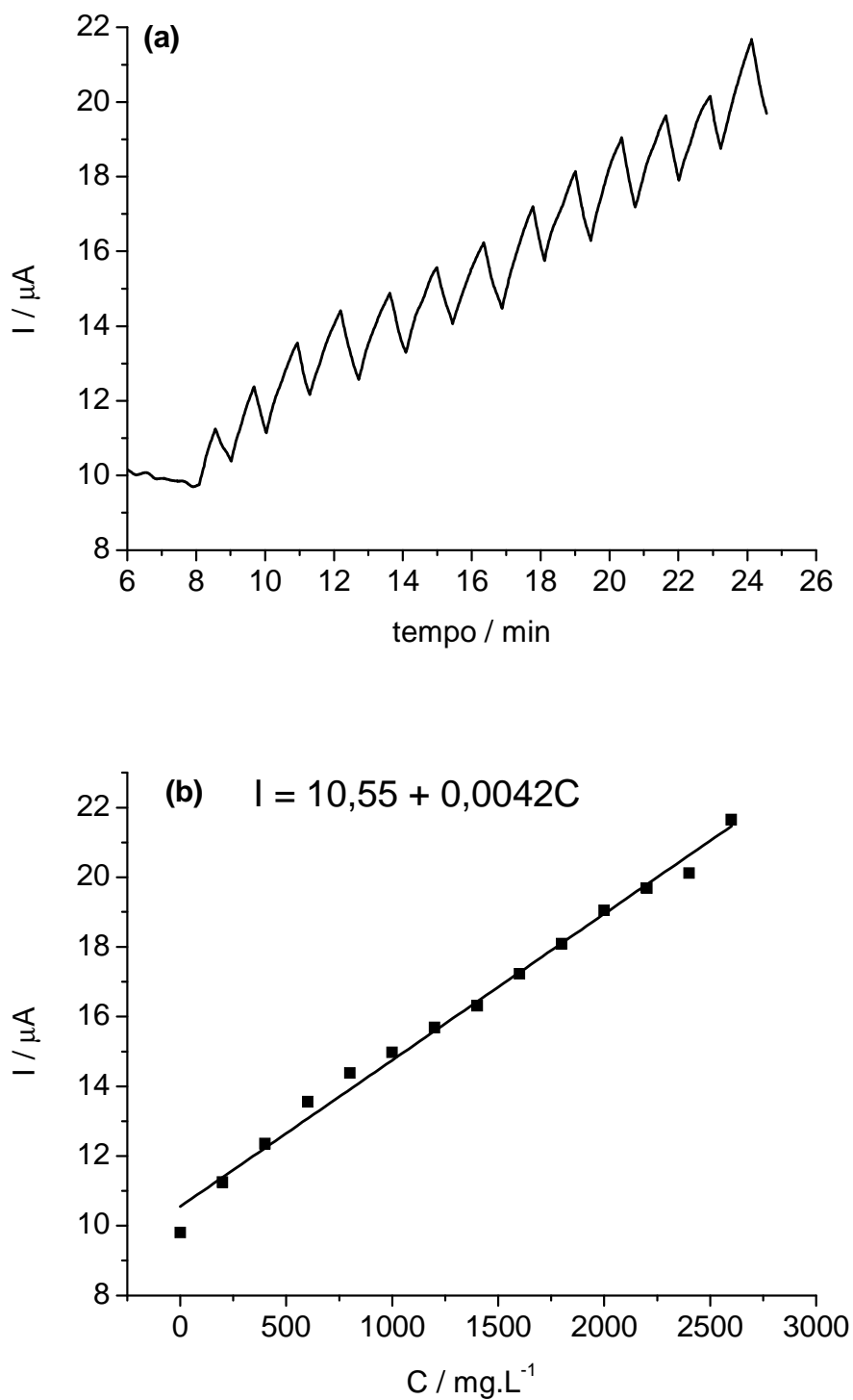


Figura 34 – (a) Resposta de corrente-tempo para uma solução de NaOH 0,1 M no eletrodo otimizado com a adição de volumes constantes de solução de inulina em NaOH 0,1M correspondente a um aumento de 200 mg.L^{-1} . A faixa de concentrações foi de 200,0 a 2600,0 mg.L^{-1} . (b) Curva de calibração linear obtida com os valores de corrente máxima obtida injeção de alíquotas. As medidas foram conduzidas em um potencial fixo de 425 mV.

11 CONCLUSÕES

Os resultados permitem concluir que:

- ✓ O eletrodo de pasta de carbono foi otimizado e apresentou maiores respostas analíticas quando foi utilizado o aglutinante óleo mineral a 12,4%, com concentração de complexante de 0,44% e potencial de eletropolimerização de 608 mV;
- ✓ O eletrodo otimizado foi caracterizado e apresentou limitação no processo de transferência de carga limitado por difusão;
- ✓ O eletrodo de pasta de carbono otimizado usando Planejamento Fatorial e Matriz de Doehlert possibilitou a detecção de vários carboidratos por voltametria cíclica;
- ✓ Usando a técnica de cronoamperometria obteve-se respostas de $I \times C$ lineares para os oligossacarídeos prebióticos estudados;
- ✓ O eletrodo otimizado mostrou-se promissor para a quantificação dos oligossacarídeos inulina, quefirano e FOC em estudos onde o meio altamente alcalino não seja limitante.

APENDICE

Artigo em construção para submissão prevista para março de 2009.

Application of Poly(α -naphthylamine)/Nickel Modified Carbon Paste Electrode to Quantification Electrocatalytic of Oligosaccharides Prebiotics

Abstract

The electrochemical detection of carbohydrates, which are important in many medical, biological and industrial applications, because of its simplicity, selectivity and low cost. Recent research has demonstrated the coating the electrode surface with polymeric films is an attractive approach for enhancing the power and scope of electrochemically modified electrodes. In this work an poly(1-naphthylamine)/nickel modified carbon paste electrode is optimized to oligosaccharides prebiotics quantification. The optimum sensitive to glucose is orbited using 0.44% of α -naphthylamine, 67/32.46% of graphite powder / nujol. In the construction of electrode initially the paste of carbon \ α - naphthylamine passed went by a stage of electropolymerization carried out in 0.2 M HClO₄ by holding the potential at 0.65 V for 250 s. For to incorporate Ni(II) ions into the polymeric film, the electrode was placed in a well stirred aqueous solution of 0.1 M NiCl₂. Oxidation of carbohydrates was studied cyclic voltammetric experiments in 0.1 M NaOH, scan rate 50 mV/s and potential range from 0.150 to 0.580V. In the work were studied eighteen carbohydrates (mono, di and polysaccharides) obtaining calibration graph linear to sixteen carbohydrates with correlation coefficients from 0.984 to 0.999 respectively to rhamnose and sucrose. The modified electrode provided quantification limits of 16.18, 636.7 and 2125.44 to oligosaccharides from Kefir, fructooligosaccharides from chicory and inulin. This way the modified electrode represent a potentially significant advancement in the attendance of biotechnological processes.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 ANJO, D. L. C. Alimentos funcionais em angiologia e cirurgia vascular. **Jornal Vascular Brasileiro**, v. 3, p. 145- 154, 2004.
- 2 ROBERFROID, M. Functional food concept and its application to prebiotics. **Digestive and Liver Disease**, v. 34, p. 105-110, 2002.
- 3 ALZEM, R. L. Functional foods. **Trends in Food Science and Technology**, v. 15, p. 518, 2004.
- 4 NEUMANN, P. et al. Alimentos saudáveis, alimentos funcionais, fármaco alimentos, nutracêuticos. **Higiene Alimentar**, v. 14, p. 19-23, 2002.
- 5 TAIPINA, M. S.; FONTES, M.; A. S.; COHEN, V. H. Alimentos funcionais – nutracêuticos. **Higiene Alimentar**, v. 16, p 28-29, 2002.
- 6 HILLIAM, M. Fortified juice trends. **The World of Food Ingredients**, v. 12, p. 17-19, 2000.
- 7 SLOAN, E. The top 10 functional food trends. **Food Technology**, v. 56, p. 32-57, 2002.
- 8 BENKOUIDER, C. Functional foods: a global overview. **International Food 872 Ingredients**, v. 5, p. 66-68, 2004.
- 9 SIRÓ, I. et al. Functional food: product development, marketing and consumer acceptance – a review. **Appetite**, v. 51, p 456-67, 2008.
- 10 RIBEIRO, E. P.; SERAVALLI, E. A. G. **Química de alimentos**. São Paulo: Edgard Blucher, 2004.
- 11 MORAES F. P.; COLLA L. M. Alimentos funcionais e nutracêuticos: definições, legislação e benefícios à saúde. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 3, p. 99, 2006.
- 12 SAAD, S. M. I. Probióticos e prebióticos: o estado da arte. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 42, p. 1, 2006.

-
- 13 SPIEGEL, J. E.; ROSE, R.; KARABELL, P. Safety and benefits of fructooligosaccharides as food ingredients. **Food Technology**, v.48, p. 85-89, 1994.
- 14 MARCHESSAULTT, R. H. et al. Conformation and crystalline structure of (2-+1)-P-D-fructofuranan (inulin). **Canadian Journal of Chemistry**, v. 58, p. 2415, 1980.
- 15 KOOIMAN, P. The chemical structure of kefiran, the water-soluble polysaccharide of the kefir grain, **Carbohydrate Reserch**, v. 7, p. 200-211, 1967.
- 16 MOREIRA, M. E. C. et al. Atividade antiinflamtória de carboidrato produzido por fermentação aquosa de grãos de quefir. **Química Nova**, v. 31, p. 1738-1742, 2008.
- 17 MAEDA, H. et al. **Jounal of Agriculture Food Chemical**, v. 52, p. 5533 – 5543, 2004.
- 18 KABAYAMA, S. et al. Enhancing effects of food components on the production of interferon β from animal cells suppressed by stress hormones. **Cytotechnology**, v. 23, p. 119-125, 1997.
- 19 VIDEROLA, C. G. et al. Effects of the oral administration of the products derived from milk fermentation by kefir microflora on immune stimulation. **Journal of Dairy Research**, v. 73, p. 472-479, 2006.
- 20 VIDEROLA, C. G. et al. Immunomodulating capacity of commercial fish protein hydrolysate for diet supplementation, **Immunobiology**, v. 211, p. 341-50, 2006.
- 21 LIU, J. R. et al. Antitumor activity of milk kefir and soy milk kefir in tumor-tearing mice, **Nutrition and Cancer**, v. 44, p. 183-187, 2002. Disponível em: <<http://www.informaworld.com/smpp/title~db=all~content=t775653687~tab=issue~slist~branches=44 - v44>>. Acesso: 20 ago. 2008.
- 22 RODRIGUES, K. L. et al. Antimicrobial and healing activity of kefir and kefiran extract. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 25, p. 404-408, 2005.
- 23 JENNIFER, L. et al. Effects of dietary inulin on serum lipids, blood glucose and the gastrointestinal environment in hypercholesterolemic men. **Nutrition Research**, v. 20, p. 191-201, 2000.
- 24 DAVIDSON, M. H. et al. Effects of dietary inulin on serum lipids in men and women with hypercholesterolemia. **Nutrition Research**, v. 18, p. 503-517, 1998.

-
- 25 VANHOOF, K.; DE SCHRIJVER, R. Effect of unprocessed and baked inulin on lipid metabolism normo- and hypercholesterolemic rats. **Nutrition Research**, v. 15, p. 1637-1646, 1995.
- 26 HAND, E. D., GEYPENS, B., GHOOS, Y. Effect of high performance chicory inulin on constipation. **Nutrition Research**, v. 20, p. 731-736, 2000.
- 27 TIEN, H. T.; OTTOVA, A. L. The lipid bilayer concept and its experimental realization: from soap bubbles, kitchen sink, to bilayer lipid membranes. **Journal of Membrane Science**, v. 189, p. 83–117, 2001.
- 28 SCHREIER, S.; MALHEIROS, S. V. P.; PAULA, E. Review - Surface active drugs: self-association and interaction with membranes and surfactants. Physicochemical and biological aspects. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1508, p. 210-234, 2000.
- 29 SEYDEL, J. K.; WIESE, M. **Drug-membrane interactions**. New Jersey: VCH publishers, 2002, 350 p.
- 30 WANG, J. **Analytical electrochemistry**. 3. ed. New Jersey: John Wiley, 2006. 262 p.
- 31 BAGOTSKY, V. S. **Fundamentals of electrochemistry**. 2. ed. New Jersey: John Wiley, 2006. 719 p.
- 32 ZOSKI, C. G. **Handbook of electrochemistry**. Amsterdam: Elsevier, 2007. 935p.
- 33 GREEF, R. et al. **Instrumental methods in electrochemistry**. New York: John Wiley, 1985. 450 p.
- 34 KISSIAGER, P. T.; HEHIEMMI, W. R. **Techniques in electroanalytical chemistry**. 2. ed. New York: Marcel Dekker, 1996. 350 p.
- 35 TIEN, H. T.; SALAMON, Z. Formation of self-assembled lipid bilayers on solid substrates. **Bioelectrochemistry and Bioenergetics**, v. 22, p. 211-218, 1989.
- 36 HARRIS, J. J.; BRUENING, M. L. Electrochemical and in situ ellipsometric investigation of the permeability and stability of layered polyelectrolyte films. **Langmuir**, v. 16, p. 2006-2013, 2000.
- 37 DU, L. D. et al. A study on the interaction between ibuprofen and bilayer lipid membrane. **Electrochemical Acta**, v. 51, p. 5754 - 5760, 2006.

-
- 38 LAPUTKOVA, G.; SABO, J. Cyclic voltammetry study of glucose and insulin interactions with supported lipid membrane. **Bioelectrochemistry**, v. 56, p. 185-188, 2002.
- 39 LIU, X.; HUANG, W.; WANG, E. An electrochemical study on the interaction of surfactin with a supported bilayer lipid membrane on a glassy carbon electrode. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 577, p. 349-354, 2005.
- 40 LIU, X. et al. Concentration and time dependant behavior of chlorpromazine interaction with supported bilayer lipid membrane. **Electrochimica Acta**, v. 51, p. 2512-2517, 2006.
- 41 HUANG, W. et al. Concentration-dependent behavior of nisin interaction with, supported bilayer lipid membrane. **Biophysical Chemistry**, v. 99, p. 271-279, 2002.
- 42 MA, Y. et al. The reassembled behavior of bilayer lipid membranes supported by Pt electrode. **Journal of Membrane Science**, v. 286, p. 174-179, 2006.
- 43 HAN, X. et al. Study of the interaction between lanthanide ions and a supported bilayer lipid membrane by cyclic voltammetry and ac impedance. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 523, p. 136-141, 2002.
- 44 LU, X. et al. Interaction of Quercetin with Supported Bilayer Lipid Membranes on Glassy Carbon Electrode. **International Journal of Electrochemistry and Science**, v. 3, p. 797-805, 2008.
- 45 AMATORE, C.; SAVEANT, J. M.; TESSIER, D. Charge transfer at partially blocked surfaces a model for the case of microscopic active and inactive sites. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 147, p. 39-50, 1983.
- 46 BARD, A. J.; FAULKNER, L. R. **Electrochemical Methods - Fundamentals and applications**. 2. ed. New Jersey: John Wiley, 2001. 850 p.
- 47 DIAO, P. et al. Cyclic voltammetry and a.c. impedance studies of Ca^{2+} -induced ion channels on Pt-BLM, **Bioelectrochemistry and Bioenergetics**, v. 45, p. 173-179, 1998.
- 48 DIAO, P. et al. Ca^{+2} induced $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ electron transfer at Pt supported BLM electrode. **Bioelectrochemistry and Bioenergetics**, v. 44, p. 285-288, 1998.

-
- 49 WANG, J. et al. Interaction of $K_7Fe^{3+}P_2W_{17}O_{62}H_2$ with supported bilayer lipid membranes on platinum electrode. **Biophysical Chemistry**, v. 106, p. 31-38, 2003.
- 50 MA, Y. et al. The reassembled behavior of bilayer lipid membranes supported by Pt electrode. **Journal of Membrane Science**, v. 286, p. 174-179, 2006.
- 51 SHIRAI, O. et al. Ion transfer through a liquid membrane or a bilayer lipid membrane in the presence of sufficient electrolytes. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 389, p. 61–70, 1995.
- 52 TOTH, A. B. CHAMBERS, J. Q. **Electroanalytical Methods for Biological Materials**. Marcel Dekker Inc. New York. 2002. 553 p.
- 53 PLANT, A. L. Self-assembled phospholipid/alkanethiol biomimetic bilayers on gold. **Langmuir**, v. 9, p 2764–2767, 1993.
- 54 FAVERO, G.; ANNIBALE, A. D.; CAMPANELLA, L. Membrane supported bilayer lipid membranes array: preparation, stability and ion-channel insertion. **Analytical Chimica Acta**, v. 460, p. 23–34, 2002.
- 55 WANG, J. et al. The influence of surfactant on the electron-transfer reaction at self-assembled thiol monolayers modifying a gold electrode. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 484, p. 88–92, 2000.
- 56 HAN, X. et al. Study of the interaction between lanthanide ions and a supported bilayer lipid membrane by cyclic voltammetry and ac impedance. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 523, p. 136-141, 2002.
- 57 WILKE, N.; BARUZZI, A. M. Comparative analysis of the charge transfer processes of the $Ru(NH_3)_6^{3+}/Ru(NH_3)_6^{2+}$ and $Fe(CN)_6^{3-}/Fe(CN)_6^{4-}$ redox couples on glassy carbon electrodes modified by different lipid layers, **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 537, p. 67-76, 2002.
- 58 SATO, H. et al. Ionophore incorporated bilayer lipid membranes that selectively respond to metal ions and induce membrane permeability changes. **Biosensors & Bioelectronics**, v. 13, p. 1035–1046, 1998.
- 59 HUANG, W. et al. Ion channel behavior of amphotericin B in sterol-free and cholesterol ergosterol-containing supported phosphatidylcholine bilayer model membranes investigated by electrochemistry and spectroscopy. **Biophysical Journal**, v. 83, p. 3245–3255, 2002.

-
- 60 CROWE, L. M.; CROWE, J. H.; CHAPMAN, D. Interaction of carbohydrates with dry dipalmitoylphosphatidylcholine. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 236, p. 289-296, 1985.
- 61 GRDADOLNIK, D.; HADZI. FT infrared and Raman investigation of saccharide–phosphatidylcholine interactions using novel structure probes. **Spectrochimica Acta Part A**, v. 54, p. 1989-2000, 1998.
- 62 DEMEL, R. A. et al. Fructans interact strongly with model membranes. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1375, p. 36-42, 1998.
- 63 MINAMISAWA, T.; SUZUKI, K.; HIRABAYASHI, J. Multistage mass spectrometric sequencing of keratan sulfate-related oligosaccharides. **Analytical Chemistry**, v. 78, p. 891-900, 2006.
- 64 JANSSON, P.; STENUTZ, R.; WIDMALM, G. Sequence determination of oligosaccharides and regular polysaccharides using NMR spectroscopy and a novel web-based version of the computer program CASPER. **Carbohydrate Research**, v. 341, p. 1003-1010, 2006.
- 65 JIANG, Y.; COLE, R. B. Oligosaccharide analysis using anion attachment in negative mode electrospray mass spectrometry. **Journal of The American Society for Mass Spectrometry**, v. 16, p. 60-70, 2005.
- 66 AGUILAN, J. T. Structural analysis of k-carrageenan sulfated oligosaccharides by positive mode nano-ESI/FTICR-MS and MS/MS by SORI-CID. **Journal of The American Society for Mass Spectrometry**, v. 17, p. 96-103, 2006.
- 67 SORIA-DRÁZ, M. E. et al. Structural determination of the lipo-chitin oligosaccharide nodulation signals produced by *Rhizobium giardinii* bv. *Giardinii* H152. **Carbohydrate Research**, v. 338, p. 237-250, 2003.
- 68 ZAIA, J. et al. Tandem mass spectrometric strategies for determination of sulfation positions and uronic acid epimerization in chondroitin sulfate oligosaccharides. **Journal of The American Society for Mass Spectrometry**, v. 14, p. 1270-1281, 2003.
- 69 TAGA, A. et al. Capillary electrophoretic determination of the association constant of a protein and a neutral carbohydrate by introducing mercaptoethanesulfonate tags to the carbohydrate. **Journal of Chromatography A**, v. 839, p. 157-166, 1999.

-
- 70 CAMPAA, C. et al. Determination of average degree of polymerisation and distribution of oligosaccharides in a partially acid-hydrolysed homopolysaccharide: a comparison of four experimental methods applied to mannuronan. **Journal of Chromatography A**, v. 1026, p. 271-281, 2004.
- 71 BAIK, Y. S.; CHEONG, W. J. Determination of molecular weight distribution and average molecular weights of oligosaccharides by HPLC with a common C18 phase and a mobile phase with high water content. **Korean Chemical Society**, v. 28, p. 847, 2007.
- 72 PRATER, B. D.; ANUMULA, K. R.; HUTCHINS, J. T. Determination of impurities in α -cyclodextrin by gradient highperformance liquid chromatography with pulsed amperometric detection. **Analytical Biochemistry**, v. 369, p. 202-209, 2007.
- 73 GOODALL, M. J. D.; SHARMAN, I. P. M. Contribution of high-performance liquid chromatographic analysis of carbohydrates to authenticity testing of honey I. **Journal of Chromatography A**, v. 706, p. 353-359, 1995.
- 74 PLATZER, D. J. et al. Determination of impurities in α -cyclodextrin by gradient highperformance liquid chromatography with pulsed amperometric detection. **Journal of Chromatography A**, v. 793, p. 57-62, 1998.
- 75 KURIHARA, T. et al. Determination of fluorescence-labeled asparaginyl-oligosaccharide in lycoprotein by reversed-phase ultraperformance liquid chromatography with electrospray ionization time-of-flight mass spectrometry. **Analytical Chemistry**, v. 79, p. 8694-8698, 2007.
- 76 STIKAROVSKÁ, M.; CHMELÍK, J. Determination of neutral oligosaccharides in vegetables by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, v. 520, p. 47-55, 2004.
- 77 ARIAS, V. C. et al. Determination of oligosaccharide patterns in honey by solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography. **Chromatographia**, v. 58, p. 797, 2003.
- 78 MONTILLA, A. et al. Determination of oligosaccharides by conventional high-resolution gas chromatography. **Chromatographia**, v. 63, p. 453, 2006.
- 79 RAMSAYA, S. L. et al. Determination of oligosaccharides and glycolipids in amniotic fluid by electrospray ionisation tandem mass spectrometry: in utero indicators of lysosomal storage diseases. **Molecular Genetics and Metabolism**, v. 83, p. 231-238, 2004.

-
- 80 MIN, J. Z. et al. Fully automated two-dimensional high-performance liquid chromatography with electrospray ionization time-of-flight mass spectrometry for the determination of oligosaccharides in glycopeptides after enzymic fluorescence labeling. **Journal of Chromatography A**, v. 1160, p. 120-127, 2007.
- 81 EKVALLA, J.; STEGMARKB, R.; NYMAN, M. Optimization of extraction methods for determination of the raffinose family oligosaccharides in leguminous vine peas (*Pisum sativum* L.) and effects of blanching. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 20, p. 13-18, 2007.
- 82 THURL, S.; MÜLLER-WERNER, B.; SAWATZKI, G. Quantification of individual oligosaccharide compounds from human milk using high-pH anion-exchange chromatography. **Analytical Biochemistry**. v. 235, p. 202-206, 1996.
- 83 KAKITA, H. et al. Simultaneous analysis of monosaccharides and oligosaccharides by high-performance liquid chromatography with postcolumn fluorescence derivatization. **Journal of Chromatography A**, v. 961, p. 77-82, 2002.
- 84 KORIR, A. K. et al. Separation and analysis of nanomole quantities of heparin oligosaccharides using on-line capillary isotachopheresis coupled with NMR detection. **Analytical Chemistry**, v. 77, p. 5998-6003, 2005.
- 85 ZHANG, Z. et al. Sequence analysis of alginate-derived oligosaccharides by negative-ion electrospray tandem mass spectrometry. **Journal American Society Mass Spectrometry**, v. 17, p. 621-630, 2006.
- 86 HULTHE, G.; STENHAGEM, G.; FOGELQVIST, E. Comparison de dynamic fast atom bombardment/liquid secondary ion mass spectrometry and electrospray mass spectrometry coupled to reversed-phase liquid chromatography for the determination of oligosaccharides in seawater. **Journal of Chromatography A**, v. 777, p. 141-153, 1997.
- 87 CHAI, W. C. et al. Analysis of chain and blood group type and branching pattern of sialylated oligosaccharides by negative ion electrospray tandem mass spectrometry. **Analytical Chemistry**, v. 78, p. 1581-1592, 2006.
- 88 ZIEGLER, A.; ZAIA, J. Size-exclusion chromatography of heparin oligosaccharides at high and low pressure. **Journal of Chromatography B**, v. 837, p. 76-86, 2006.

89 OJANI, R.; RAOOF, J. B.; SALMANY-AFAGH, P. Electrocatalytic oxidation of some carbohydrates by poly(1-naphthylamine)/nickel modified carbon paste electrode. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 571, p. 1-8, 2004.