

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ASSISTÊNCIA E AVALIAÇÃO
EM SAÚDE**

RAFAEL SOUZA ANTUNES

**DETERMINAÇÃO DE FÁRMACOS FENÓLICOS EM PRODUTOS
FARMACÊUTICOS UTILIZANDO UM BIOSSENSOR DE
POLIFENOLOXIDASE, OBTIDA DE EXTRATO BRUTO DO FRUTO DA
JURUBEBA (*Solanum paniculatum* L.)**

**Goiânia
2018**

**TERMO DE CIENCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR
VERSÕES ELETRÔNICAS DE TESES E DISSERTAÇÕES
NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG**

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), regulamentada pela Resolução CEPEC nº 832/2007, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou *download*, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

1. Identificação do material bibliográfico: Dissertação Tese

2. Identificação da Tese ou Dissertação:

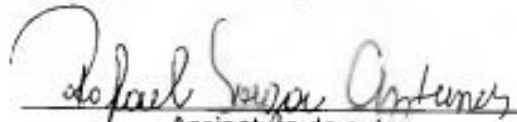
Nome completo do autor: Rafael Souza Antunes

Título do trabalho: Determinação de fármacos fenólicos em produtos farmacêuticos utilizando um biossensor de polifenoloxidase, obtida de extrato bruto do fruto da jurebeba (*Solanum paniculatum* L.)

3. Informações de acesso ao documento:

Concorda com a liberação total do documento SIM NÃO¹

Havendo concordância com a disponibilização eletrônica, torna-se imprescindível o envio do(s) arquivo(s) em formato digital PDF da tese ou dissertação.


Assinatura do autor

Ciente e de acordo:


Assinatura do Orientador
Dr. Flavio Marques Lopes
Faculdade de Farmácia
UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS

Data: 03 /04 / 2018

RAFAEL SOUZA ANTUNES

**DETERMINAÇÃO DE FÁRMACOS FENÓLICOS EM PRODUTOS
FARMACÊUTICOS UTILIZANDO UM BIOSSENSOR DE
POLIFENOLOXIDASE, OBTIDA DE EXTRATO BRUTO DO FRUTO DA
JURUBEBA (*Solanum paniculatum L.*)**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Assistência e Avaliação em Saúde da Universidade Federal de Goiás para obtenção do Título de Mestre em Assistência e Avaliação em Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Flávio Marques Lopes.
Co-orientador: Prof. Dr. Eric de Souza Gil.

**Goiânia
2018**

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UFG.

Souza Antunes, Rafael

DETERMINAÇÃO DE FÁRMACOS FENÓLICOS EM PRODUTOS FARMACÊUTICOS UTILIZANDO UM BIOSENSOR DE POLIFENOLOXIDASE, OBTIDA DE EXTRATO BRUTO DO FRUTO DA JURUBEBA (*Solanum paniculatum* L.) [manuscrito] / Rafael Souza Antunes. - 2018.

LXXII, 72 f.: il.

Orientador: Prof. Dr. Flávio Marques Lopes; co-orientador Dr. Eric de Souza Gil.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Goiás, Faculdade Farmácia (FF), Programa de Pós-Graduação em Assistência e Avaliação em Saúde, Goiânia, 2018.

Bibliografia.

Inclui gráfico, tabelas, lista de figuras, lista de tabelas.

1. *Solanum paniculatum* L. . 2. Polifenoloxidasas. 3. Biossensor enzimático. 4. Fármacos fenólicos. I. Marques Lopes, Flávio, orient. II. Título.

CDU 615.1



ATA DA SESSÃO PÚBLICA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO Nº 20

Aos cinco dias do mês de março do ano de 2018, às 15h 15' no mini auditório da Faculdade de Farmácia da UFG, realizou-se a Defesa de dissertação, intitulada "Determinação de Fármacos fenólicos em produtos farmacêuticos utilizando um biossensor de polifenoloxidase, obtida de extrato bruto do fruto da jurubeba (*Solanum paniculatum* L.)", de autoria de Rafael Souza Antunes, aluno do Programa de Pós-Graduação em Assistência e Avaliação em Saúde, nível: Mestrado. A Comissão Examinadora esteve constituída pelos professores: Flavio Marques Lopes (Presidente), Virginia Farias Alves e Mariângela Fontes Santiago. Concluídos os trabalhos de apresentação e arguição, cada avaliador emitiu um parecer sobre o desempenho do candidato, sendo o mesmo aprovado pela Comissão Examinadora. Cumpridas as formalidades de pauta, às 16h 40' min a presidência da mesa encerrou a sessão e para constar, eu, Flavio Marques Lopes lavrei a presente Ata que, depois de lida e aprovada, segue assinada pelos membros da banca examinadora e pelo discente.

Parecer da Comissão Examinadora

Membro	Aprovado/ Reprovado
Flavio Marques Lopes	
Virginia Farias Alves	<u>Aprovado</u>
Mariângela Fontes Santiago	<u>Aprovado</u>
Ieda Maria Sapateiro Torres	
Jerônimo Raimundo de Oliveira Neto	

Goânia, 05 de março de 2018

Virginia Farias Alves

Profª. Drª. Virginia Farias Alves
Membro Titular

Flavio Marques Lopes

Profª. Drª. Flavio Marques Lopes
Presidente

Mariângela Fontes Santiago

Profª. Drª. Mariângela F. Santiago
Membro Titular

Rafael Souza Antunes

Rafael Souza Antunes
Discente



Dedico este trabalho...

Aos meus pais, minha esposa e filhos, pela força e companheirismo.

AGRADECIMENTOS

À Deus, por escutar as minhas orações e acalmar a minha alma nos momentos de angústias e dificuldades, por ter dispensado fé, coragem e força, fazendo acreditar que essa longa e difícil caminhada fosse possível e que sempre estaria ao meu lado permitindo sucesso em minhas escolhas.

Aos meus pais, Carlos Alberto e Maria de Fátima, por todo amor, apoio moral e confiança. Agradeço por terem me ensinado que é possível ter sucesso na vida apenas com trabalho árduo e honesto. Também sou grato por todo o sacrifício e esforço em prol da minha formação acadêmica. Meus heróis, amo vocês. Aos meus irmãos Adna Carla e Tiago pelo apoio.

À minha esposa e companheira Tatiane, pelo carinho e amor, apoio incondicional nos momentos mais difíceis, sempre acreditando no meu potencial, por apoiar minhas escolhas e compreender minha ausência em alguns momentos durante essa jornada. Aos meus filhos Igor Filipe e Bianca por quem luto todos os dias e que me transmitiram força e paz para continuar em frente.

Ao meu orientador Flávio Marques Lopes, e ao meu co-orientador Eric de Souza Gil, exemplos de genialidade, por terem sido verdadeiros mestres, por todos os ensinamentos passados ao longo desses anos e pela oportunidade de realização deste trabalho.

Aos amigos de curso e laboratórios (LAFAm e LENziBio). Em especial à Luane Garcia, pelo apoio, ajuda nas análises eletroquímicas e contribuição no meu crescimento científico. À Andressa e Denes pelo companheirismo e apoio nas pesquisas enzimáticas.

À minha grande amiga Mariangela Sousa, que fez acreditar que este sonho seria possível, pela força, conselhos e apoio.

Ao programa de pós-graduação em Assistência e Avaliação em Saúde, professores e servidores da Universidade Federal de Goiás.

À Universidade Federal de Goiás.

À todos que contribuíram diretamente ou indiretamente para realização desse trabalho.

Obrigado!

RESUMO

O uso de enzimas vegetais para fins analíticos vem aumentando a cada dia, principalmente no ramo da biotecnologia ligada ao desenvolvimento de novos instrumentos de análises cada vez mais específicos. Desta forma, o desenvolvimento de biossensores vem crescendo, já que estes permitem que a medida do analito de interesse seja realizada pela transdução seletiva de um parâmetro da reação analito-alvo passível de ser monitorado. Por este motivo, o elemento biológico que compõe o instrumento, torna-se um componente essencial para a sua construção. As polifenoloxidasas são um grupo de enzimas que catalisam a conversão de um composto fenólico a uma quinona, que pode ser reduzida eletroquimicamente e permite assim a detecção (quantificação) do analito de interesse. Esta enzima é amplamente distribuída nos vegetais e bastante utilizada na produção de biossensores e na avaliação seletiva de fármacos fenólicos em formulações farmacêuticas e de fenóis totais em efluentes industriais. As polifenoloxidasas, utilizadas, foram extraídas do fruto da Jurubeba (*Solanum paniculatum L.*) e utilizadas no desenvolvimento de biossensores eletroquímicos de pasta de carbono na determinação de fármacos fenólicos, tais como o paracetamol, o ácido ascórbico, o ácido salicílico e o metildopa. Sob condições experimentais foram investigados o efeito da quantidade de extrato enzimático na pasta de carbono que variou de 50 a 200 μL e o pH ótimo de 3,0 a 9,0, utilizando a técnica de voltametria de pulso diferencial. Após otimizado, foi testado a precisão intermediária do biossensor através de sua reprodutibilidade por meio dos teste de repetibilidade, tempo de condicionamento, estabilidade e linearidade. Em seguida, empregado na determinação dos fármacos, obtendo uma melhor resposta na detecção do paracetamol, dessa forma, foi realizado a curva de calibração e conseqüentemente aplicado na determinação do paracetamol de amostras comerciais em comprimidos. O biossensor apresentou uma linearidade na faixa de 5 a 245 μM , com um limite de detecção de 3 μM . Frente aos resultados alcançados foi evidenciado que a polifenoloxidase extraída do fruto da jurubeba apresentou características peculiares que proporcionaram no desenvolvimento tecnológico dos biossensores com aplicação no controle de qualidade dos fármacos fenólicos, exibindo alta sensibilidade, seletividade satisfatória, boa repetibilidade e estabilidade adequada.

Palavras-Chave: *Solanum paniculatum L.* Polifenoloxidasas. Biossensor enzimático. Fármacos fenólicos

ABSTRACT

The use of plant enzymes for analytical purposes is increasing every day, especially in the field of biotechnology linked to the development of new and more specific analytical instruments. In this way, the development of biosensors has been increasing since these allow the measurement of the analyte of interest to be performed by the selective transduction of a parameter of the target-analyte reaction that can be monitored. For this reason, the biological element that makes up the instrument, becomes an essential component for its construction. Polyphenoloxidase is an enzyme that catalyzes the conversion of a phenolic compound to a quinone, which can be reduced electrochemically and thus allows the detection (quantification) of the analyte of interest. This enzyme is widely distributed in plants and is widely used in the production of biosensors and the selective evaluation of phenolic drugs in pharmaceutical formulations and total phenols in industrial effluents. The polyphenoloxidases in this specific work were extracted from the fruit of Jurubeba (*Solanum paniculatum* L.) and used in the development of carbon paste electrochemical biosensors in the determination of phenolic drugs, such as paracetamol, ascorbic acid, salicylic acid and or methyldopa. Under experimental conditions the effect of the amount of enzymatic extract in the carbon paste ranging from 50 to 200 μL and the optimum pH of 3.0 to 9.0 using the differential pulse voltammetry technique was investigated. After optimization, the intermediate precision of the biosensor was tested through its reproducibility through the tests of repeatability, time of conditioning, stability and linearity. Soon after, used in the determination of the drugs, obtaining a better response in the detection of paracetamol, in this way, the calibration curve was realized and consequently applied in the determination of paracetamol of commercial samples in tablets. The biosensor had a linearity in the range of 5 to 245 μM , with a detection limit of 3 μM . The polyphenoloxidase extracted from the fruit of Jurubeba showed peculiar characteristics that it provided in the technological development of biosensors with application in the quality control of phenolic drugs, exhibiting high sensitivity, satisfactory selectivity, good repeatability and adequate stability.

Keywords: *Solanum paniculatum* L. Polyphenoloxidases. Enzymatic biosensor. Phenolic drugs.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Biomass brasileiros, em destaque Cerrado.	16
Figura 2	Frutos da <i>Solanum paniculatum</i> L.	18
Figura 3	Processo de oxidação do catecol por um biossensor de polifenoloxidase (PPO).	21
Figura 4	Esquema ilustrativo dos dois métodos de imobilização enzimática: (A) adsorção e (B) ligação covalente.	23
Figura 5	Fórmulas estruturais do (A) ácido ascórbico, (B) ácido salicílico e (C) metildopa	32
Figura 6	Fórmula estrutural do paracetamol.	33
Figura 7	DPV obtido a partir da PC e PC-Jur100, sendo PC (—), PC-Jur100 (— · — · —) e o branco da reação (· · ·) em tampão fosfato 0,1 M (pH 7,0) na análise de catecol 0,07 mM.	44
Figura 8	DPV para diferentes quantidades de extrato enzimático e unidades de enzimas (UE): 50 µL (262 U/mg de proteína), 100 µL (616 U/mg de proteína) e 200 µL (1183 U/mg de proteína) em tampão fosfato 0,1 M (pH 7,0) e análise de catecol 0,07 mM.	45
Figura 9	DPVs obtidos para PC-Jur100 em diferentes pHs em tampão fosfato 0,1 M (pH 7,0) na análise de catecol 0,07 mM.	46
Figura 10	Resposta relativa do PC-Jur100 na análise de diferentes fármacos fenólicos a 100 µM.	46
Figura 11	Curva de calibração obtida pelo biossensor PC-Jur100 na análise de diferentes concentrações de paracetamol em tampão fosfato 0,1 M (pH 7,0).	47
Figura 12	DPVs da repetibilidade (três medidas) do biossensor PC-Jur100 na análise de paracetamol 100 µM em tampão fosfato 0,1 M (pH 7,0).	49
Figura 13	DPVs mostrando o efeito do tempo de condicionamento para o PC-Jur100 na análise de paracetamol 100 µM em tampão fosfato 0,1 M (pH 7,0).	50
Figura 14	Detecções relacionadas com a estabilidade de armazenamento do biossensor.	51
Figura 15	Detecções relacionadas com a estabilidade de reutilização do biossensor.	51

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Resumo de alguns frutos do Cerrado e uso tradicional e científico.	17
Tabela 2	Classificação das enzimas.	19
Tabela 3	Biossensores enzimáticos baseados na extração de enzimas vegetais.	20
Tabela 4	Vantagens e desvantagens das técnicas de imobilização enzimática.	23
Tabela 5	Composição dos biossensores.	39
Tabela 6	Identificação das amostras comerciais analisadas pelo biossensor	41
Tabela 7	Dados de biossensores de PPO extraídos de fontes vegetais em comparação aos resultados deste trabalho.	48
Tabela 8	Precisão das medidas obtidas na detecção do Paracetamol (100 μ M).	50
Tabela 9	Comparação dos resultados obtidos nas determinações de paracetamol.	52
Tabela 10	Teste de recuperação de padrão de paracetamol em medicamentos.	53

SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS

A	Ampere
AAS	Ácido acetil-salicílico
BSA	Albumina de soro bovino
DPV	Voltametria de pulso diferencial
E	Potencial
E.Ejur	Extrato enzimático da jurubeba
FB	Farmacopéia Brasileira
Glu	Glutaraldeído
I	Corrente elétrica
ICEjur	Sorvete de jurubeba
IUBMB	União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular
Jur	Jurubeba
MS	Ministério da Saúde
PC	Pasta de carbono
PC-Jur	Biossensor de jurubeba
PPO	Polifenoloxidase
R	Resistência
LD	Limite de detecção
EU	Unidade de enzima
EUmg⁻¹	Unidade de enzima por miligrama de proteína
UV	Espectrofotômetro visível
V	Volts
VC	Voltametria cíclica

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
2.1. Frutos de Cerrado	16
2.1.1. Jurubeba (<i>Solanum paniculatum</i> L.)	18
2.2. Enzimas	19
2.2.1. Polifenoloxidasas (PPO)	20
2.3. Principais técnicas de imobilização enzimática	22
2.3.1. Adsorção física	24
2.3.2. Ligação covalente	24
2.4. Biossensores	24
2.4.1. Funcionamento de um biossensor	25
2.4.2. Classificação dos biossensores	25
2.4.2.1. Biossensores amperométricos	27
2.4.2.2. Biossensores potenciométricos	28
2.4.2.3. Biossensores condutimétricos	28
2.4.3. Principais eletrodos e suportes utilizados no desenvolvimento de biossensores	29
2.4.3.1. Eletrodo de Pasta de Carbono	29
2.4.4. Aplicação dos biossensores	30
2.5. Fármacos Fenólicos	31
2.5.1. Paracetamol (acetaminofeno ou N-acetil-p-aminofenol)	32
2.6. Métodos Oficiais para quantificação do paracetamol	33
2.6.1. Determinação dos parâmetros analíticos para validação	34
3. OBJETIVOS	36
3.1. Objetivo geral	36
3.2. Objetivos específicos	36
4. MATERIAIS E MÉTODOS	37
4.1. Reagentes e soluções	37
4.1.1. Preparo das soluções estoque	37
4.1.2. Preparo das soluções padrões	38
4.2. Material vegetal	38

4.2.1. Preparo do extrato vegetal	38
4.3. Determinação da atividade enzimática da Polifenoloxidase (PPO)	38
4.4. Construção dos biossensores	39
4.5. Otimização do biossensor	39
4.5.1. pH ótimo	39
4.5.2. Quantidade ideal de extrato enzimático	40
4.5.3. Repetibilidade	40
4.5.4. Tempo de condicionamento	40
4.5.5. Estabilidade de armazenamento e reuso	40
4.5.6. Linearidade: limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ)	40
4.5.7. Precisão intermediária	41
4.5.8. Exatidão	41
4.6. Amostras utilizadas na aplicabilidade do biossensor	41
4.6.1. Preparo das amostras	42
4.7. Análises eletroquímicas	42
4.8. Análise estatística e construção dos gráficos	43
5. RESUSTADOS E DISCUSSÃO	44
5.1. Avaliação da atividade específica da PPO e proteínas totais	44
5.2. Otimização dos biossensores	44
5.3. Emprego do biossensor na determinação de fármacos fenólicos	46
5.4. Reprodutividade do biossensor	49
5.4.1. Teste de repetibilidade	49
5.4.1. Tempo de condicionamento	49
5.4.1. Teste de estabilidade e reuso	50
5.5. Análise das amostras reais pelo biossensor e método oficial	52
5.6. Teste de recuperação	53
6. CONCLUSÃO	55
7. REFERÊNCIAS	56

1 INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas, estudos envolvendo tecidos de diversos vegetais na construção de dispositivos para determinação de analitos de interesse farmacêutico, alimentício, ambiental e de análises clínicas, vêm crescendo gradativamente com o auxílio de métodos biotecnológicos, que permitem um maior conhecimento e interação das moléculas, permitindo gerar produtos de interesse econômico e social, uma vez que oferecem métodos simples, estáveis, seletivos e de baixo custo (FATIBELLO-FILHO *et al.*, 2001; VIEIRA *et al.*, 2003; FERREIRA, 2007; SANTIAGO, 2011; AMARE, ADMASSIE, 2012; FONSECA, BOBROWSKI, 2015; GARCIA *et al.*, 2016; SANTOS, 2017). Destes produtos, uns dos mais desenvolvidos são os sensores (bio)químicos, denominados biossensores, caracterizados como dispositivos analíticos que incorporam um material biologicamente ativo a um transdutor, que, por sua vez, converte a resposta da interação com o analito de interesse em um sinal passível de ser quantificado (OLIVEIRA *et al.*, 2013; MELO, 2016).

As enzimas são exemplos clássicos de biomateriais utilizados na construção de biossensores, sendo considerados catalisadores biológicos, por exercerem a função de acelerar ou mesmo possibilitar reações entre componentes químicos (CONTI, GUIMARÃES e PUPO, 2012). Estão presentes em todos os sistemas biológicos, são produzidas por todos os organismos vivos e responsáveis por vários processos metabólicos (ALBARELLO *et al.*, 2013).

A utilização de vegetais e frutos de biomas locais, por exemplo o Cerrado, como fonte de matéria prima para obtenção de enzimas, além de trazer vantagens como fácil acesso e rapidez no ganho do biomaterial, faz com que os custos caiam a patamares mínimos, eliminando inclusive a necessidade de gastos com o processo de importação que, além de caro, é geralmente lento. São exemplos de frutos do Cerrado utilizados no conseguimento de enzimas o Jatobá (*Hymenaea stigonocarpa* Mart.) (SANTIAGO, 2011), a Lobeira (*Solanum lycocarpum* St. Hil.) (MORAIS *et al.*, 2013), a Mangaba (*Hancornia speciosa*) (SILVA *et al.*, 2012), o Araticum (*Annona crassiflora* Mart.), o Jenipapo (*Genipa Americana* L.), o Cajuzinho (*Anacardium humile*) (BARBOSA *et al.*, 2016), a Jurubeba (*Solanum paniculatum* L.) (PEREIRA, PINTO, PEREIRA, 2013).

A Jurubeba (*Solanum paniculatum* L.), é uma solanácea de porte arbustivo, que frutifica praticamente o ano todo. Trata-se de uma planta nativa do Centro-Oeste brasileiro e ocorre principalmente no Cerrado (BRASIL, 2015). No fruto, são encontrados compostos ativos,

principalmente enzimas, e dentre elas as polifenoloxidasas e peroxidases são as mais abundantes (PEREIRA, PINTO, PEREIRA, 2013). São achados também componentes metabólicos secundários como agente antioxidantes, esteróides, saponinas, alcalóides e glicosídeos (CAMPOS *et al.*, 2015). Todos estes compostos tem sido bastante estudados nos dias atuais, sendo alvo de diversas aplicações biotecnológicas nas indústrias alimentícias, de cosméticos e farmacêuticas (FONSECA, BOBROWSKI, 2015).

Há diversas formas de utilizar o tecido vegetal na confecção dos biossensores, sendo a imobilização de extratos brutos enzimáticos (enzimas) em suportes insolúveis, tais como: a pasta de carbono (pó de grafite) (AMARE, ADMASSIE, 2012), géis, fibras (MENDES *et al.*, 2014), sílicas (HARTWIG *et al.*, 2015) e nanopartículas, as formas mais citada na literatura (BUENO, PEREIRA, 2015). A ligação da enzima ao suporte se dá de diversas maneiras, sendo a adsorção e a ligação covalente, os mais utilizados, em que, os grupos superficiais do suporte interagem com grupos de superfície da enzima, por meio de atrações eletrostáticas, ligações de hidrogênio ou por ligação covalente, respectivamente (DIAS, 2014).

Dessa forma, o uso de extrato bruto de vegetais, como fonte enzimática para construção de biossensores tem se tornado frequente, devido à simplicidade e facilidade de obtenção da enzima, ao baixo custo do processo, à estabilidade e ao tempo de vida superior àqueles métodos que utilizam enzimas purificadas. Logo, frutos disponíveis por todo o país, são matérias primas para a construção de biossensores, podendo ser aplicadas em análises de grande interesse nas áreas alimentícia, ambiental, biológica, e principalmente na indústria farmacêutica (ARRIBAS, FERNANDEZ e CHICHARRO, 2012; MENDES *et al.*, 2014; GARCIA *et al.*, 2016).

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. FRUTOS DO CERRADO

O Brasil é um país que possui uma grande diversidade da fauna e flora, sendo representado por seis grandes biomas, a Floresta Amazônica, a Mata Atlântica, a Caatinga, o Pantanal, os Pampas e o Cerrado (**Figura 1**) (RADA, 2013). Estes biomas apresentam espécies nativas com características organolépticas peculiares e valores nutricionais significativos, e são utilizadas na prevenção e tratamento de doenças, fazendo parte da medicina alternativa regional, que gradativamente desperta interesse de pesquisadores na investigação desses compostos (VIDELA *et al.*, 2013). Vale salientar, que muitos estudos ainda precisam ser realizados, a fim de valorizar os biomas nacionais e instigar o consumo de produtos regionais (FERREIRA *et al.*, 2013).



Figura 1. Biomas brasileiros, em destaque o Cerrado.

Fonte: (SANTOS *et al.*, 2014).

O Cerrado brasileiro, dentre os diversos biomas nacionais destaca-se pelo conjunto de ecossistemas que possui (savanas, matas, campos e matas de galeria). É o segundo maior bioma do

país e ocupa aproximadamente 21% do território nacional. O número de plantas herbáceas, arbustivas, arbóreas e cipós somam mais de 11.000 espécies, assim, o Cerrado tem sido considerado a mais diversificada savana tropical do mundo (ANDRADE *et al.*, 2017).

Dessa forma, preconiza que os frutos do Cerrado apresentam grandes quantidades e diversidade de compostos bioativos, e que estes também podem ser benéficos para a saúde do indivíduo, uma vez que, auxiliam na atividade antioxidante (CONCEIÇÃO *et al.*, 2011), sendo utilizados na medicina popular como anti-inflamatórios (SILVA *et al.*, 2012), antibióticos (BARBOSA *et al.*, 2016), hipocolesterolêmico (MORAIS *et al.*, 2013), promovendo respostas fisiológicas capazes de modular o processo metabólico de inflamação (SOUZA, AQUINO, 2013), estresse oxidativos (MOURA, 2014), atividades anti-hipertensiva (SILVA-FILHO *et al.*, 2012), antimicrobiana (SANTOS, 2016) e antimutagênica (SOARES, SOUZA, 2017), e, conseqüentemente, reduzir o risco de doenças crônicas (PEREIRA, PINTO, PEREIRA, 2013). Representando uma potencial fonte de biomateriais com propriedades funcionais a ser explorados pelos diversos segmentos da ciência (LIU e XU, 2011).

A **Tabela 1**, apresenta exemplos de alguns frutos do Cerrado e suas aplicações na medicina popular regional e em processos biotecnológicos.

Tabela 1. Resumo de alguns frutos do Cerrado e o uso tradicional e científico.

Frutos	Aplicação tradicional	Referências
Araticum (<i>Annona crassiflora</i> Mart.)	Atividade antioxidante e anti-parasitários. Caracterização morfológica e variabilidade genética.	PIMENTA <i>et al.</i> , 2014; SOUSA <i>et al.</i> , 2015.
Baru (<i>Dipteryx alata</i> Vog.)	Atividade antioxidante e anti-reumático. Melhoramento genético e produção de alimentos.	SIQUEIRA <i>et al.</i> , 2012; SOARES, SOUZA, 2017.
Cajuzinho do Cerrado (<i>Anacardium humile</i>)	Combate infecções de garganta e tem efeito purgativo. Obtenção de etanol a partir de processos fermentativos.	BARBOSA <i>et al.</i> , 2016; SANTOS, 2016.
Jatobá do Cerrado (<i>Hymenaea stigonocarpa</i> Mart.)	Reconstituintes, tônicos para o organismos e tratamento de úlceras estomacais. Desenvolvimento de biossensores.	ORSI <i>et al.</i> , 2012; SANTIAGO, 2011.
Jenipapo (<i>Genipa Americana</i> L.)	Atividade antioxidante e anti-bactericida. Melhoramento genético e produção de vinhos.	CONCEIÇÃO <i>et al.</i> , 2011; MOURA, 2014.
Lobeira (<i>Solanum lycocarpum</i> St. Hil.)	Tratamento de diabetes, dislipidemias, sedativo e diurético. Extração enzimática.	MORAIS <i>et al.</i> , 2013; SILVA-

		FILHO <i>et al.</i> , 2012.
Mangaba (<i>Hancornia speciosa</i>)	Atividade antioxidante, anti-hipertensiva e anti-inflamatória. Extração enzimática e produção de alimentos.	SILVA <i>et al.</i> , 2012; SOUZA, AQUINO, 2013.
Jurubeba (<i>Solanum paniculatum</i> L.)	Atividade antioxidante e tratamento de disfunções gastro-hepáticas. Potencial fitorremediador (remediação proveniente do processo de fotossíntese).	VIEIRA, SANTOS e CHEN-CHEN, 2010; PEREIRA, PINTO, PEREIRA, 2013.

2.1.1. Jurubeba (*Solanum paniculatum* L.)

Solanum paniculatum L. conhecida, popularmente, como jurubeba, jurubeba-verdadeira ou jurubebinha é um vegetal natural do Centro-Oeste brasileiro e ocorre especialmente no Cerrado. Pode ser encontrado também em outras regiões do Brasil e em grande parte da América do Sul Tropical (BRASIL, 2015). O vegetal é rústico, sendo resistente à seca, não possui exigência quanto à fertilidade adaptando-se a diferentes tipos de solo e condições climáticas. Da planta de jurubeba aproveita-se raiz, caule, folhas, flores e frutos, sendo esta amplamente utilizada para fins medicinais, biotecnológicos e na culinária (SANTOS, 2013). Seus frutos são pequenos, agrupados em cacho de cor verde (**Figura 2**) e quando maduros amarelados (CAMPOS *et al.*, 2015).



Figura 2. Frutos da *Solanum paniculatum* L.

Fonte: Autor.

Na biotecnologia, estudos revelaram a presença de diversos alcalóides esteroidais isolados da *Solanum paniculatum L.*, como a jurubebina, jubebina e solanina, bem como algumas saponinas, entre elas a isojuripidina, isojurubidina, isopaniculidina e jurubidina (MESIA-VELA *et al.*, 2002; SILVA *et al.*, 2007; RIBEIRO *et al.*, 2007). Apresentaram também uma das maiores capacidades antioxidantes entre 10 espécies vegetais, testadas pelo método do sequestro do radical livre estável 2,2-difenil1-picril-hidrazil (DPPH) (AL-FATIME *et al.*, 2007). Outra característica interessante desta planta que envolve estudos biotecnológicos é a capacidade de realização de fitorremediação, técnica que emprega as espécies vegetais e obtém a energia necessária para realizar a remediação proveniente do seu próprio metabolismo quando realiza a fotossíntese (PEREIRA, PINTO e PEREIRA 2013). Desta forma, devido os compostos ativos, metabólicos e antioxidantes da *Solanum paniculatum L.*, despertou-se o interesse em desenvolver biossensores utilizando extrato bruto de seus frutos.

2.2. ENZIMAS

As enzimas são proteínas especializadas em catalisar reações biológicas, ou seja, aumentam a velocidade de uma reação química sem interferir no processo, devido às suas especificidade e poder catalítico (TALENS-PERALES, MARÍN-NAVARRO E POLAINA, 2016).

Enzimas são catalizadores eficientes, e desde a sua descoberta vêm sendo aplicadas na medicina, química e agricultura, além de ser bastante empregadas em áreas como a biocatálise industrial, na síntese de aminoácidos, peptídeos, nucleotídeos e antibióticos, na tecnologia farmacêutica e de alimentos, estética e em aplicações em diagnósticos clínicos, devido sua especificidade analítica (TIBOLLA, PELISSARI e MENEGALLI, 2014).

As enzimas são classificadas segundo as reações que catalisam, de acordo como a União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular (IUBMB). A **Tabela 2** apresenta as diferentes classificações.

Tabela 2. Classificação das enzimas.

	Classe	Reação Catalisada
1	Oxidoredutases	Reações de oxidação-redução ou transferência de elétrons.
2	Transferases	Transferem grupos funcionais como amina, fosfato, acil, carboxil, entre outros.
3	Hidrolases	Catalisam a quebra das ligações C=O, C-N, C-S e O-P, através da adição de água.
4	Liasas	Catalisam a quebra de ligações covalentes e a remoção de moléculas de água, amônia e gás carbônico.

5	Isomerases	Reações de interconversão entre isômeros ópticos e geométricos.
6	Ligases	Catalisam reações de formação de novas moléculas a partir da ligação entre duas moléculas pré-existentes.

Entre as classes enzimáticas, as Oxidorredutases se sobressaem no cenário de desenvolvimento de biossensores que utilizam tecido vegetal como fonte enzimática e dentre elas destacam-se as Peroxidases e as Polifenoloxidasas (**Tabela 3**), isto, pelo fato de intermediarem reação redox por meio de mudanças reversíveis no estado de oxidação do íon metálico, estabilizando-o eletrostaticamente ou protegendo-o, por meio de neutralização de cargas negativas (SANTIAGO, 2011).

Tabela 3. Biossensores enzimáticos baseados na extração de enzimas vegetais.

Enzima	Fonte vegetal	Analito de Interesse	Referências
Polifenoloxidase	<i>Solanum melongena</i>	Determinação de Paracetamol	GARCIA <i>et al.</i> , 2016.
Polifenoloxidase	<i>Hymenaea stigocarpa</i>	Determinação de compostos fenólicos	SANTIAGO, 2011.
Peroxidase	<i>Phaseolus vulgaris L.</i>	Determinação de agrotóxicos	MIHOS <i>et al.</i> , 2015.
Peroxidase	<i>Raphanus sativus</i>	Determinação de metildopa	BUENO, PEREIRA, 2015.
Peroxidase	<i>Euterpe oleracea</i>	Detecção de hexazinona	TORO, 2014.
Peroxidase	<i>Brassica rapa subsp. Rapa</i>	Determinação de triglicerídeos em biodiesel	MENDES <i>et al.</i> , 2014.

2.2.1. Polifenoloxidasas (PPO)

As polifenoloxidasas (PPOs) são enzimas bifuncionais que fazem parte de um grande número de enzimas conhecidas como oxidorredutases, que oxidam fenóis a o-quinonas na presença de oxigênio molecular. Estão amplamente distribuídas na natureza, principalmente no reino vegetal

e fungi, sendo bastante utilizadas na confecção de biossensores para detecção de compostos fenólicos (SOARES *et al.*, 2017).

As PPOs possuem cobre no sítio ativo (metaloenzimas) e atuam como oxidase de função mista. Catalisam duas reações distintas envolvendo compostos fenólicos e oxigênio molecular: a o-hidroxilação de monofenóis para o-difenóis (cresolase) e a posterior oxidação de o-difenóis para o-quinonas (catecolase) (DANTAS *et al.*, 2016).

As o-quinonas produzidas pela oxidação dos compostos fenólicos são moléculas altamente reativas (eletroativas) e são capazes de serem reproduzidas na superfície do eletrodo em potenciais próximos a 0 V utilizando um Eletrodo de Pasta de Carbono (**Figura 3**). Na natureza, as Polifenoloxidasas reagem com os componentes celulares e formam pigmentos, responsáveis pelo escurecimento indesejável observado na pós-colheita de produtos vegetais e alimentos processados (SANTIAGO, 2011).

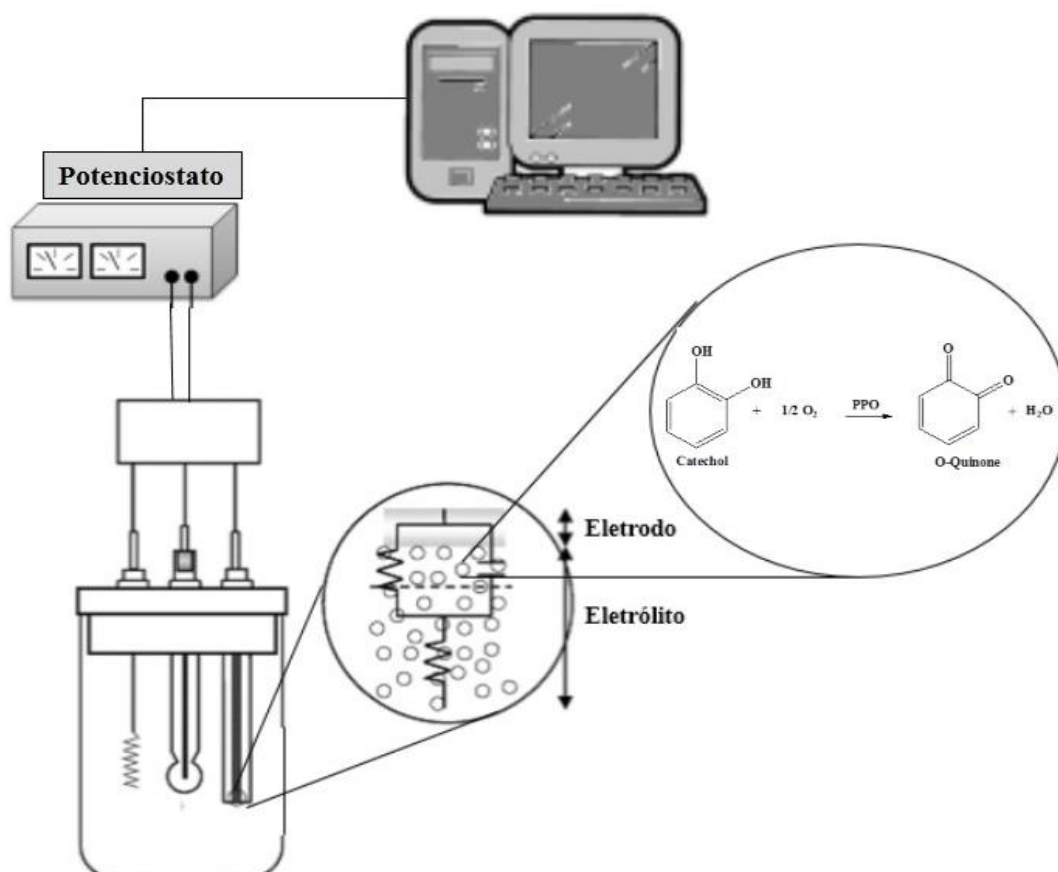


Figura 3. Processo de oxidação do catecol por um Biossensor de polifenoloxidase.

Fonte: Autor.

A PPO tornou-se alvo de diversos estudos devido o seu potencial para diferentes aplicações, como no aumento da resistência contra patógenos (SOARES *et al.*, 2017), no tratamento de efluentes ou como fator auxiliar na biorremediação (SANTIAGO, 2011), e desenvolvimento de biossensores (EULÁLIO *et al.*, 2016) na detecção de compostos fenólicos em diversos produtos como formulações farmacêuticas (GARCIA *et al.*, 2016) e efluentes industriais (PERONE *et al.*, 2007).

2.3. PRINCIPAIS TÉCNICAS DE IMOBILIZAÇÃO ENZIMÁTICA

A imobilização enzimática é definida como um conjunto de métodos que permitem a melhoria do aumento da estabilidade e da possibilidade de reutilização da enzima de interesse durante o processo (BORDINHÃO *et al.*, 2015). Todo processo de produção requer uma condição operacional específica desde o início e varia para cada produto. Assim, é fundamental selecionar a técnica de imobilização adequada para o rendimento do processo. Técnicas de imobilização melhoram as propriedades do biocatalisador por aumentar a estabilidade e a rigidez da estrutura, causando a modificação química, gerando microambientes hidrofílicos, que podem proteger o biocatalisador, e conseqüentemente reduzir as inibições causadas por inibidores (GUZIK *et al.*, 2014). Esta técnica vem evoluindo com o passar dos anos, pois se busca a obtenção de um biocatalisador com atividade e estabilidade que não sejam afetadas durante o processo, usando um suporte que possa agir para aumento e eficiência da enzima imobilizada. As enzimas quando imobilizadas possuem uma maior estabilidade em faixas mais amplas de pH e temperatura além de poderem ser reutilizadas (DANTAS, 2017).

Existem muitas técnicas de imobilização de enzimas, tais como: encapsulação (BARBOSA *et al.*, 2014) e confinamento em membranas poliméricas (SOUZA, 2014), adsorção em materiais insolúveis hidrofóbicos (GARCIA *et al.*, 2016) ou em resinas de troca iônica (DANTAS, 2017), ligação covalente em matriz insolúvel (WEBER, 2016) ou por reticulação (DO PRADO *et al.*, 2015). Entre elas podem-se destacar a adsorção e a ligação covalente (CAZES *et al.*, 2014).

Nos processos mais simples como a adsorção, ocorrem poucas perturbações sobre o suporte e a estrutura da enzima, havendo apenas interações físicas da enzima com a matriz inerte. Nos processos que envolvem reações químicas como as ligações covalentes, as alterações são mais drásticas, podendo levar a uma perda da atividade enzimática quando a ligação da enzima na matriz ocorre por meio do sítio ativo, mas geralmente conferem ao biossensor melhor estabilidade operacional (FERNÁNDEZ-FERNÁNDEZ, SANROMÁN e MOLDES, 2013).

A **Figura 4** ilustra as duas principais técnicas de imobilização enzimática mais utilizadas no desenvolvimento de biossensores, e a **Tabela 4**, aponta as principais vantagens e desvantagens dessas técnicas.

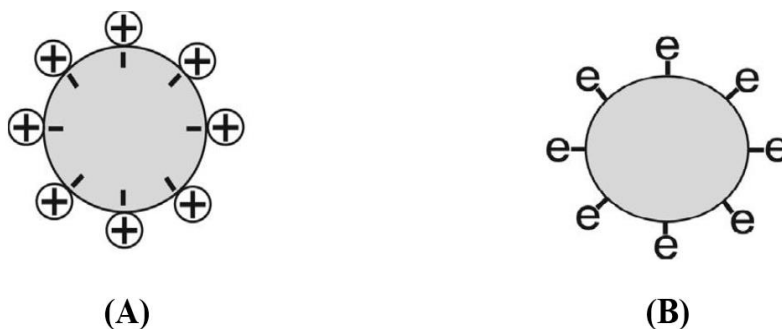


Figura 4. Esquema ilustrativo dos dois métodos de imobilização enzimática: (A) adsorção e (B) ligação covalente.

Fonte: (ISMAIL, 2015).

Tabela 4. Vantagens e desvantagens das técnicas de imobilização

Técnica de imobilização	Vantagens	Desvantagens	Referências
Adsorção	Simple e barato. Alta atividade catalítica. Não é necessário usar reagente. Permite reuso de material de suporte caro. Não tem mudanças conformacionais em biocatalizador.	Estabilidade baixa. Perda possível de biomolécula. Ligações fracas pode causar separação do biocatalisador.	NETA <i>et al.</i> , 2016.
Ligação covalente	Ligação forte. Alta estabilidade térmica. Facilita interação entre biocatalizador e substrato. Impede a eluição de biocatalisador. A flexibilidade no design do material de suporte e técnica	Mobilidade limitada do biocatalizador diminui sua atividade. Materiais de suporte não são renováveis	CONCEIÇÃO <i>et al.</i> , 2014.

2.3.1. Adsorção física

A grande vantagem deste método consiste na sua simplicidade e nas condições brandas de como é realizado, preservando a atividade enzimática. A imobilização ocorre principalmente por meio de interações fracas entre o suporte e a enzima, sendo estas interações as Van der Waals, interações hidrofóbicas ou adsorção física, que embora fracas ocorrem em número suficiente para que a imobilização seja possível (NETA *et al.*, 2016).

Como desvantagem apresenta com o decorrer do tempo uma dessorção progressiva das moléculas da enzima, além de serem altamente afetadas pelo pH, força iônica do meio, temperatura ou mesmo pelo substrato (ABREU *et al.*, 2016).

2.3.2. Ligação covalente

Este tipo de imobilização é baseado na formação de uma ligação covalente entre a biomolécula e o material de suporte. A ligação covalente envolve a ligação de grupos funcionais, que não sejam essenciais para a atividade catalítica, da enzima no suporte por meio da ativação prévia de grupos reativos da matriz. Assim os suportes devem possuir grupos funcionais que possam ser ativados, boa estabilidade mecânica e elevada área superficial (CONCEIÇÃO *et al.*, 2014).

As reações para promoção da ligação da enzima na matriz, geralmente, são realizadas em meio aquoso, em temperaturas baixas e com pH próximo a neutralidade. Pode-se ainda utilizar um agente ativador para os grupos funcionais da matriz (BORDINHÃO *et al.*, 2015). O emprego do método da ligação covalente pode levar a uma melhor estabilidade operacional, uma vez que a enzima é ligada irreversivelmente à matriz (MELO *et al.*, 2014).

2.4. BIOSSENSORES

O primeiro biossensor foi desenvolvido por Clark e Lyons (1962) e desde então vários outros foram construídos fazendo uso de diversas enzimas. Na ocasião, o biossensor possuía princípio amperométrico baseado em enzimas, que ficou conhecido como “eletrodo enzimático”, destinado à detecção de glicose. Neste caso, um biossensor foi desenvolvido baseado na oxidação de glicose a ácido glicônico, envolvendo consumo de oxigênio e formação de peróxido de hidrogênio por ação da enzima glicose oxidase, de forma que o oxigênio ou peróxido consumido poderiam ser detectados (CLARK, LYONS, 1962).

Os biossensores representam uma alternativa promissora devido sua facilidade de automação, possibilidade de construção de equipamentos simples e portáteis para um monitoramento rápido. São caracterizados como dispositivos analíticos que permitem a detecção de compostos específicos, aliando agentes de reconhecimento biológico altamente seletivos a transdutores físicos adequados (BUENO, PEREIRA, 2015).

O elemento chave do biossensor é a camada biorreceptora, constituída por biomoléculas, que permite avaliar a concentração de componente desejado contido na amostra. A escolha do material biológico e do transdutor adequado depende de cada amostra e do tipo de medida em que se tem interesse. O biocomponente determina o grau de seletividade e/ou especificidade do biossensor. O reconhecimento seletivo é a principal característica da tecnologia dos biossensores. Diferentes materiais e transdutores tem sido empregados na construção dos biossensores sendo os eletroquímicos os mais populares, pois apresentam resposta rápida, possuem a vantagem de serem econômicos e a possibilidade de automação, permitindo sua aplicação em um grande número de amostras (DIAS, 2014).

2.4.1. Funcionamento de um biossensor

Um biossensor é formado de duas partes: o componente biológico e o transdutor. O componente biológico faz o reconhecimento da substância de interesse por meio de uma reação química gerando um sinal que pode resultar de uma variação na concentração de prótons, liberação de gases, emissão ou absorção de luz, emissão de calor, variação de massa, mudança de estado de oxidação, dentre outros. Já o transdutor converte este sinal em uma resposta mensurável tal como: corrente, potencial, variação de temperatura (EULÁLIO *et al.*, 2016).

O funcionamento de um biossensor de uma forma geral envolve a especificidade e alta sensibilidade do componente biológico com o substrato de interesse. Em seguida como produto desta interação entre a molécula biológica e o substrato, variações de um ou mais parâmetros físico-químicos são convertidos em um sinal elétrico quantificável e processável pelo uso de um transdutor adequado (DIAS, 2014).

2.4.2. Classificação dos biossensores

A classificação dos biossensores é realizada de acordo com a especificidade biológica que confere o mecanismo de reconhecimento, ou pelo modo de transdução de sinal, ou, alternativamente, considerando-se que o reconhecimento biológico e o mecanismo de transdução

podem ser integrados em biossensores de diversas formas, por uma combinação dos dois (SANTOS, 2017).

Levando em consideração o componente biológico dos biossensores, a seletividade, habilidade para discriminar um entre diferentes substratos, é uma das características mais importantes de um biossensor, é a principal função do componente biológico, embora algumas vezes o transdutor também contribua para a seletividade (SANTIAGO, 2011). Por isso, enzimas foram e continuam sendo o elemento biológico mais usado na construção de biossensores. Assim, de acordo com a sensibilidade do biocomposto utilizado para a sua construção os biossensores podem ser divididos em várias classes, tais como enzimáticos, microbiológicos, quimiorreceptores, imunossensores (OLIVEIRA *et al.*, 2013).

Os biossensores microbiológicos são formados por microrganismos imobilizados, sensíveis e que especificamente reconhecem a espécie de interesse, interligada a um adequado sistema de transdução. O princípio de funcionamento desta classe de biossensores envolve assimilação do composto orgânico pelo microrganismo, acompanhado por uma variação na atividade respiratória ou na produção de metabólitos, que são monitorados diretamente por um transdutor (MEDEIROS, 2016). Nos quimiorreceptores utiliza-se proteínas que interagem com espécies químicas, tais como hormônios, resultando em variações conformacionais. Geralmente apresentam problemas de ligação ao transdutor, dificuldade de manipulação e um tempo de vida curto (MELO *et al.*, 2016). Já os imunossensores utilizam proteínas globulares de soro, tais como imunoglobulinas, que formam parte de um importante grupo de proteínas altamente ligáveis. Anticorpos ligam-se a substâncias particulares (antígenos) com alta especificidade e alta afinidade. A principal desvantagem no desenvolvimento deste biossensor é o elevado custo tanto na obtenção do biomaterial quanto na confecção e utilização do mesmo (MORAES *et al.*, 2016).

A maior parte dos biossensores desenvolvidos utiliza como componente biológico enzimas (biossensores enzimáticos). A vantagem do uso deste componente é que as enzimas são catalisadores biológicos altamente específicos e seletivos. Comparados com os catalisadores químicos, as enzimas apresentam um alto nível de especificidade com o substrato, devido principalmente a ligação forte na molécula de substrato pelo seu sítio ativo envolvendo fatores do meio ambiente reacional, tais como tamanho da molécula substrato, polaridade, grupos funcionais ligados e relativa energia de ligação. Já uma desvantagem é o fato de apresentar uma estabilidade relativamente baixa, principalmente no que diz respeito a variação das condições físico-químicas do meio reacional, mas que podem ser contornados usando as condições adequada de pH, temperatura e pressão que garantam a manutenção da atividade enzimática (SILVA, 2011).

Outro fator importante na classificação dos biossensores refere-se à escolha do transdutor, que é realizada mediante três requisitos básicos: que ele seja adequado para adaptação ao material biológico imobilizado, que seja altamente específico para o analito de interesse, sendo capaz de detectar alguma variação específica que ocorra durante a reação biológica e que esta variação ocorra na faixa de concentração apropriada (RIBEIRO, 2016).

Dos vários transdutores utilizados no desenvolvimento dos biossensores, destacam-se os eletroquímicos (amperométricos, potenciométricos e condutométricos). Dessa forma, como os biossensores podem ser classificados de acordo com o componente biológico, pode-se também ser classificados de acordo como sistema de transdução utilizado (LEAL, 2014).

Biossensores eletroquímicos caracterizam-se por serem simples, sensíveis, confiáveis, de resposta rápida, necessitam de instrumentação de baixo custo, operam em condições em que não é necessário um pré-tratamento da amostra e permitem efetuar determinações em uma ampla faixa de concentração (SANTOS, 2017). As técnicas eletrostáticas são capazes de fornecer limites de detecção excepcionalmente baixos e uma abundância de informações que caracterizam e descrevem eletroquimicamente determinados sistemas, sempre baseado nas propriedades elétricas de uma solução de analito quando ele está em contato com uma célula eletroquímica, que são específicas para um estado de oxidação particular e sua instrumentação é relativamente barata (SALGADO *et al.*, 2015).

Os biossensores eletroquímicos são divididos em amperométricos, potenciométricos e condutimétricos.

2.4.2.1 Biossensores amperométricos

Os biossensores amperométricos baseiam-se em reações de transferência de elétrons (oxi-redução) entre o material biocatalítico e o analito com um eletrodo de referência polarizado a uma tensão pré-determinada (SANTOS, MARQUES e NUNES, 2014).

Estes biossensores dependem de um sistema biológico que converta cataliticamente substratos inativos eletroquimicamente em produtos que possam ser oxidados ou reduzidos em um eletrodo operante, o qual é mantido em um potencial específico de acordo com um eletrodo de referência. A corrente produzida em uma reação redox é linearmente proporcional à concentração do produto eletroativo, a qual é proporcional ao analito (substrato de enzimas) não eletroativo (MIHOS *et al.*, 2015).

Os biossensores amperométricos são classificados de acordo com o processo envolvido na transferência de cargas em três grupos: biossensores amperométricos de primeira, segunda e terceira gerações (SANTOS, MARQUES e NUNES, 2014). Os biossensores amperométricos de primeira geração trabalham a altos potenciais e baseiam-se na diminuição da concentração de oxigênio, onde dois eletrodos são separados da amostra por uma membrana permeável a gás. Neste caso, o oxigênio difundido através da membrana é reduzido em um eletrodo catodicamente polarizado na presença de um eletrodo de referência (RIBEIRO-JÚNIOR, 2015).

O princípio de funcionamento de um biossensor de segunda geração se baseia no uso de um mediador para transferência de carga entre o sítio ativo da enzima e a superfície do eletrodo, a fim de se diminuir o potencial aplicado no eletrodo de trabalho. Esses mediadores eletrônicos podem ser materiais orgânicos, inorgânicos ou complexos de metais de transição e ainda polímeros condutores. Os mediadores de elétrons mais utilizados ultimamente em biossensores são cobalto-ftalocianina e derivados de ferroceno pelo fato destes compostos possuírem baixos potenciais de oxi-redução (OLIVEIRA *et al.*, 2013).

Já os biossensores de terceira geração se caracterizam pela transferência direta de elétrons entre a enzima e a superfície do eletrodo, trabalhando a baixos potenciais (RIBEIRO JÚNIOR, 2015).

2.4.2.2. Biossensores potenciométricos

Os biossensores potenciométricos geralmente utilizam um eletrodo de referência (inerte) e um eletrodo operante, preferencialmente eletrodos gases ou íons seletivos, ambos em contato com a amostra, e se baseiam no desenvolvimento de um potencial significativo no eletrodo operante por acumulação da carga e portanto, densidade de carga aumentada na superfície do eletrólito. Desta forma, enzimas consomem ou produzem espécies químicas fortemente polares ou íons, em decorrência da catálise, e estas espécies são detectadas pelo eletrodo de íons seletivos e são transformadas em um sinal possível de ser lido e determinado (MAURÍCIO *et al.*, 2015).

2.4.2.3. Biossensores condutimétricos

Os biossensores que utilizam transdutores condutimétricos têm sido desenvolvidos em baixas escalas quando comparada aos amperométricos e potenciométricos, em função da dificuldade de efetuar medidas condutimétricas com dispositivos simples, do sinal depender

fortemente da temperatura (são sensíveis a variações de temperatura na ordem de $\pm 1^\circ\text{C}$) e por não poder usar amostras sem diluição prévia (CHAVERO, 2013).

Biossensores baseados na medição de condutância estão relacionados ao uso de enzimas que produzem ou consomem espécies iônicas, nas reações por elas catalisadas, alterando a condutividade global da solução. Muitas reações enzimáticas produzem uma variação de condutividade, mas somente poucas oferecem um sinal de magnitude estável (PORFIRIO, GIAROLA e PEREIRA, 2016).

2.4.3. Principais eletrodos e suportes utilizados no desenvolvimento de biossensores

Existem inúmeros tipos de eletrodos de trabalho usados em diferentes técnicas eletroanalíticas, tais como: eletrodo de mercúrio (polarografias) (SERRANO *et al.*, 2014), eletrodos metálicos puros (platina, ouro) (ZUCOLLOTO *et al.*, 2017), eletrodos de ligas metálicas (SILVA, 2015), eletrodo combinado de vidro para medida de pH (DECARLI, 2015), eletrodo de carbono compósito (SANTOS, ALVES, 2017) e eletrodos de pasta de carbono (GARCIA *et al.*, 2016). Os eletrodos de pasta de carbono são os mais utilizados no desenvolvimento de biossensores e algumas das razões para que este tipo de sensor seja bastante utilizado são: a facilidade de obtenção da pasta de carbono, possibilidade de modificação da pasta com materiais desejáveis com propriedades químicas pré determinadas e o fato de serem altamente seletivos (BELLIDO-MILLA *et al.*, 2013; SILVÉRIO, 2015).

2.4.3.1. Eletrodo de Pasta de Carbono

Os eletrodos de pasta de carbono são largamente usados em medidas voltamétricas, podendo também ser aplicados em amperometria (DE MELO *et al.*, 2014), coulometria (DOMINGOS *et al.*, 2015) e potenciometria (MAURICIO *et al.*, 2015). Este eletrodo é desenvolvido a partir de uma mistura de pó de grafite a ligantes orgânicos, como óleos mineral e vegetal. Pode ser concebido a partir de várias formas de carbono, tais como nanotubos de carbono de paredes única ou múltiplas (TKACHC *et al.*, 2015), grafeno (KOHORI *et al.*, 2016), fulereno (MASCAGNI, 2017), e grafite (MIHOS *et al.*, 2015). A composição da pasta afeta fortemente a reatividade do eletrodo, pois o aumento de ligante provoca uma diminuição na taxa de transferência de elétrons. A pasta de carbono apresenta uma matriz adequada para incorporação de modificadores orgânicos, metálicos ou inorgânicos utilizados para uma enorme gama de aplicações, dependendo do uso do sensor. Uma das vantagens do material, por exemplo, é a possibilidade de modificações químicas transitórias ou

permanentes por meio de adsorção (GARCIA *et al.*, 2016), formação de compósitos (BITELO, 2015), recobrimento por membrana polimérica (TKACH *et al.*, 2014), formação de ligação covalente ou eletrodeposição (SILVÉRIO, 2015).

2.4.4. Aplicação dos biossensores

Os biossensores são utilizados em diversas áreas: industriais (controle de processos (BATISTA, SILVA 2016), controle de qualidade dos produtos (MENDES *et al.*, 2014), controles ambientais (SANTIAGO, 2011)), governamentais (monitoramento de emissões de automóveis (LEAL, 2014), monitoramento de efluentes (GOLINELLI, 2016) e médicas (diagnósticos clínicos (MASCAGNI, 2017)). Diante destas aplicações, os biossensores tem resultado em benefícios econômicos e sociais (BELLIDO-MILLA *et al.*, 2013).

O emprego industrial dos biossensores tende a crescer, em particular nas indústrias químicas e demais setores correlatos, o que inclui a indústria farmacêutica e de alimentos. Assim, um vasto campo de aplicação está em constante desenvolvimento e alguns eletrodos enzimáticos já se apresentaram bem estabelecidos para análises de diagnósticos (SANTOS, ALVES, 2017).

Na segurança alimentar, o uso de biossensores implica na garantia da produção e comercialização de alimentos sem colocar em risco potencial a saúde dos consumidores (OLIVEIRA, PEREIRA, 2016). Neste campo, os biossensores podem ser utilizados para detectar microrganismos patogênicos, toxinas e aditivos presentes nos alimentos, entre outros elementos (fármacos, substâncias antinutricionais) (BELLIDO-MILLA *et al.*, 2013).

Em uma indústria, a qualidade de seus produtos (medicamentos e alimentos) podem ser entendidas como o fator que diferencia os produtos de acordo com as suas características sensoriais, composição e propriedades funcionais. Em análises de controle de qualidade, os biossensores são aplicados, sobretudo, na detecção de contaminantes químicos e biológicos (DIAS, 2017). Portanto, na análise de uma formulação farmacêutica empregando biossensores, permite quantificar os componentes encontrados naturalmente nos medicamentos e verificar outros compostos que são adicionados para melhorar a ação farmacológica, como é o caso de algumas vitaminas e minerais (NEVES, 2011).

2.5. FÁRMACOS FENÓLICOS

Os compostos fenólicos fazem parte de um grande grupo de metabólitos secundários das plantas e da maioria dos produtos naturais, principalmente das frutas e vegetais, contribuindo para o seu sabor e cor (TREMOCOLDI *et al.*, 2014). São moléculas que possuem em sua estruturação grupos hidroxilos (-OH) ligados diretamente a um anel aromático e, por esse motivo, são muito reativas e frequentemente utilizadas em processos de síntese orgânica, na indústria farmacêutica e também na indústria alimentar, com a finalidade de preservar os alimentos e auxiliando na defesa contra a proliferação de microrganismos (SANTIAGO, 2011).

Compostos farmacêuticos desenvolvidos a partir destas moléculas apresentam um grande número de propriedades biológicas importantes (fármacos fenólicos), destacando-se as propriedades anti-inflamatórias, antibacterianas, antitumorais, anticonvulsivas e antioxidantes (GOULART *et al.*, 2014). Atualmente tem-se verificado um interesse neste tipo de compostos de origem natural devido às suas características farmacoterapêuticas (GUIMARÃES, SOARES e CARVALHO, 2015).

O paracetamol, o ácido ascórbico, o ácido salicílico e o metildopa (**Figura 5**) são exemplos de fármacos fenólicos e são comumente usados em formulações farmacêutica e bastante utilizados pela população mundial, por possuírem importantes ações farmacológicas e serem de fácil acesso (GOULART *et al.*, 2014).

O ácido ascórbico (C₆H₈O₆), conhecido mundialmente como vitamina C, é extensivamente usado na indústria farmacêutica e indústria de alimentos pela ação antioxidante. É adicionado em muitos alimentos como suplemento, por exemplo, em suco de frutas, e usado na medicina na forma de pílulas como componente de tabletes multivitamínicos (PROVIDELLO *et al.*, 2016). Estudos bioquímicos relacionados ao ácido ascórbico abordam aspectos imunológicos, oncológicos, endocrinológicos, neurológicos e digestivos (CUNHA *et al.*, 2014).

O ácido salicílico (C₇H₆O₃) é um potente fármaco com propriedades analgésicas, antipiréticas, antibacterianas e anti-inflamatório e por isso é largamente utilizado pela indústria farmacêutica (RIBEIRO, 2016). Embora o ácido salicílico apresente tantas propriedades terapêuticas, seu frequente uso pode lesar as paredes do estômago, e para solucionar esse problema, a molécula do ácido salicílico ganhou um radical acetil, passando a ser um éster de acetato, o que deu origem ao tão conhecido ácido acetil-salicílico, o AAS (DE MORAIS *et al.*, 2015).

O metildopa (C₁₀H₁₃NO₄) é um fármaco anti-hipertensivo amplamente utilizado no controle da hipertensão arterial. Atua como um agonista dos receptores α 2-adrenérgicos pré-sinápticos,

inibindo a liberação de norepinefrina. Ocorre assim, uma menor ativação do sistema nervoso autônomo simpático, diminuição da resistência vascular periférica e, conseqüentemente, a redução da pressão arterial (BUENO, PEREIRA, 2015). É especialmente usado na hipertensão gestacional e pré-eclampsia, destacando-se como um dos medicamentos essenciais em serviços de saúde pela Organização Mundial de Saúde (OMS), por sua importância na hipertensão durante a gravidez (MARTINS *et al.*, 2015).

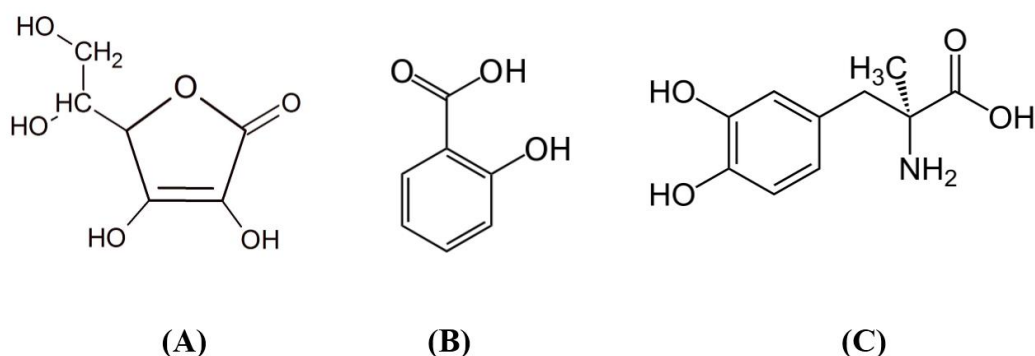


Figura 5. Fórmulas estruturais do (A) ácido ascórbico, (B) ácido salicílico e (C) metildopa.

2.5.1. Paracetamol (acetaminofeno ou N-acetil-p-aminofenol)

O paracetamol ($C_8H_9NO_2$) (**Figura 6**), também conhecido como acetaminofenol é vastamente utilizado como analgésico e antipirético efetivo para adultos e crianças (TKACH *et al.*, 2015). A sua ação no organismo consiste na inibição da síntese de prostaglandina no sistema nervoso central, o que tranquiliza o centro de calor e febre. No entanto, quando administrado em doses acima do recomendado pode causar a intoxicação do fígado e até a morte (GOULART *et al.*, 2014).

O fato do paracetamol não inibir a agregação plaquetária e não provocar reações adversas no trato gastrointestinal o tornam uma ótima opção para o controle da dor e febre em pacientes com contra-indicações formais ao uso de anti-inflamatórios, como o ácido acetil-salicílico (BENEDITO, BRITO e YOSHIOKA, 2016). No entanto, alguns métodos desenvolvidos para determinação do paracetamol, como os espectrofotométricos e cromatográficos, envolvem procedimentos prévios a sua determinação, esses podem ser complexos e demorados. Neste sentido, os métodos eletroquímicos mostraram vantagens na detecção do paracetamol, como de obter uma resposta

rápida, custo relativamente baixo, instrumentação simples, alta sensibilidade na resposta e reprodutibilidade (GOULART *et al.*, 2014).

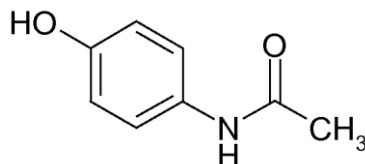


Figura 6. Fórmula estrutural do paracetamol.

2.6. MÉTODOS OFICIAIS PARA QUANTIFICAÇÃO DO PARACETAMOL

De acordo com as legislações, as metodologias analíticas empregadas na quantificação da matéria-prima e do medicamento devem ser preferencialmente aquelas descritas nos Compêndios Oficiais, tais como a Farmacopéia Brasileira, a United States Pharmacopoeia – USP e a European Pharmacopoeia (KHASKHELI *et al.*, 2012).

As metodologias descritas nos compêndios oficiais para análise do paracetamol em diversas amostras incluem as técnicas de Espectrometria UV-VIS e Cromatografia Líquida de Alta Eficiência. Por ser a molécula do paracetamol, eletroquimicamente ativa e oxidável por diversos tipos de eletrodos, a metodologia de Voltametria vem sendo empregada para determinação do mesmo, com bons resultados (LUBOMIR *et al.*, 2012).

A Espectrometria UV-VIS é uma ferramenta analítica consolidada e um dos métodos analíticos mais usados em determinações analíticas em diversas áreas. É aplicada para determinações de compostos orgânicos e inorgânicos, como, por exemplo, no doseamento e identificação do princípio ativo em fármacos. A sua aplicação é simples, de fácil implementação, baixo custo e sensibilidade compatível com as necessidades da indústria farmacêutica. Útil principalmente na análise de amostras contendo no máximo dois ou três componentes, e menos frequente no uso de procedimentos de calibração multivariada (ANVISA, 2010).

O método de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência é uma técnica de separação muito empregada para a identificação e quantificação de substâncias ativas em diversos produtos farmacêuticos. Possibilita a separação de componentes muito semelhantes de misturas complexas, que eventualmente seria impossível com outros métodos (BOSCH *et al.*, 2006).

As técnicas oficiais de análise de fármacos descritas acima, geralmente necessitam de pré-tratamento das amostras, o que os tornam, em alguns casos, menos oportunos para análises de rotina. Dessa forma, o desenvolvimento de técnicas analíticas eficientes para a análise rápida de produtos farmacêuticos é importante para o controle de qualidade na indústria farmacêutica. O que leva a indústria, em parceria com as universidades, buscar inovar e desenvolver métodos mais rápidos, que diminuam os custos das análises, e que sejam mais seguros para o meio ambiente e para o operador (RAMESH e SAMPATH, 2004).

2.6.1. Determinação dos parâmetros analíticos para validação

Atualmente, pretende-se que todos os caminhos levem à busca da qualidade total, tornando-se desta forma, indispensável conhecer perfeitamente cada fase de um processo produtivo. Neste caso, a validação de um método analítico é uma ferramenta adequada que verifica a garantia de qualidade operacional e o desempenho analítico. Por meio deste processo pode-se demonstrar que o método analítico proposto é adequado para a análise de um determinado analito numa certa matriz a um determinado nível de concentração, levando a resultados viáveis, com boa exatidão e precisão, pois o objetivo da validação é demonstrar que o método é adequado para o fim pretendido (MAGALHÃES *et al.*, 2011).

A validação é a determinação de uma evidência documentada que fornece um alto grau de segurança de que um processo específico levará consistentemente a um resultado confiável, ou seja, é o ato de provar, de acordo com princípios das Boas Práticas de Laboratório (BPL) que o procedimento, processo, equipamento, material, atividade ou sistema realmente leva a resultados próximos ao de referência (YARYD, 2014).

O processo de validação de um método não normalizado deve estar descrito em um procedimento e os estudos para determinar os parâmetros de desempenho devem ser realizados com equipamentos e instrumentos dentro das especificações, funcionando corretamente, adequadamente calibrados e previamente validados. Da mesma forma, o operador que realiza os estudos deve ser competente para tomar as decisões apropriadas durante a realização do estudo (ANVISA, 2010).

Espera-se que assim, haja a comprovação, por meio do fornecimento de evidências objetivas, de que os requisitos para a aplicação ou uso específico pretendidos foram atendidos. Os parâmetros de validação devem estar claramente pronunciados. São eles: linearidade, exatidão (taxa de recuperação), seletividade, especificidade, limite de detecção, limite de quantificação e precisão (repetibilidade, precisão intermediária e reprodutibilidade) (LUBOMIR *et al.*, 2012).

Assim, neste trabalho é proposto o desenvolvimento de um biossensor enzimático para análise do paracetamol e outras drogas fenólicas por Voltametria de Pulso Diferencial (DPV). A fim de assegurar a confiabilidade do método, os resultados encontrados com DPV foram comparados com o método de Espectrometria UV-VIS proposto pela Farmacopéia Brasileira, preconizado para o doseamento do paracetamol.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

Desenvolver um biossensor enzimático a partir de polifenoloxidasas (PPOs) extraídas do fruto da jurubeba (*S. paniculatum L.*), utilizando-o como método analítico alternativo na determinação de fármacos fenólicos em formulações farmacêuticas.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Desenvolver biossensores de pasta de carbono com enzimas vegetais e otimizar os parâmetros quanto: quantidade ideal de extrato enzimático e pH ótimo.
- Avaliar a linearidade, seletividade, especificidade, reprodutibilidade, repetibilidade, tempo de condicionamento, estabilidade de armazenamento e reuso, precisão e exatidão (taxa de recuperação) do biossensor.
- Empregar o biossensor na detecção dos fármacos fenólicos.
- Aplicar o biossensor na determinação em amostras comerciais do fármaco.
- Assegurar a confiabilidade da técnica desenvolvida.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. REAGENTES E SOLUÇÕES

Todas as soluções de eletrólitos foram preparadas usando sais de padrão analítica originados da Vetec Química Fina Ltda. (Rio de Janeiro, Brasil), que foram diluídas em água purificada – obtida a partir do sistema de purificação da Millipore Milli-Q com condutividade $\leq 0,1 \mu\text{S cm}^{-1}$, Millipore S/A, (Molsheim, França).

O padrão de paracetamol e o metildopa foram adquiridos na Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA). O ácido salicílico e o ácido ascórbico foram doados pela Farmácia Universitária da Universidade Federal do Goiás (UFG), Goiânia-GO, Brasil.

4.1.1. Preparo das soluções estoque

Todas as soluções estoque (paracetamol, metildopa, ácido salicílico e ácido ascórbico) foram preparadas a uma concentração de 1 mM.

a) Solução estoque de paracetamol: preparada a partir da dissolução de 0,0075g ($\pm 0,0001$) do ativo em água destilada para o volume final de 50 ml. Para assegurar a dissolução total da substância, a solução permaneceu em um banho de ultra-son por 10 min.

b) Solução estoque de metildopa: preparada a partir da dissolução de 0,0105g ($\pm 0,0001$) do ativo em 0,9 ml de ácido clorídrico 0,05 M. Antes do ajuste do menisco permaneceu em um baho de ultra-son durante 10 min para assegurar a total dissolução da massa pesada. Após isto o volume foi completado com água destilada para 50 ml.

c) Solução estoque de ácido salicílico: preparada a partir da dissolução de 0,0069g ($\pm 0,0001$) do ativo em 25 ml de etanol. Antes do ajuste do menisco permaneceu em um baho de ultra-son durante 10 min para assegurar a total dissolução da massa pesada. Após isto o volume foi completado com água destilada para 50 ml.

d) Solução estoque de ácido ascórbico: preparada a partir da dissolução de 0,0088g ($\pm 0,0001$) do ativo em água destilada para o volume final de 50 ml. Para assegurar a dissolução total da substância, a solução permaneceu em um banho de ultra-son por 10 min.

4.1.2. Preparo das soluções padrões

Todas as soluções padrões foram preparadas a uma concentração de 100 μ M, a partir da diluição das soluções estoque (1 mM). Em que 1 mL das soluções estoque foram completadas com água destilada para um volume total de 100 mL.

4.2. MATERIAL VEGETAL

Os frutos da Jurubeba, utilizados neste trabalho, foram oriundos de uma única coleta e planta, localizada às margens do Rio das Almas na cidade de Rialma-GO, Brasil em Agosto de 2016. Coordenadas geográficas: 15°19'08.65" S 49°35'19.38" O. Foram coletados em torno de 100 frutos. Após a coleta, os frutos foram lavados, embalados em sacos de polietileno e armazenadas à 4°C até a análise.

4.2.1. Preparo do extrato bruto vegetal

Para o preparo do extrato bruto vegetal, os frutos da Jurubeba foram congelados por 24 horas antes de serem tratados. Após esse período de congelamento os mesmos foram processados no aparelho Yononas® (Yononas Sobremesa Congelada Maker) (Britânia, Brasil), sendo possível a obtenção de uma pasta congelada denominada de sorvete do fruto da Jurubeba (ICEjur). Em seguida 20g do ICEjur foram diluídos em 100 ml de tampão fosfato de sódio 0,05 M (pH 6,0), homogeneizado por 10 min sob agitação em agitador magnético e filtrado em filtro de tecido TNT (tecido não tecido), obtendo assim um extrato bruto vegetal à 20% (E.Ejur) 0,01 M (pH 6,0). Temperatura ambiente de 20°C \pm 2°C.

4.3. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA POLIFENOLOXIDASE (PPO)

Para o ensaio de atividade enzimática da PPO a mistura de reação constituiu em 100 μ L do E.Ejur e 3 mL de solução de catecol 0,07 M em tampão fosfato de sódio 0,05 M (pH 6,0). Após 10 minutos de reação a leitura foi realizada a 420 nm, usando um UV – Espectrofotômetro Visível (Q798U2VS, Quimis Aparelhos Científicos Ltda., São Paulo, Brasil) (TEFERE *et al.*, 2015, com modificações). O branco da reação constituiu-se na soma das absorvâncias da solução de catecol 0,07 M (I) e na solução tampão fosfato de sódio 0,05 M (pH 6,0) com 100 μ L do E.Ejur (II) (Branco = I + II). Os experimentos foram realizados em triplicata a uma temperatura de 20°C \pm 2°C. Uma unidade de enzima (U.E) foi definida como a quantidade de enzima que causou uma alteração de 0,1 em absorvância/minuto. A atividade da PPO foi expressa em U/mg de proteína.

A determinação do teor de proteínas totais foi realizada de acordo com o método descrito por Bradford (1976), utilizando como solução padrão a albumina de soro bovino (BSA). Misturando 100 µL do E.Ejur em 5 ml do reagente de Bradford. Após 10 minutos de reação a absorbância foi medida a 595 nm. Os experimentos foram realizados em triplicata a uma temperatura de 20°C ± 2°C.

4.4. CONSTRUÇÃO DOS BIOSENSORES

A pasta de carbono foi preparada usando pó de grafite e óleo mineral, ambos originados da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA).

Na construção dos biossensores foi realizada após imobilização enzimática em Pasta de Carbono do E.Ejur, pela técnica de adsorção física (**Tabela 5**). O extrato enzimático foi adicionado diretamente ao pó de grafite, que foi homogeneizado e seco a temperatura ambiente (20°C ± 2°C). Posteriormente o óleo mineral foi adicionado e as pastas foram misturadas rigorosamente.

Tabela 5. Composição dos biossensores

Biossensor*	Pó de grafite (mg)	Extrato vegetal (µL)	Óleo mineral (mg)
PC	100	-	30
PC-Jur50	100	50	30
PC-Jur100	100	100	30
PC-Jur200	100	200	30

* PC = pasta de carbono; Jur = jurubeba.

As pastas foram usadas para preencher o eletrodo cilíndrico de Teflon (Ø = 1 mm) para obter o dispositivo transdutor eletroquímico ou eletrodo de trabalho.

4.5. OTIMIZAÇÃO DO BIOSSENSOR

4.5.1. pH ótimo

Os biossensores desenvolvidos neste trabalho foram devidamente otimizados, visando a aplicabilidade em amostras reais, com isso, a atividade da PPO em função ao pH foi determinada nos intervalos 3,0; 5,0; 7,0 e 9,0 em tampão fosfato 0,1 M.

4.5.2. Quantidade ideal de extrato enzimático

A quantidade ideal de extrato enzimático foi verificado utilizando três quantidades distintas do E.Ejur (extrato bruto vegetal): 50 μL (PCJur50), 100 μL (PC-Jur100) e 200 μL (PC-Jur200), respectivamente na detecção de catecol 0,07 M em tampão fosfato 0,1 M (pH 7,0), como demonstrou a **Tabela 5**.

4.5.3. Repetibilidade

Na repetibilidade foram analisadas três medidas distintas do paracetamol nas mesmas concentrações (100 μM) utilizando o mesmo biossensor.

4.5.4. Tempo de condicionamento

No tempo de condicionamento realizou-se testes em diferentes tempos, sendo eles, 10, 30, 60 e 120 segundos, nas mesmas concentrações de paracetamol (100 μM).

4.5.5. Estabilidade de armazenamento e reuso

A estabilidade de armazenamento do biossensor foi investigada por um período de 42 dias. Neste teste foram fabricadas várias pastas de carbono modificadas com PPO e armazenadas à temperatura de 4 °C. A cada semana antes de iniciar as análises, uma destas pastas era retirada da geladeira e ambientada a 20 °C \pm 2 °C. Logo após era usada para preencher o eletrodo cilíndrico de Teflon ($\varnothing = 1$ mm) para obter o eletrodo de trabalho (biossensor) e utilizado na detecção do paracetamol 100 μM .

Para investigação da estabilidade de reuso, a mesma pasta de carbono modificada com a enzima foi utilizada durante 7 dias consecutivos na detecção do paracetamol 100 μM .

4.5.6. Linearidade: limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ)

Construiu-se uma curva de calibração com as leituras obtidas da solução de paracetamol nas concentrações de 5 μM , 15 μM , 30 μM , 45 μM , 60 μM , 75 μM , 90 μM , 105 μM , 120 μM , 135 μM , 150 μM , 165 μM , 180 μM , 195 μM , 210 μM , 225 μM e 245 μM , empregando-se o método de voltametria de pulso diferencial (DPV).

O limite de detecção (LD) foi definido como a menor quantidade de concentração de paracetamol detectável pelo biossensor proposto, onde foi utilizado concentrações menores que 5 μM . O limite de quantificação (LQ) foi relatado como a menor quantificação alcançada.

4.5.7. Precisão intermediária

A precisão intermediária dos resultados alcançados pelo biossensor proposto neste trabalho foi avaliada levando em consideração a reprodutibilidade por meio dos testes de repetibilidade, tempo de condicionamento, estabilidade e linearidade. Todos os testes foram realizados em triplicata e uma média calculada a partir dos resultados alcançados.

4.5.8. Exatidão

A exatidão do método proposto foi verificada por meio das medidas em amostras reais de paracetamol (referência, genérico e similar) e os resultados comparados aos alcançados pelo método oficialmente reconhecido e proposto pela Farmacopéia Brasileira (FB) (seção 4.6.1) (Espectrometria UV-VIS).

Outro parâmetro determinante na verificação da exatidão e realizado neste trabalho foi o teste de recuperação de padrão de paracetamol em amostras reais, avaliada através dos valores do erro relativo da diferença entre a concentração do analito detectada em comparação a concentração de padrão adicionada. O limite de variação permitida para se confirmar a exatidão da recuperação de um fármaco é de 5% em relação ao erro relativo da diferença entre a concentração do analito detectado pelo método proposto (DPV) em comparação a concentração adicionada (ANVISA, 2010).

4.6. AMOSTRAS UTILIZADAS NA APLICABILIDADE DO BIOSSENSOR

O paracetamol foi determinado em formulações farmacêuticas sólidas (tabletes orais) adquiridas em drogarias de Anápolis-GO. Deste modo, foram selecionados medicamentos de referência, genérico e similar, todos contendo o paracetamol como único princípio ativo. As amostras continham de acordo com o laboratório fabricante o teor nominal de 500 e 750 mg de princípio ativo e foram classificadas conforme a **Tabela 6**.

Tabela 6. Identificação das amostras comerciais analisadas pelo biossensor.

Amostras	Tablete
1	Referência 750 mg
2	Genérico 750 mg
3	Similar 750 mg
4	Referência 500 mg
5	Genérico 500 mg
6	Similar 500 mg

4.6.1. Preparo das amostras

As amostras analisadas foram preparadas de acordo com o procedimento recomendado pela Farmacopéia Brasileira. O doseamento é utilizado para a determinação da quantidade de princípio ativo que está presente no fármaco. Para realizar este teste pesou-se o tablete (10 comprimidos) contendo o teor nominal de 500 e 750 mg de paracetamol, anotando a massa total verificada. Em seguida efetuou-se a maceração da amostra e após homogeneização, pesou-se 0,1500 g ($\pm 0,0001$) do pó obtido e transferiu-se para um balão volumétrico de 200 mL. Em seguida, adicionou-se 50 mL de hidróxido de sódio 0,1M e 100 mL de água, agitando constantemente por 10 minutos e em seguida completando o volume do balão com água. Parte da solução (10 mL) foi diluída em 100 mL de água, após esse procedimento transferiu-se 10 mL da solução resultante para um balão volumétrico de 100 mL com 10 mL de hidróxido de sódio 0,01M e completando o volume com água destilada. Terminada a solução, cujo a concentração final foi de 0,001M (1 mM) (solução estoque). Em seguida, diluída a uma concentração de 100 μ M (1 mL/100 mL), esta foi levada ao espectrofotômetro UV-VIS onde a absorbância foi lida no comprimento de onda de 257 nm e em seguida foi feita a detecção pelo método proposto neste trabalho. Todos os ensaios forma realizados em triplicata (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010).

4.7. ANÁLISES ELETROQUÍMICAS

As análises eletroquímicas foram realizadas em um potentiostato/galvanostato μ Autolab Tipo III[®] integrado ao software GPES 4.9[®] (Eco-Chemie, Utrecht, Holanda). As medições foram realizadas em uma célula eletroquímica com compartimento de 1,0 mL com um sistema de três eletrodos constituído por: um eletrodo de pasta de carbono (PC, PC-Jur50, PC-Jur100 ou PC-Jur200), um fio de platina e o Ag/AgCl/KCl 3 M, representando o eletrodo de trabalho, o contra eletrodo e o eletrodo de referência, respectivamente.

Foram utilizadas as técnicas de análise (a) voltametria cíclica (VC): velocidade de varredura de 100 mV s⁻¹ e potencial variando de -0.6 a 0 V (vs. Ag/AgCl); (b) voltametria de pulso diferencial (VPD): amplitude de pulso 80 mV, largura do pulso de 0,5 s e velocidade de varredura de 10 mVs⁻¹. Todos os dados foram analisados e tratados com o auxílio do software Origin 8[®] (OriginLab Corporation, Northampton, MA, EUA).

4.8. ANÁLISE ESTATÍSTICA E CONSTRUÇÃO DE GRÁFICOS

As análises estatísticas dos dados foram realizadas utilizando o programa BioEstat®, versão 5.3. As diferenças estatísticas entre grupos foram determinadas por Teste de Tukey, sendo considerado estatisticamente significativo $p < 0,05$. Para a construção dos gráficos foi utilizado o programa Origin 8® (OriginLab Corporation, Northampton, MA, EUA).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ESPECÍFICA DA PPO E PROTEÍNAS TOTAIS

A atividade da PPO apresentou 616 U/mg de Proteína com um teor de 1795,22 mg de Proteína em 100 μ L. Estudos demonstram que a família das Solanáceas vêm sendo utilizada como fonte de enzimas já há alguns anos, em específico na extração da PPO (POLESEL, SINHORINI e PERONE, 2010; MISHRA, GAUTAM e SHARMA, 2012; GARCIA *et al.*, 2016). Nesta perspectiva, a atividade da PPO foi determinada no fruto da Beringela (*Solanum melongena*) em diferentes trabalhos, no qual, obteve-se um resultado de 376,5 U/mg.Proteína (polpa) e 500 U/mg.Proteína (casca) (POLESEL, SINHORINI e PERONE, 2010), e 552,60 U/mg de atividade da PPO, com teor de 1912,11 mg de Proteína em 100 μ L do extrato enzimático (GARCIA *et al.*, 2016).

5.2 OTIMIZAÇÃO DOS BIOSENSORES

Quando um biossensor é construído, procedimentos importantes são necessários a fim de se avaliar as melhores condições de operação. Com isso, para obter-se as melhores condições e aplicação dos biossensores na análise dos fármacos, propostos neste trabalho, a princípio foram realizadas o teste controle (sem enzimas) (**Figura 7**), a quantidade ideal de extrato enzimático ofertado para o desenvolvimento dos biossensores (**Figura 8**) e a atividade do PC-Jur100 em função do pH (**Figura 9**).

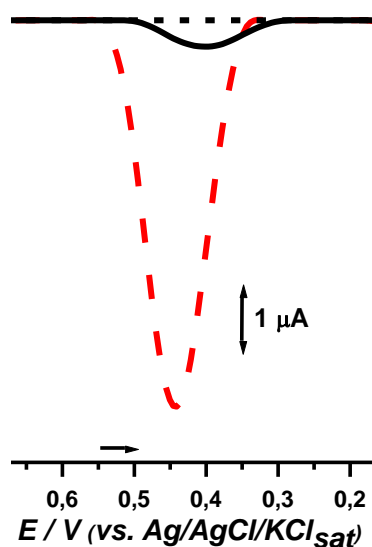


Figura 7. DPV obtido a partir da PC e PC-Jur100, sendo PC (—), PC-Jur100 (- - -) e o branco da reação (. . .) em tampão fosfato 0,1 M (pH 7,0) na análise de catecol 0,07 M.

De acordo com os resultados apresentados na **Figura 7**, nota-se que ao utilizar o biossensor (PC-Jur100), com enzima, o pico de detecção foi superior que o do sensor de pasta de carbono (PC), sem enzima, em que os resultados das correntes obtidas foram $1,19 \times 10^{-6}$ e $1,04 \times 10^{-5} \mu\text{A}$ respectivamente. Isso ocorre, pois ao modificar a PC com o extrato enzimático, proporcionou uma maior seletividade e sensibilidade na detecção do analito de interesse, neste caso o catecol, por se tratar de uma enzima (PPO) com bastante afinidade para fenóis (CARVALHO e SILVA, 2014). Isto caracteriza uma melhor resposta quando se utiliza o biossensor.

Na **Figura 8**, o biossensor que melhor respondeu à análise do catecol foi o PC-Jur100, com um pico de corrente de $1,01 \times 10^{-5} \mu\text{A}$. Observa-se que, com uma quantidade maior que 616 U/mg de proteína, há uma redução da capacidade de detecção do biossensor, ocorrendo uma provável saturação da pasta de carbono, diminuindo os sítios ativos disponíveis. Como as PPOs catalisam a oxidação de mono a di-fenóis e, em relação às oquinonas relacionadas, que geralmente são seus principais produtos oxidados (BARBAGALLO *et al.*, 2012), a corrente catódica faradaica está relacionada principalmente com a quantidade de espécies oxidadas, fato claramente evidenciado pela atividade da PPO frente a quantidade de sítios ativos disponíveis para promover a reação (AMARE, ADMASSIE, 2012; MENDES *et al.*, 2014; PIOVESAN, 2014).

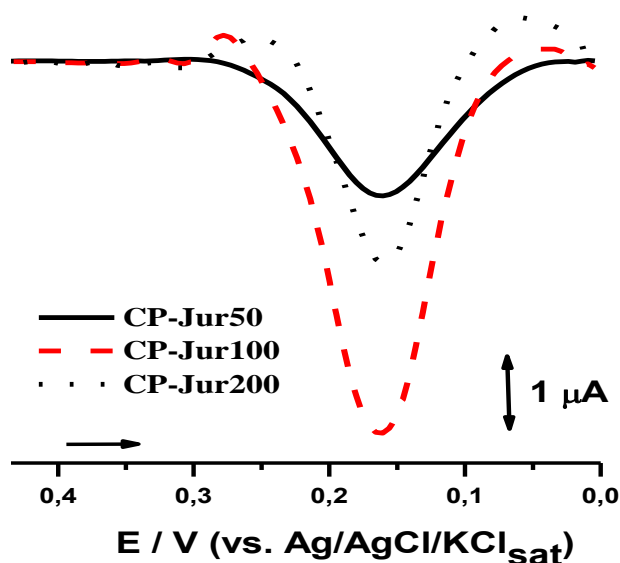


Figura 8. DPV para diferentes quantidades de extrato enzimático e unidades de enzimas (UE): 50 μL (262 U/mg de proteína), 100 μL (616 U/mg de proteína) e 200 μL (1183 U/mg de proteína) em tampão fosfato 0,1 M (pH 7,0) e análise de catecol 0,07 M.

Neste estudo, o pH ótimo para a detecção do fenol foi em 7,0 com $3,66 \times 10^{-6} \mu\text{A}$ de corrente (**Figura 9**). Este valor está de acordo com alguns trabalhos relacionados à atividade da PPO, em que encontraram o pH ótimo na faixa neutra a alcalina (NARANG *et al.*, 2011;

OLIVEIRA *et al.*, 2013; FONSECA, BOBROWSKI, 2015). Além disso, os resultados apresentam uma rápida diminuição da atividade da PPO em pH menor que 5,0. Isto se justifica pelo fato de que em extremos de pH (meios mais ácidos e mais alcalinos) podem ocorrer variações mais drásticas e irreversíveis na estrutura proteica da enzima (MELO, 2016). O pH ótimo (7,0) determinado nesta etapa, foi utilizado em todos os outros experimentos.

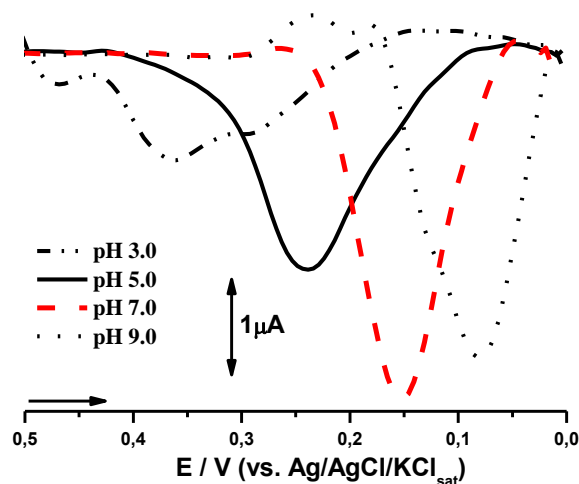


Figura 9. DPVs obtidos para PC-Jur100 em diferentes pHs em tampão fosfato 0,1 M (pH 7,0) na análise de catecol 0,07 M.

5.3 EMPREGO DO BIOSSENSOR NA DETECÇÃO DE FÁRMACOS FENÓLICOS

Para testar a aplicabilidade do PC-Jur100, foi testado a detecção de quatro fármacos fenólicos: o paracetamol, o ácido salicílico, o ácido ascórbico e o metildopa (**Figura 10**).

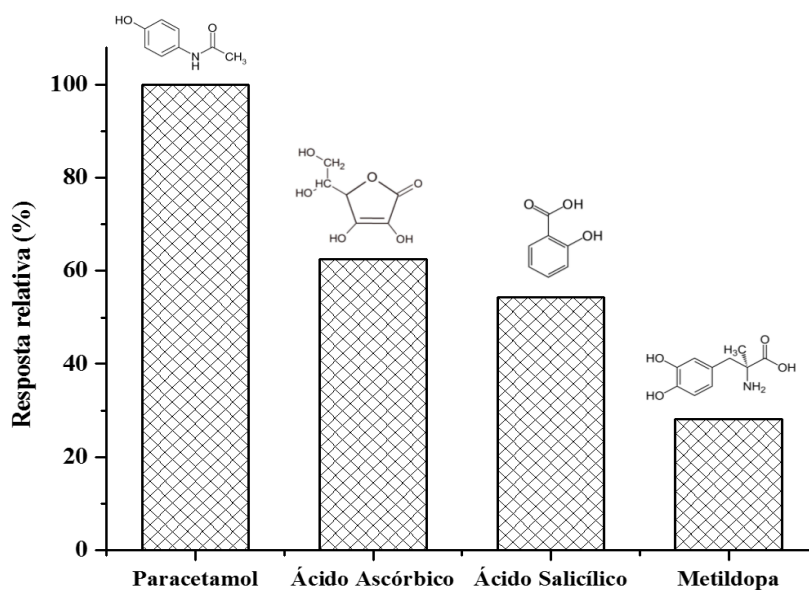


Figura 10. Resposta relativa do PC-Jur100 na análise de diferentes fármacos fenólicos a 100 μM.

A PPO é uma enzima tetramérica com uma massa molar da ordem de 128 kDa, em que seus sítios ativos consistem em dois átomos de cobre coordenados com histidinas, exibe atividade hidroxilase (monofenolase) para monofenóis e atividade oxidase (difenolase) para o-difenois, que são convertidos a o-quinonas. Frente aos compostos utilizados no emprego do PC-Jur100, nota-se que os sítios ativos da enzima interagiram de maneiras diferentes para os grupos químicos presentes em cada fármaco fenólico (CAMPOS *et al.*, 2015).

O paracetamol foi o fármaco que apresentou a melhor resposta de detecção frente o PC-Jur100, com um valor de corrente de $9,16 \times 10^{-5} \mu\text{A}$, alcançando uma superioridade de 73,2 % em comparação ao metildopa. Com isso foi construída uma curva de calibração para o paracetamol (Figura 11).

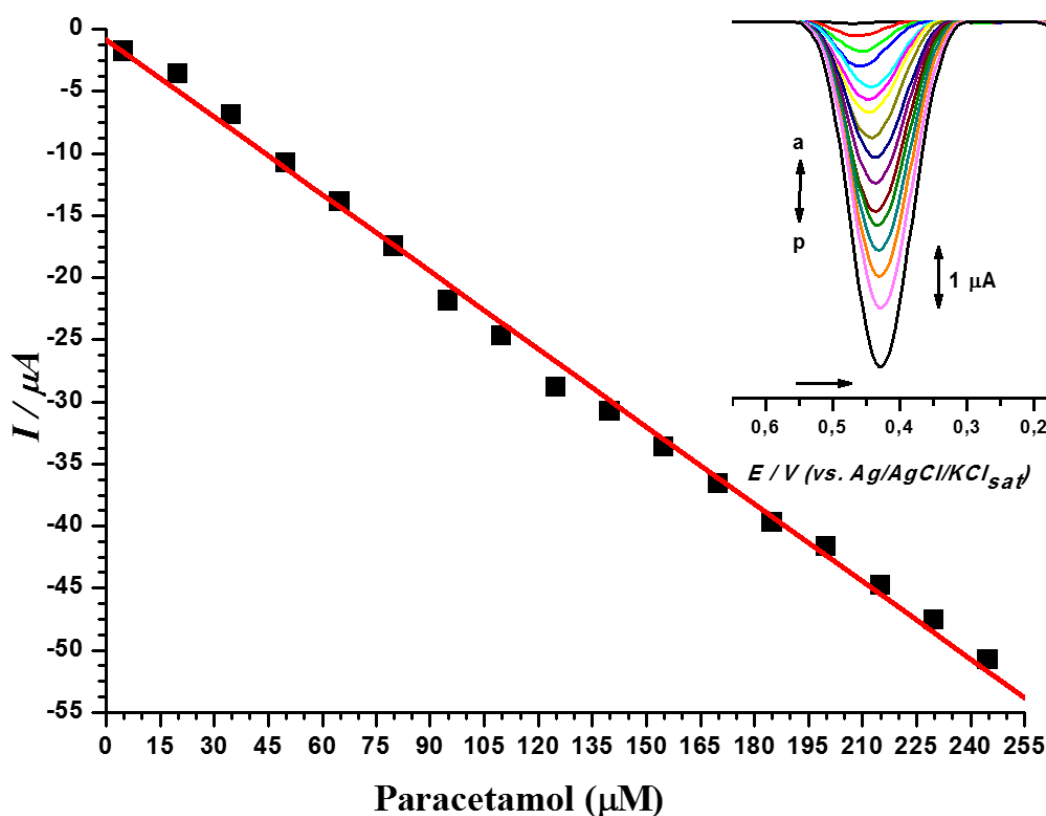


Figura 11. Curva de calibração obtida pelo biossensor PC-Jur100 na análise de diferentes concentrações de paracetamol em tampão fosfato 0,1 M (pH 7,0).

A equação da reta gerada após a plotação dos dados em questão foi a seguinte:
 $I (\mu\text{A}) = 0,46075 - 0,20603 [\text{Paracetamol } \mu\text{M}]$, com Coeficiente de correlação (r^2) igual a 0,99942.

A curva de calibração (Figura 11) apresentou linearidade nas concentrações de 5 a 245 μM de paracetamol com valores de picos de correntes que variaram de $1,80 \times 10^{-7} \mu\text{A}$ a $3,08 \times 10^{-5} \mu\text{A}$. Com isso, foi possível determinar o limite de detecção (LD) que define-se como a menor

quantidade de concentração de paracetamol detectável pelo biossensor proposto (PC-Jur100) e consecutivamente o valor máximo de detecção alcançado pelo mesmo, evidenciado na curva de calibração.

Na **Tabela 7**, é possível verificar a capacidade de resposta (detecção) do biossensor PC-Jur100, proposto neste trabalho, em comparação do LD e alcance linear de outros biossensores de PPO extraído de fonte vegetal, na detecção do paracetamol em concentrações parecidas (μM).

Tabela 7. Dados de biossensores de PPO extraído de fonte vegetal em comparação aos resultados deste trabalho.

Composição do biossensor	Fonte de PPO	Linearidade [paracetamol]	Limite de detecção (LD)	Referências
Pasta de carbono e extrato bruto vegetal	<i>Persea americana</i>	1200 – 53000 μM	880 μM	FATIBELLO-FILHO <i>et al.</i> , 2001.
Pasta de carbono e extrato bruto vegetal	<i>Cucurbita pepo</i>	1200 – 53000 μM	690 μM	VIEIRA <i>et al.</i> , 2003.
Pasta de carbono e extrato bruto vegetal	<i>Musa sp.</i>	59 – 1400 μM	59 μM	SILVA <i>et al.</i> , 2013
Pasta de carbono e extrato bruto vegetal	<i>Solanum melongena</i>	20 – 200 μM	5 μM	GARCIA <i>et al.</i> , 2016
Pasta de carbono e extrato bruto vegetal	<i>Solanum paniculatum L.</i>	5 - 245 μM	3 μM	Este trabalho

As informações apresentadas na **Tabela 7** demonstram que o biossensor construído neste trabalho mostra uma nova oportunidade para detecção de paracetamol com sensibilidade superior aos biossensores desenvolvidos utilizando diferentes fonte de PPO. Com o passar dos anos, avanços tecnológicos, e consequentemente o aprimoramento das técnicas de detecção e extração enzimática, permitem que os dispositivos analíticos desenvolvidos, sejam cada vez mais precisos e sensíveis, com necessidade de menores volumes de amostra e reagentes necessários para as análises.

5.4. REPRODUTIBILIDADE DO BIOSSENSOR:

5.4.1. Teste de Repetibilidade

O teste de repetibilidade proposto neste trabalho para verificação da reprodutibilidade do biossensor, teve como base três medidas sucessivas, realizadas usando cada eletrodo nas mesmas condições (**Figura 12**). A média das correntes obtidas para o PC-Jur100 foram: $5,94 \times 10^{-6} \mu\text{A}$ (1), $5,88 \times 10^{-6} \mu\text{A}$ (2), $5,90 \times 10^{-6} \mu\text{A}$ (3), respectivamente em uma concentração experimental de $100 \mu\text{M}$ de paracetamol. Mostrando serem estatisticamente iguais com um $p = 0,0013$ (Tukey 95%).

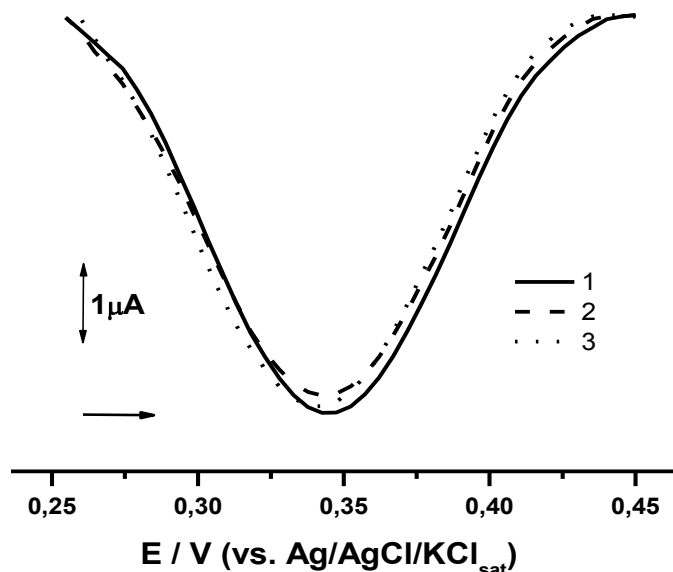


Figura 12. DPVs da repetibilidade (três medidas) do biossensor PC-Jur100 na análise de paracetamol $100 \mu\text{M}$ em tampão fosfato $0,1 \text{ M}$ (pH 7,0).

5.4.2. Tempo de Condicionamento

A influência do tempo de condicionamento também foi um dos testes realizados para definir os melhores parâmetros de confiabilidade e precisão do biossensor. Realizou-se então, testes com diferentes tempos (10, 30, 60 e 120 segundos), porém com as mesmas condições experimentais (**Figura 13**). A média dos picos de corrente obtidos foram: $5,14 \times 10^{-6} \mu\text{A}$ (10 segundos), $5,12 \times 10^{-6} \mu\text{A}$ (30 segundos), $5,09 \times 10^{-6} \mu\text{A}$ (60 segundos) e $5,19 \times 10^{-6} \mu\text{A}$ (120 segundos) em uma concentração experimental de $100 \mu\text{M}$ de paracetamol. O teste de Tukey 95% também foi utilizado neste parâmetro e demonstrou que os resultados obtidos na detecção do paracetamol nos diferentes tempos são estatisticamente iguais, com um $p = 0,0251$.

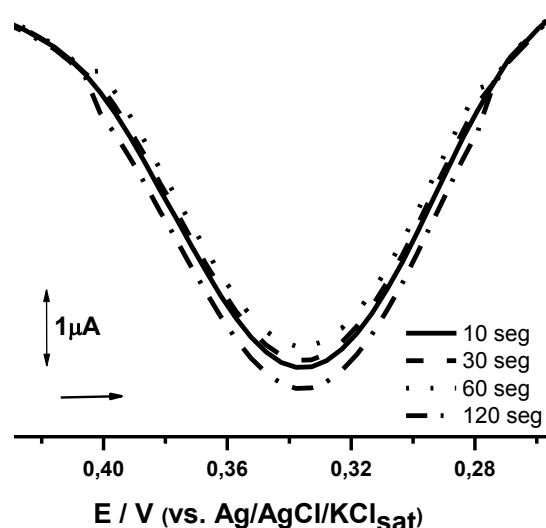


Figura 13. DPVs mostrando o efeito do tempo de condicionamento para o PC-Jur100 na análise de paracetamol 100 μM em tampão fosfato 0,1 M (pH 7,0).

Pelos resultados obtidos, verificou-se uma boa precisão e reprodutibilidade do biossensor na detecção do paracetamol, no qual obteve um coeficiente de variação de 0,02 e 0,03 nos diferentes teste acima relatados como mostra a **Tabela 8**.

Tabela 8. Precisão das medidas obtidas na detecção do Paracetamol (100 μM).

Teste proposto	Média da corrente obtida (μM)	Reprodutibilidade (n)	Desvio Padrão (%)
Repetibilidade*	$5,90 \times 10^{-6} \pm 0,02$	9	0,152
Tempo de condicionamento**	$5,13 \times 10^{-6} \pm 0,03$	12	0,174

* $p = 0,0013$. ** $p = 0,0251$

5.4.3. Teste de estabilidade de armazenamento e reuso

A estabilidade de armazenamento e de reuso do biossensor também foram parâmetros investigados para testar a reprodutibilidade e robustez do método proposto neste trabalho na detecção do paracetamol. A estabilidade de armazenamento foi investigada por um período de 42 dias. No final do 42º dia, o biossensor PC-Jur100, manteve-se 87,79%, da sua resposta inicial com picos de correntes que variaram de $2,29 \times 10^{-5}$ a $2,00 \times 10^{-5} \mu\text{A}$ em uma concentração de 100 μM de paracetamol (**Figura 14**).

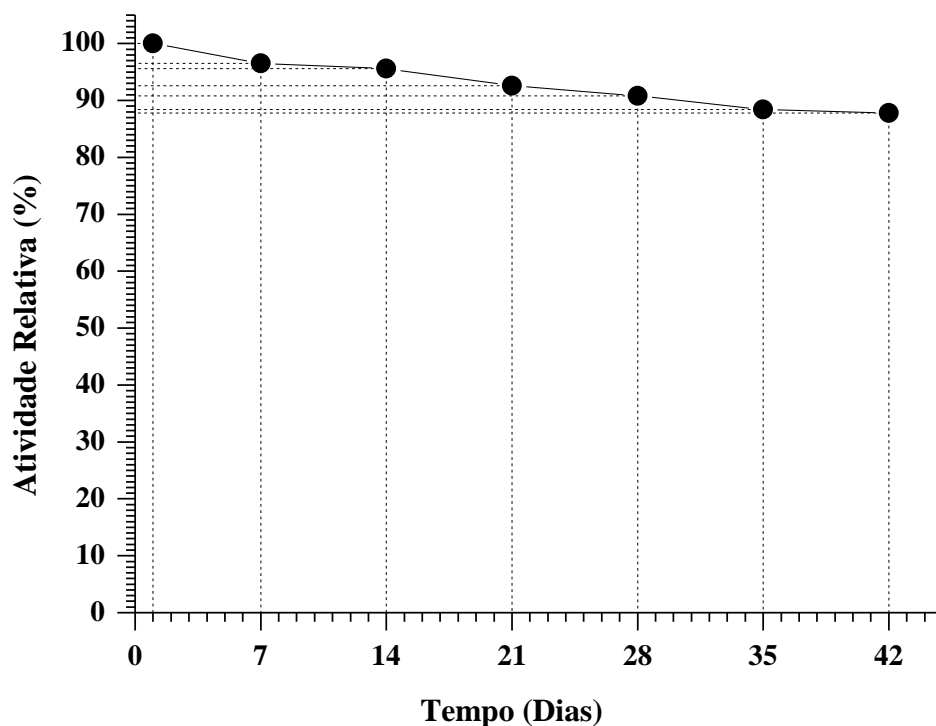


Figura 14. Detecções relacionadas com a estabilidade de armazenamento do biossensor.

Em continuação aos testes de estabilidade foi testado na sequência a estabilidade de reuso do biossensor (PC-Jur100) por um período de 7 dias consecutivos, sendo o biossensor proposto reutilizado 7 vezes na detecção do paracetamol na concentração de 100 μM . No final do 7º dia de reutilização, o biossensor manteve-se em 76,96% de funcionamento quando comparado ao primeiro dia (**Figura 15**). Mostrando que o método de imobilização enzimática adotada foi eficiente.

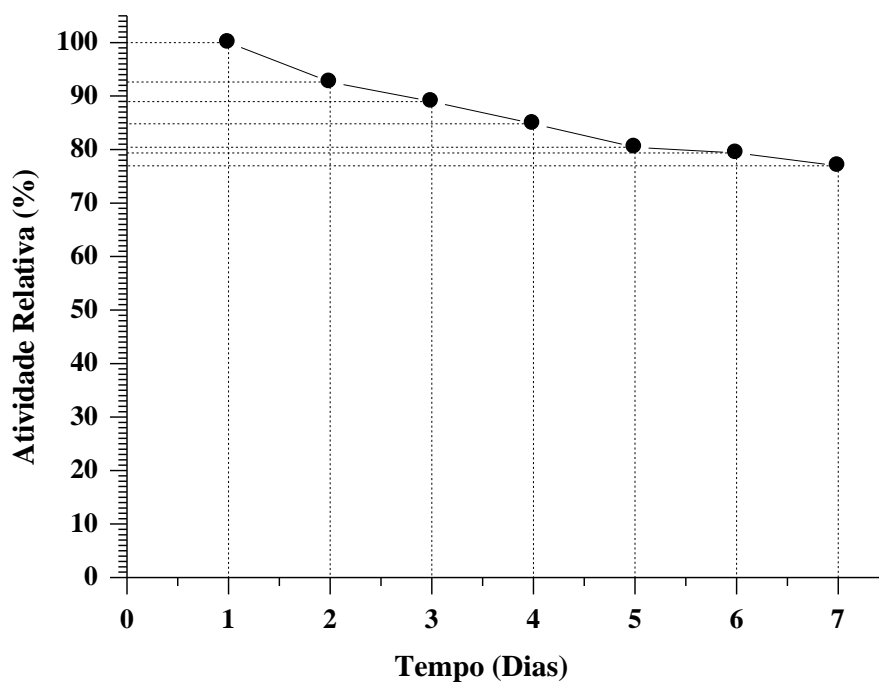


Figura 15. Detecções relacionadas com a estabilidade de reutilização do biossensor.

5.5. ANÁLISE DAS AMOSTRAS REAIS PELO BIOSENSOR E MÉTODO OFICIAL

Após o desempenho analítico obtido em amostras experimentais e construção da curva de referência, o biossensor PC-Jur100 foi testado em amostras reais de paracetamol. Uma vez que as soluções de análise de todas as amostras selecionadas foram preparadas (em triplicata), deu-se início a determinação do paracetamol empregando-se pequenas alíquotas das mesmas. Todas as soluções foram analisadas inicialmente pelo método oficial (Espectrometria UV-VIS) e logo em seguida pelo método proposto (Biossensor – DPV). Os resultados das análises realizadas pelo método oficial e proposto encontram-se dispostos na **Tabela 9**.

Tabela 9. Comparação dos resultados obtidos nas determinações de paracetamol.

Medicamentos	Valor rotulado (mg)	Método oficial (mg)	Método proposto (mg)	Erro * relativo (%)	Erro ** relativo (%)	Erro *** relativo (%)
Referência ₁	750	773,76 ± 1,20	769,74 ± 0,77	+ 3,16	+ 2,63	- 0,51
Genérico ₂	750	752,94 ± 0,77	747,06 ± 0,36	+ 2,94	- 0,39	- 0,78
Similar ₃	750	753,86 ± 0,59	751,84 ± 0,65	+ 0,51	+ 0,24	- 0,26
Referência ₄	500	510,38 ± 0,46	507,18 ± 0,40	+ 2,07	+ 1,43	- 0,62
Genérico ₅	500	497,36 ± 0,34	495,38 ± 0,37	- 0,52	- 0,92	- 0,39
Similar ₆	500	505,60 ± 0,38	491,46 ± 0,58	+ 1,12	- 1,70	- 2,79

₁ p = 0,0287; ₂ p = 0,0069; ₃ p = 0,0062; ₄ p = 0,0126; ₅ p = 0,0030; ₆ p = 0,0011 (Tukey 95%).

* Erro relativo₁ = referente ao valor tabelado e o resultado obtido pelo método oficial.

** Erro relativo₂ = referente ao valor tabelado e o resultado obtido pelo método proposto.

*** Erro relativo₃ = referente aos resultados obtidos entre o método proposto e o método oficial.

Em seguida foi aplicado o teste t pareado (Tukey 95%) para verificar se possuía diferença entre os resultados obtidos na detecção do paracetamol nas amostras reais em comparação aos métodos oficial e proposto. Os resultados mostraram que não houve diferença estatística entre os valores alcançados.

A Farmacopeia Brasileira (FB) é o código oficial do Brasil, que estabelece os principais padrões a serem adotados, no que se refere às análises físico-químicas. Em sua V edição estabeleceu que o medicamento paracetamol em comprimidos, deve obter em sua composição no mínimo 95,0% e no máximo 105,0% de princípio ativo (ANVISA, 2010). Assim, como as amostras analisadas rotulavam valores de 500 e 750 mg de paracetamol, os resultados não deveriam ser inferiores a 475 e 712,50 mg ou superiores a 525 e 787,50 mg respectivamente. Desta forma, todas

as 6 amostras analisadas ficaram dentro deste intervalo de concentração, estando portanto de acordo a Farmacopeia Brasileira.

5.6. TESTE DE RECUPERAÇÃO DE PADRÃO

De acordo com a Farmacopéia Brasileira (FB), o limite de variação permitida para se confirmar a exatidão da recuperação de um fármaco é de 5% em relação ao erro relativo da diferença entre a concentração do analito detectado pelo método proposto em comparação a concentração adicionada (ANVISA, 2010). Os resultados de recuperação obtidos das análises das amostras reais de paracetamol pelos método proposto (DPV) encontram-se dispostos na tabela a seguir (**Tabela 10**).

Tabela 10. Teste de recuperação de padrão de paracetamol em medicamentos.

Medicamento	Na amostra*	Concetração de Paracetamol (μM)			Erro **** relativo (%)	Recuperação (%)
		Adicionado**	Encontrado***			
Referência	10	0	0	0	100	
		10	$9,76 \pm 0,13$	2,40	97,60	
		20	$19,71 \pm 0,67$	1,45	98,55	
		30	$29,56 \pm 0,88$	1,46	98,53	
		40	$40,06 \pm 0,91$	0,15	100,15	
Genérico	20	0	0	0	100	
		10	$10,12 \pm 0,23$	1,20	101,20	
		20	$20,03 \pm 0,97$	0,15	100,15	
		30	$29,97 \pm 0,33$	0,10	99,90	
		40	$41,03 \pm 42$	2,57	102,57	
Similar	30	0	0	0	100	
		10	$9,96 \pm 1,14$	0,40	99,60	
		20	$20,14 \pm 0,31$	0,70	100,70	
		30	$30,02 \pm 0,98$	0,06	100,06	
		40	$39,91 \pm 0,77$	0,22	99,77	

* Resultado obtido através de análise da amostra real diluída pelo método proposto.

** Concentrações padrões adicionadas.

*** Concentrações recuperadas pelo método proposto (média de três determinações).

**** Erro relativo entre a concentração encontrada em relação a concentração adicionada.

As recuperações calculadas a partir dos resultados da **Tabela 10**, revelaram um erro relativo que variou de 0 a 2,57 %, que é menor do que o valor limite de 5%. Portanto, o método proposto DPV indica que está em forte concordância com o método da farmacopéia. Assim, pode ser aplicado com sucesso para a determinação de paracetamol em tal forma de dosagem sem qualquer processo de pré-tratamento, oferecendo baixos custos e mais rápido desenvolvimento.

6 CONCLUSÃO

Os estudos realizados neste trabalho evidenciaram a viabilidade do emprego do biossensor (PC-Jur100) por meio de Voltametria de Pulso Diferencial (DPV) para determinação de paracetamol, uma vez que este método é formado por um sistema simples e prático, e quando aplicado para determinação do paracetamol em amostras comerciais foi capaz de produzir resultados que não diferiram significativamente do método oficial.

O extrato bruto enzimático obtido do fruto da *S. paniculatum L.* mostrou-se eficiente pelos bons níveis de atividade da PPO, que possibilitou modificar e desenvolver um biossensor bem sucedido constituído com pasta de carbono (pó de grafite). Na otimização foi demonstrado que a quantidade ideal de extrato bruto utilizado para melhor detecção e ação da enzima frente ao analito de interesse foi 100 μL . Foi avaliado também a reprodutibilidade do biossensor em comparação a repetibilidade, tempo de condicionamento e estabilidade. Mostrou-se uma linearidade de 5 a 240 μM , com um limite de detecção de 3 μM que mostrou-se inferior a outros biossensores de PPO já desenvolvidos e disponíveis na literatura. Na aplicação, o PC-Jur100 após otimizado mostrou-se eficiente para determinação seletiva do paracetamol em formulações farmacêuticas em comprimidos disponíveis comercialmente.

De maneira geral, o método proposto foi capaz de promover taxas boas e aceitáveis de recuperação em amostras reais. Os resultados obtidos com as análises das amostras mostraram que os teores do princípio ativo (paracetamol) nas formulações farmacêuticas estavam de acordo com as especificações farmacopêicas.

Dentre as vantagens observadas com o método proposto estão: o uso de reagentes pouco tóxicos e de baixo custo, com uma geração de resíduos de pouco impacto ambiental, boa precisão (repetibilidade), reprodutibilidade, não exigiu um tratamento prévio das amostras analisadas (apenas um processo de dissolução e diluição), conferiu-se uma boa sensibilidade para propósito de controle de qualidade, o que faz deste uma alternativa atraente para a aplicação na análise de paracetamol em formulações farmacêuticas.

7 REFERÊNCIAS

- ABREU, F.; DE ALMEIDA, L. C.; SANTOS, F. M.; FRICKS, A.; FREITAS, L.; LIMA, Á.; SOARES, C. M. **Utilização de resíduo agroindustrial como suporte para a imobilização de lipase por adsorção física.** Semana de Pesquisa da Universidade Tiradentes-SEMPESq, (16), 2016.
- ALBARELLO N.; SIMÕES-GURGEL, C.; CASTRO, T. C.; GAYER, C. R. M.; COELHO, M. G. P.; MOURA, R. S.; MANSUR, E. **Anti-inflammatory and antinociceptive activity of fieldgrowth plants and tissue culture of *Cleome spinosa* (Jacq.) in mice.** Journal of Medicinal Plants Research, v.7, n.16, p.1043-1049, 2013.
- AL-FATIMI, M.; WURSTER, M.; SCHRÖDER, G.; LINDEQUIST, U. **Antioxidant, antimicrobial and cytotoxic activities of selected medicinal plants from Yemen.** *Journal of Ethnopharmacology*, 111(3), 657-666. 2007.
- AMARAL, R. D. Á. **Efeito de inibidores de escurecimento na qualidade de batatas minimamente processadas: Efecto de inibidores del oscurecimiento en la calidad de patatas mínimamente procesadas.** 2015.
- AMARE, M.; ADMASSIE, S. **Polymer modified glassy carbon electrode for the electrochemical determination of caffeine in coffee.** *Talanta*, v. 93, n.15, p.122– 128. 2012.
- ANDRADE, C. C.; RESENDE, R. S.; RODRIGUES, F. A.; SILVEIRA, P. R.; RIOS, J. A.; OLIVEIRA, J. R.; Mariano, R. L. **Indutores de resistência no controle da pinta bacteriana do tomateiro e na atividade de enzimas de defesa.** *Tropical Plant Pathology*, 38(1), 28-34. 2013.
- ANDRADE, R. G. **Avaliação das condições de pastagens no cerrado brasileiro por meio de geotecnologias.** *Revista Brasileira de Agropecuária Sustentável*, v. 7, n. 1, 2017.
- ANVISA. **FARMACOPEIA BRASILEIRA 5ª EDIÇÃO, VOLUME 2** / Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília: Anvisa, 1189-1193p., v.2, 2010.
- ARAN, H. D. V. R.; DO CARMO V. M.; HEREDIA-ZÁRATE, N. A.; GONÇALVES, W. V.; ALVES, J. M.; SANTOS, C. C. **Germinação de Sementes de Jurubeba (*solanum paniculatum*) Submetidas a Diferentes Temperaturas.** *Cadernos de Agroecologia*, 9(4). 2015.

ARRIBAS, A.S.; FERNÁNDEZ, M.; CHICHARRO, M. **The role of electroanalytical techniques in analysis of polyphenols in wine.** Trends in Analytical Chemistry, v.34, p.78-96, 2012.

BARATTO, C. M.; ROSSI, E. **Desenvolvimento de suportes sólidos à base de polifosfato e sílica para imobilização de enzimas com aplicação em processos biotecnológicos.** Seminário de Iniciação Científica, Seminário Integrado de Ensino, Pesquisa e Extensão e Mostra científica, 8. 2014.

BARBAGALLO, R. N.; RIGGIB, E.; AVOLAB, G.; PATANÈ, C. **Biopreservation of 'birgah' eggplant from polyphenol oxidase activity assayed in vitro with onion (allium cepa l.) byproducts.** Chem. Eng. Trans. 2012, 27, 43–48.

BARBOSA, A. D. S.; SILVA, M. A. D. O.; CARVALHO, N. B.; MATTEDI, S.; IGLESIAS, M. A.; FRICKS, A. T.; SOARES, C. M. **Immobilization of lipase by encapsulation in silica aerogel.** *Química Nova*, 37(6), 969-976. 2014.

BARBOSA, K. F.; SALES, J. D. F.; RESENDE, O.; OLIVEIRA, D. E.; ZUCHI, J.; SOUSA, K. A. D. **Desorption isotherms and isosteric heat of 'cajuzinho-do-cerrado' achenes.** Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental, 20(5), 481-486. 2016.

BARRETO, C. F.; MORENO, M. B.; DA SILVA, P. S.; DE MELLO, F. R.; FACHINELLO, J. C.; MARTINS, C. R. **Conservação de maçãs 'fuji suprema' minimamente processados.** Revista Iberoamericana de Tecnología Postcosecha, 1(1), 99-105. 2016.

BATISTA, P. D.; SILVA, E. M. **Apresentação de uma ferramenta tecnológica para a caracterização elétrica de sensores de pH do tipo EGFET.** *Notas técnicas*, 6(1). 2016.

BELLIDO-MILLA, D., CUBILLANA-AGUILERA, L. M., EL KAOUTIT, M., HERNANDÉZ-ARTIGA, M. P., HIDALGO-HIDALGO de CISNEROS, J. L.; NARANJO-RODRÍGUEZ, I., PALACIOS-SANTANDER, J. M. **Recent advances in graphite powder-based electrodes.** Anal Bioanal Chem, 405, 3525–3539, 2013.

BENEDITO, V. M.; BRITO, A. B. N.; YOSHIOKA, C. M. N. **Aplicação de modelos termodinâmicos no estudo da solubilidade do paracetamol.** Brazilian Journal of Production Engineering-BJPE, 2(2), 01-10. 2016.

BITELO, A. P. S. **"Filmes de enzima sob a superfície de um compósito nanoestruturado condutor e sua aplicação como biossensor eletroquímico."** Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 2015.

BORDINHÃO, C.; MATTE, C. R.; POPPE, J. K.; RODRIGUES, R. C.; HERTZ, P. F.; AYUB, M. A. **Estudo das condições de imobilização da lipase de *thermomyces lanuginosus* para a produção de biodiesel.** Blucher Chemical Engineering Proceedings, 1(3), 1338-1343. 2015.

BRADFORD, M. **Um método rápido e sensível para a quantificação de micrograma quantidades de proteínas, utilizando o princípio da proteína corantes vinculação.** Anal. Biochem. 72, 248-254, 1976.

BRASIL. Ministério da saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. **Alimentos regionais brasileiros.** Ministério da Saúde, Secretaria de Atenção à Saúde, Departamento de Atenção Básica. 2. ed. – Brasília: Ministério da Saúde, 2015. 484 p.

BUENO, N. G.; PEREIRA, A. V. **Determinação espectrofotométrica de metildopa em ensaio de dissolução de comprimidos utilizando extrato de rabanete como fonte de peroxidase.** Quim. Nova, 38(8), 1107-1111. 2015.

BUSO, E. K. R. P. D.; CLEMENTE, E.; ESTRADA, K. R. F. S.; ZÁRATE, N. A. H.; OLIVEIRA, J. S. B. **Post-harvest behaviour of the arracacha coated with chitosan.** Revista Ciência Agronômica, 45(4), 850-855. 2014.

CAMPOS, L. F. C.; PEIXOTO, J. V. M.; OLIVEIRA, R. M.; SELEGUINI, A.; NASCIMENTO, A. R. **Propriedades físico-químicas de frutos de jurubeba de três regiões do Cerrado.** Revista de Agricultura Neotropical, Cassilândia-MS, v. 2, n. 4, p. 48-54, out./dez. 2015.

CARVALHO, I. S.; SILVA, R. **In vitro Antioxidant Activity, Phenolic Compounds and Protective Effect against DNA Damage Provided by Leaves, Stems and Flowers of *Portulaca oleracea* (Purslane).** Natural Product Communications, v.9, n.1, p.45-50, 2014.

CAZES, M.; ABEJÓN, R.; BELLEVILLE, M-P.; SANCHEZ-MARCANO, J. **Membrane bioprocesses for pharmaceutical micropollutant removal from waters.** Membranes, v.4, p. 692-729, 2014.

CHARQUEIRO, D. S.; MENEZES, E. W. D.; MATTE, C. R.; POPPE, J. K.; HERTZ, P. F.; COSTA, T. M. H. **Sílica Texturizada contendo GPTMS para Imobilização de Lipase.** 2015.

CHAVERO, L. N. **Desenvolvimento e caracterização de plataformas nanoestruturadas de polipirrol para biossensores amperométricos não enzimáticos e enzimáticos.** 2013.

CLARK JR, L. C.; LYONS, C., **Electrode systems for continuous monitoring in cardiovascular surgery**. Acad. Sei, New York, 1962.

CONCEIÇÃO, K. C.; MELO, M.; FRICKS, A.; FARIAS, C. **Imobilização por ligação covalente de peroxidase de raiz forte em sílicas mesoporosas**. Semana de Pesquisa da Universidade Tiradentes-SEMPESq, (16). 2014.

CONTI, R.; GUIMARÃES D.O, PUPO. M. T. **Aprendendo com as interações da natureza: microrganismos simbiotes como fontes de produtos naturais bioativos**. Ciência e Cultura, São Paulo, v. 64, n. 3, p. 43-47, 2012.

CUNHA, K. D.; SILVA, P. R.; FARIA, A. L.; FONSECA C. S.; TEODORO, A. J.; KOBLITZ, M. G. B. **Estabilidade de ácido ascórbico em sucos de frutas frescos sob diferentes formas de armazenamento/Ascorbic acid stability in fresh fruit juice under different forms of storage**. Brazilian Journal of Food Technology, 17(2), 139. 2014.

DANTAS, J. M. M. **Purificação de quitosanas produzidas por Bacillus cereus utilizando cromatografia líquida rápida de proteínas**. Trabalho de Conclusão de Curso. Universidade Federal do Rio Grande do Norte. 2017.

DE MELLO, A. C.; DA COSTA, S. L. M.; SALGADO, A. M. **Phenol determination in environmental interest samples by an amperometric biosensor based on lyophilized fungi tissue (Agaricus bisporus)**. *Engenharia Ambiental: Pesquisa e Tecnologia*, 11(2). 2014.

DIAS, A. D. B. V. G. **Construção de Biossensores de ADN para a Avaliação da Capacidade Antioxidante** (Doctoral dissertation, Instituto Politécnico do Porto. Instituto Superior de Engenharia do Porto). 2014.

DIAS, E. M. C. **Caraterização da toxicidade de carbamatos in vivo e desenvolvimento de um biossensor para controlo alimentar**. Tese de Doutorado, 2017.

DO PRADO, S. J. T.; LEIMANN, F. V.; GONÇALVES, O. H.; PARANÁ, T. F. **Obtenção de micropartículas estruturadas contendo curcumina**. *Blucher Chemical Engineering Proceedings*, 1(3), 1674-1679. 2015.

DOMINGOS, M. T.; MAGDALENA, N. I. R.; CAT, M. N. L.; WATANABE, A. M.; ROSÁRIO FILHO, N. A. **Condutividade e teste quantitativo coulométrico na triagem neonatal para fibrose cística**. *Jornal de Pediatria*, 91(6), 590-595. 2015.

EULÁLIO, H. Y. C.; CARDOSO, M. J. B.; MARINHO, T. M. A.; LIMA, R. J. S.; FOOK, M. V. L. **Avaliação da imobilização da enzima uréase, extraída da semente de *Canavalia Ensiformis*, em membranas de quitosana para uso em biossensores.** Revista Eletrônica de Materiais e Processos, 11(1). 2016.

FATIBELLO-FILHO, O.; LUPETTI, K. O.; VIEIRA, I. C. **Chronoamperometric determination of paracetamol using an avocado tissue (*Persea americana*) biosensor.** Talanta, 55(4), 685-692. 2001.

FERNÁNDEZ-FERNÁNDEZ, M.; SANROMÁN, M. A.; MOLDES, D. **Recent developments and applications of immobilized laccase.** Biotechnology Advances, v. 31, p. 1808–1825, 2013.

FERRARI, T. **Banana minimamente processada: inibição do escurecimento enzimático por agentes químicos e análise sensorial** (Bachelor's thesis, Universidade Tecnológica Federal do Paraná). 2014.

FERREIRA, E. R. A. **Filmes de polipirrol como matrizes para a imobilização da polifenol oxidase e aplicação como biossensores amperométricos na análise de compostos fenólicos.** Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo 2007.

FLORES, R. O.; SILVA, L. M. C.; MELO AF, SALGADO AM. **Analysis of Potential Applicability of the Potentiometric Urea Biosensor to Real Samples,** 2013.

FONSECA V. B.; BOBROWSKI V. L. **Biotecnologia na escola: a inserção do tema nos livros didáticos de Biologia.** Acta Scientiae, v.17, n.2, maio/ago. 2015.

GARCIA, L. F.; BENJAMIN, S. R.; ANTUNES, R. S.; LOPES, F. M.; SOMERSET, V. S.; GIL, E. S. **Solanum melongena polyphenol oxidase biosensor for the electrochemical analysis of paracetamol.** Preparative Biochemistry and Biotechnology. 2016.

GIL, E.S.; ANDRADE, C.H.; BARBOSA, N. L. BRAGA, R. C.; SERRANO, S. H. P. **Cyclic voltammetry and computational chemistry studies on the evaluation of the redox behavior of parabens and other analogues.** Braz. J. Chem. Soc., 2012.

GOLINELLI, D. L. C. **Síntese e caracterização do dispositivo eletroquímico baseado em nanopartículas de prata suportadas sobre grafeno para análise de antibióticos em efluentes.** Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo. 2016.

GOMES, G. D. **Acastanhamento interno durante o armazenamento da pera após; Rochaapos;; Impacto do baixo O₂ e alto O₂ no metabolismo e estratégias de controle.** 2015.

GOULART, L. S.; CARVALHO, A. C.; LIMA, J. C.; PEDROSA, J. M.; DE LIMA L. P.; DE OLIVEIRA, R. B. **Consumo de medicamentos por idosos de uma Unidade Básica de Saúde de Rondonópolis/MT. Estudos Interdisciplinares sobre o Envelhecimento, 19.** 2014.

GUIMARÃES, L. A. F.; SOARES, J. E. S.; CARVALHO, T. M. J. P. **Determinação sérica de paracetamol por espectrofotometria e cromatografia líquida de alta eficiência.** Revista Intertox-EcoAdvisor de Toxicologia Risco Ambiental e Sociedade, v. 8, n. 2, p. 08-25, jun. 2015.

GUZIK, U.; HUPERT-KOCUREK, K.; MARCHLEWICZ, A.; WOJCIESZYŃSKA, D. **Enhancement of biodegradation potential of catechol 1,2-dioxygenase through its immobilization in calcium alginate gel.** Electronic Journal Biotechnology, v. 17, p. 83–88. 2014.

HARTWIG, E.; NOGUEIRA, D.; MENDONÇA, C.; SILVA, J. D. F.; ALVES, M.; BORGES, C. **Utilização das enzimas peroxidases do nabo no controle do escurecimento enzimático em maçãs minimamente processadas.** Blucher Chemical Engineering Proceedings, 1(2), 2999-3004. 2015.

ISMAIL, E. S. **Produção da enzima ciclodextrina glicosiltransferase por Bacillus sp. imobilizados em quitosana.** 2015.

KARIM, F.; FAKHRUDDIN, A. **Recent advances in the development of biosensor for phenol: a review.** Reviews in Environmental Science and Bio-Technology, v. 11, n. 3, p. 261 – 274. 2012.

KARSTEN, J.; CHAVES, D. V.; FINGER, F. L.; BARBOSA, J. G. **Papel e caracterização da polifenoloxidase em hastes de ave-do-paráíso (*Strelitzia reginae* Ait.).** Ornamental Horticulture, 19(2), 161-171. 2013.

KAZIYAMA, V. M.; FERNANDES, M. J. B.; SIMONI, I. C. **Atividade antiviral de extratos de plantas medicinais disponíveis comercialmente frente aos herpesvírus suíno e bovino.** Revista Brasileira de Plantas Medicinais, Botucatu, v.14, n.3, p.522-528, 2012.

KOHORI, N. A.; CAMARGO, J. P. C.; SILVA, M. K. L.; CESARINO, I. Q. M. **Avaliação do compósito polipirrol-grafeno na imobilização de enzimas e sua aplicação na determinação de dopamina.** *Journal of Basic and Applied Pharmaceutical Sciencies*, 37(2). 2016.

- LEAL, R. C. **Desenvolvimento de um biossensor amperométrico para determinação de triglicerídeos em biodiesel.** Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Maranhão. 2014.
- LINO, F. M. A.; SÁ, A. L. Z.; TORRES, I. M. S.; ROCHA, M. L.; DINIS, T. C. P.; GHEDINI, P. C.; SOMERSET, V. S.; GIL, E. S. **Voltammetric and spectrometric determination of antioxidant capacity of selected wines.** *Electrochimica Acta*, v.128, p. 25–31. 2014.
- MARTINS, H. F.; PINTO, D. P.; ASSIS, N. V.; MARQUES, M. A. S.; AMENDOEIRA, F. C. **Desenvolvimento de metodologia baseada em HPLC/MS/MS para a determinação de 3-O-metildopa em plasma humano e sua aplicação a estudos de bioequivalência.** *Revista do Instituto Adolfo Lutz*, 73(1), 96-105. 2015.
- MASCAGNI, D. B. T. **"Biossensores de glicose baseados na imobilização da glicose oxidase em filmes finos de óxido de grafeno reduzido."** Tese de Doutorado. Universidade Estadual Paulista. 2017.
- MAURICIO, E.; SILVA, L.; SALGADO, A.; PESSOA, F. **Desenvolvimento de um biossensor potenciométrico para controle de qualidade de óleo de gergelim comestível.** *Blucher Chemical Engineering Proceedings*, 1(2), 5038-5045. 2015.
- MEDEIROS, H. S. D. **Uso de sensor de polidiacetileno para detecção de contaminantes químicos e microbiológicos em água potabilizada para consumo humano.** 2016.
- MELO, M. A. D. **Aplicação de métodos de inativação e inibição enzimática em frutas e hortaliça.** 2015.
- MELO, M. N.; QUEIROZ, M. L. B.; FRICKS, A. T.; SOARES, C. M. **Imobilização de peroxidase vegetal em sílicas mesoporosas.** *Semana de Pesquisa da Universidade Tiradentes-SEMPESq*, (16). 2014.
- MELO, S. M. **Sensor eletroquímico para detecção de organismos geneticamente modificados: detecção do promotor P35S.** Tese de Doutorado. Universidade do Piauí. 2016.
- MELO, V. U.; MOURA, S. R. R.; OLIVEIRA, L. R.; SANTANA, M. M. S.; SANTANA-FILHO, V. J. **Controle reflexo da pressão arterial: qual o papel da ocitocina como neurotransmissor autonômico?.** *Revista de Ciências Médicas e Biológicas*, 15(1), 47-51. 2016.

MENDES, R. K.; MOINO, B. P.; GUILHERME, J. P. P.; NOGUEIRA, A. B. **Desenvolvimento de um Biossensor Eletroquímico Obtido com Extrato Vegetal para a Determinação de Triglicerídeos em Biodiesel.** *Revista Virtual de Química*, 6(4), 1033-1046. 2014

MERIÑO, C. Y. B. **Resposta de plantas de Coffea arabica (Rubiaceae) às injúrias de Leucoptera coffeella (Lepidoptera: Lyonetiidae) através das vias das lipoxigenases e atividade de polifenoxidases.** 2015.

MESIA-VELA, S.; SANTOS, M. T.; SOUCCAR, C.; LIMA-LANDMAN, M. T. R.; LAPA, A. J. **Solanum paniculatum L. (Jurubeba): Potent inhibitor of gastric acid secretion in mice.** *Phytomedicine*, 9(6), 508-514. 2002.

MIHOS, F.; SÁ, N.; SILVA, L.; SALGADO, A.; PEREIRA, P. **Purificação parcial da enzima peroxidase extraída do feijão (phaseolus vulgaris l.) Visando aplicação em biossensor amperométrico para detecção de agrotóxicos.** *Blucher Chemical Engineering Proceedings*, 1(2), 9360-9367. 2015.

MIRANDA, M. A.; TIOSSIA, R. F. J.; SILVA, M. R., RODRIGUES, K. C.; KUEHNA, C. C.; OLIVEIRA, L. G. R. **In vitro leishmanicidal and cytotoxic activities of the glycoalkaloids from Solanum lycocarpum (Solanaceae) fruits.** *Chemistry & Biodiversity*, Zürich, v. 10, n. 4, p. 642–648, 2013.

MISHRA, B. B.; GAUTAM, S.; SHARMA, A. **Purification and characterization of polyphenol oxidase (PPO) from eggplant.** *Food Chem*, 134 (4), 1855–1861. 2012.

MORAES, M. L. D.; RIBEIRO, S. J. L.; DEFFUNE, E.; OLIVEIRA, J. C. V.; LIMA, L. R. D.; SOUZA, A. V. G. D. **Processo de produção de um imunossensor, imunossensor, kit para detecção de um vírus e método de detecção.** 2016.

MORAIS, F. E.; SOUZA, S. P. M. C.; ARAÚJO, E. G.; FERNANDES, N. S. **Caracterização e avaliação do comportamento térmico dos medicamentos de referência, genérico e similar contendo o ácido acetil salicílico como princípio ativo.** *Brazilian Journal of Thermal Analysis*, 4(1-2), 1-5. 2015.

MORAIS, M. L.; SILVA, A. C. R.; ARAÚJO, C. R. R.; ESTEVES, E. A.; DESSIMONI-PINTO, N. A. V. **Determinação do potencial antioxidante in vitro de frutos do cerrado brasileiro.** *Revista Brasileira de Fruticultura*, 35(2), 355-360. 2013.

MOREIRA, R. R. D.; MARTINS, G. Z.; MAGALHÃES, N. O.; ALMEIDA, A. E.; PIETRO, R. C. L. R.; SILVA, F. A. J.; CICARELLI, R. M. B. **In vitro trypanocidal activity of solamargine and extracts from *Solanum palinacanthum* and *Solanum lycocarpum* of brazilian cerrado.** Academia Brasileira de Ciências, Rio de Janeiro, v. 85, n. 3, p. 903-907, 2013.

MOURA, R. S. **Diversidade genética e germinação de jenipapo.** 2014.

NARANG, J. **A nylon membrane based amperometric biosensor for polyphenol determination.** Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic. 2011.

NETA, J. L. V.; SOUZA, C. S. A.; MIRANDA, R. D. C. M., SILVA, D. P.; RUZENE, D. S.; SOARES, C. M. F.; LIMA, Á. S. **Avaliação de novo suporte para imobilização de lipase por adsorção física.** Semana de Pesquisa da Universidade Tiradentes-SEMPESq, (16). 2016.

NETO, M. C. C.; SILVA, R. M.; SANTOS, R. N.; NETO, E. M. R.; ALBUQUERQUE, R. L. **Análise físico química de comprimidos efervescentes com vitamina c.** Mostra Científica da Farmácia, 2(1). 2016.

NEVES, R. B. S. **Nanotecnologia Aplicada à Indústria de Alimentos: o uso de biossensores.** Obtido de: http://portais.ufg.br/up/67/o/semi2011_Rodrigo_Balduino_1c.pdf. 2011.

OLIVEIRA, A. E. F.; PEREIRA, A. C. **Biossensores e a Indústria Alimentar-Revisão.** *Revista Virtual de Química*, v. 8, n. 5, 2016.

OLIVEIRA, L. A. D. **Atividade da polifenoloxidase em camarão (*Litopenaeus vannamei*) submetido ao emprego do frio e atmosfera modificada.** 2013.

OLIVEIRA, T. M. B. F.; BARROSO, M. F.; MORAIS, S.; LIMA-NETO, P.; CORREIA, A. N. OLIVEIRA, M. B. P. P.; DELERUE-MATOS, C. **Biosensor based on multi-walled carbon nanotubes paste electrode modified with laccase for pirimicarb pesticide quantification.** *Talanta*, v. 106,p. 137-143, 2013.

PEREIRA, K. L.; PINTO, L. V. A.; PEREIRA, A. J. **Potencial fitorremediador das plantas predominantes na área do lixão de Inconfidentes/MG.** *Revista Agrogeoambiental*, Pouso Alegre, Edição Especial n. 1, p. 25-29, ago. 2013.

PERONE, C. A. S.; QUEIROZ, A. S.; DALOSSO, V. M. **Determinação de paracetamol (acetaminofenol) em produtos farmacêuticos usando um biossensor de polifenol oxidase,**

obtida de extrato bruto de banana nanica (*Musa acuminata*). Revista do Instituto de Ciências da Saúde, v. 25, n. 2, p. 133-139, 2007.

PIMENTA, A. C. **Characterization of plants and fruit of araticum plant (*Annona crassiflora* Mart.) native to the Cerrado of Mato Grosso.** Revista Brasileira de Fruticultura, v. 36, n. 4, p. 892-899, 2014.

PINTO, V. H. **Mn (III)-porfirinas como catalisadores biomiméticos: Estabilidade térmica e imobilização em vermiculita e sílica gel funcionalizada para hidroxilação de alcanos.** 2013.

PIOVESAN, J. V. **Determinação eletroanalítica de compostos fenólicos utilizando um eletrodo de pasta de carbono modificado com poli (vinilpirrolidona).** Tese de Doutorado. Universidade Federal de Santa Catarina. 2014.

PORFIRIO, F. F.; GIAROLA, J. D. F.; PEREIRA, A. C. **Biossensores e Bebidas-Revisão.** Revista Virtual de Química, 8(5). 2016.

PORTE, A.; PORTE, L. H. M.; OLIVEIRA, L. M. D. **Chiral gas chromatography in the resolution of enantiomers involved in fruit flavours.** Química Nova, 37(10), 1670-1679. 2014.

PROVIDELLO, M. V.; CARNEIRO, Z. A.; PORTAPILA, G. B.; ALBUQUERQUE, S. **Avaliação in vitro da atividade do ácido ascórbico durante a fase aguda da doença de chagas experimental.** Investigação, 15(6). 2016.

RAMOS, J. V. H. **Material híbrido bioinorgânico à base de sílica e quitosana aplicado no desenvolvimento de sensor eletroquímico para determinação de paracetamol na presença de dopamina.** 2013.

RECK, I. M.; MELCHIOR, L. G. **Isolamento e caracterização de polifenoloxidase e peroxidase em polpa de abacates.** Revista de Engenharia e Tecnologia, 8(3), 14-23. 2016.

RIBEIRO JÚNIOR, E. J. M. **Aprimoramento de biossensor de lacase para determinação de micropoluentes fenólicos em águas contaminadas.** 2015.

RIBEIRO, C. D. L. **Determinação eletroanalítica de ácido salicílico em produto dermatológico com eletrodos de nanotubos de carbono e nanopartículas de óxido de ferro.** 2016.

RIBEIRO, S. R.; FORTES, C. C.; OLIVEIRA, S. C. C.; CASTRO, C. F. D. S. **Avaliação da atividade antioxidante de *Solanum paniculatum* (Solanaceae).** Arq Ciênc Saúde Unipar, 11, 179-183. 2007.

SÁ, L.; HASHIM, M.A.A. **Flexible Solid State EDLC from a Commercially Prepared Multiwalled Carbon Nanotubes and Hybrid Polymer Electrolytes**. Journal of Materials Science Research, v.3, p.-21, 2014.

SALGADO, A.; JACOBY, G.; PAULA, L. A.; Bioquímica, L. D. S. B. **O estado da ciência do desenvolvimento de biossensores a nível nacional**. Blucher Chemical Engineering Proceedings, 1(2), 2615-2622. 2015.

SANTIAGO, P. D. O. **Desenvolvimento de biossensor contendo polifenoloxidasas de sementes de jatobá para análise ambiental**. 2011.

SANTOS, M. A.; BARBIERI, A. F.; MACHADO, C. J.; CARVALHO, J. A. **Minas Gerais e o Marco Inicial da Ocupação do Cerrado Brasileiro: O Papel do Estado**. Redes, 19(1), 261-275. 2014.

SANTOS, R. C. M. **Obtenção e caracterização de etanol a partir da fermentação da polpa extraída do cajuzinho-do-cerrado (*Anacardium humile*)**. 2016

SANTOS, S. P. A. **Jurubeba: importância e sua utilidade**. Tecnologias Sociais, Recife-PE, v.1, ed. 1, 2013.

SANTOS, T. L. L.; OLIVEIRA M. P. R. B.; NUNES, G. S. **Construção, caracterização e otimização de biossensor amperométrico baseado em eletrodos de minicavidade com pasta de carbono**. Cadernos de Pesquisa, 134-148. 2014.

SANTOS, V. D. M.; ALVES, W. C. **Desenvolvimento de compósitos a base de nanocelulose impregnada em nanopartículas de prata visando sua aplicação em biossensores eletroquímicos**. Universidade Federal Fluminense. 2017.

SERRANO, S. H. P.; MARTINS, J. V.; DA SILVA. J. M. S. **Determinação do potencial de redução do par $rno_2/rno_2\bullet$ -derivado de nitrofural utilizando biossensor de glicose**. *Essentia-Revista de Cultura, Ciência e Tecnologia da UVA*, v. 16, n. 1, 2014.

SILVA, B. F. P. **Deposição não eletrolítica de filmes plasmônicos de ouro para biossensores**. Tese de Doutorado. Universidade de Minho. 2015.

SILVA, D. A. D.; CALISTO, S. M. M. **Avaliação físico-química e sensorial da manga Tommy Atkins submetida à desidratação** (Bachelor's thesis, Universidade Tecnológica Federal do Paraná). 2013.

- SILVA, M. L. D. **Estudo da bioeletrocatalise de oxidação de etanol utilizando extrato bruto de sementes de *Helianthus annuus* como fonte de álcool desidrogenase.** 2011.
- SILVA, T. M. S.; NASCIMENTO, R. J. B.; BATISTA, M. M., Agra, M. F.; CAMARA, C. A. **Brine shrimp bioassay of some species of *Solanum* from Northeastern Brazil.** *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 17(1), 35-38. 2007.
- SILVA-FILHO, R. R.; TORRALBO, D. F.; DI-MEDEIROS, M. C. B.; ALELUIA B. K.; FERNANDES, K. F. **Imobilização de lipase em pectina extraída de frutos de lobeira (*Solanum lycocarpum* St. Hil.).** *BBR-Biochemistry and Biotechnology Reports*, 1(1), 9-14. 2012.
- SILVÉRIO, L. C. B. S. **Desenvolvimento de um eletrodo de pasta de carbono modificado por prata eletrodepositada in situ e determinação eletroanalítica de dopamina.** 2015.
- SOARES, G. S.; MORAES, C. C.; FRANKE, M.; BONINI, M. P.; MOURA, B. N. **Atividade enzimática de polifenoloxidase em cogumelos do gênero *pleurotus ostreatus*.** *Anais do Salão Internacional de Ensino, Pesquisa e Extensão*, 8(2). 2017.
- SOUSA, G. L. S. **Obtenção e caracterização da farinha da batata-doce.** 2015.
- SOUZA, J. F. D. **Desenvolvimento de membranas de polissulfona para imobilização de lipase.** Dissertação de Mestrado. Universidade de Caxias do Sul. 2014
- TALENS-PERALES D.; MARÍN-NAVARRO, J.; POLAINA, J.; **Enzymes: Functions and Characteristics.** Reference Module in Food Science. In: *Encyclopedia of Food and Health*. Pages 532–538. 2016.
- TEFERE, N. S.; DELON, A.; BUCKOW, R.; **Versteeg, oxidase do polyphenol C. Blueberry: caracterização e a cinética do thermal e de alta pressão de ativação e inativação.** *Alimento Chem*, 188, 193-200, 2015.
- TIBOLLA, H.; PELISSARI, F. M.; MENEGALLI, F. C. **Hidrólise enzimática do farelo da casca de banana para produção de nanofibras de celulose.** *Cibia*, 110. 2014.
- TKACH, V. V.; NASCIMENTO, H. F.; NECHYPORUK, V. V.; YAGODYNETS, P. I. **A descrição matemática do desempenho de sensores e biossensores eletroquímicos de pH, baseados em polímeros condutores, nos processos de medição do pH dos líquidos de cavidade bucal no modo de voltagem constante.** *Revista Colombiana de Ciências Químico Farmacéuticas*, 43(1), 196. 2014

TKACH, V.; SWAMY, B. K.; OJANI, R.; AKSIMENTYEVA, O.; ZERBINO, J.; MASCARENHAS, R. **O comportamento de paracetamol durante a sua oxidação eletrocatalítica sobre poli (azul da anilina) e a sua descrição matemática.** *Revista Colombiana de Ciencias Químico Farmacéuticas*, 44(2), 148. 2015.

TKACHC, V. V.; OJANI, R.; NECHYPORUK, V. V.; YAGODYNETS, P. I. **A descrição matemática do desempenho do sensor de dopamina, baseado no elétrodo da pasta de carbono, modificado por nanotubos e fragmentos da banana.** *Revista Colombiana de Ciencias Químico-Farmacéuticas*, 44(1), 58-71. 2015.

TORO, M. J. U. **Desenvolvimento de biossensores baseado em extrato de açaí e sensor biomimético para detecção de hexazinona.** Tese apresentada ao Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos parcial para obtenção do título Doutor em química. 2014.

TREMOCOLDI, M. A.; DAIUTO, É. R.; ALENCAR, S. M. D.; VIEITES, R. L. **Efeito da hidrotérmica em abacate ‘Hass’ sobre a capacidade antioxidante, compostos fenólicos e coloração.** *Semina-ciencias Agrarias*, 1279-1290. 2014.

VIEIRA JÚNIOR, G. M.; ROCHA, C. Q.; RODRIGUES, T. S.; HIRUMA-LIMA, C. A.; VILEGAS, W. **New steroidal saponins and antiulcer activity from *Solanum paniculatum* L.** *Food Chemistry*, London, v. 186, n. 1, p. 160-167, 2015.

VIEIRA, I. C.; LUPETTI, K. O.; FATIBELLO-FILHO, O. **Determination of paracetamol in pharmaceutical products using a carbon paste biosensor modified with crude extract of zucchini (*Cucurbita pepo*).** *Química Nova*, 26(1), 39-43. 2003.

WEBER, D. **"Suportes poliméricos à base de quitosana: preparação, caracterização e aplicações biocatalíticas na síntese de ésteres terpênicos."** Universidade de Santa Catarina (2016).

WEBER, D. **Suportes poliméricos à base de quitosana: preparação, caracterização e aplicações biocatalíticas na síntese de ésteres terpênicos.** 2016.

ZUCOLOTTO, V.; CIANCAGLINI, P.; OLIVEIRA JUNIOR, O. N. D.; SANTOS, F. R. D.; PERINOTTO, A. C.; PEREZ, K. R.; STABELI, R. G. **Biossensor tendo eletrodos interdigitados para aplicação em nanomedicina na detecção e diagnóstico.** 2016.
