



ROBERTA CASTRO MARTINS

**CONSTRUÇÃO DE BIOSSENSOR VOLTAMÉTRICO MODIFICADO COM
PEROXIDASE EXTRAÍDA DE *Solanum gilo* PARA DETERMINAÇÃO DE
HIDROQUINONA EM COSMÉTICOS**

LAVRAS - MG

2021

ROBERTA CASTRO MARTINS

**CONSTRUÇÃO DE BIOSSENSOR VOLTAMÉTRICO MODIFICADO COM
PEROXIDASE EXTRAÍDA DE *Solanum gilo* PARA DETERMINAÇÃO DE
HIDROQUINONA EM COSMÉTICOS**

Monografia apresentada à Universidade Federal de
Lavras, como parte das exigências do Curso de
Química, para a obtenção do título de Licenciado.

Prof^a. Dra. Fabiana da Silva Felix

Orientadora

Dra. Letícia Cristina de Assis

Coorientadora

LAVRAS - MG

2021

ROBERTA CASTRO MARTINS

**CONSTRUÇÃO DE BIOSSENSOR VOLTAMÉTRICO MODIFICADO COM
PEROXIDASE EXTRAÍDA DE *Solanum gilo* PARA DETERMINAÇÃO DE
HIDROQUINONA EM COSMÉTICOS**

**CONSTRUCTION OF VOLTAMMETRIC BIOSENSOR MODIFIED WITH
PEROXIDASE EXTRACTED FROM *Solanum gilo* FOR THE
DETERMINATION OF HYDROQUINONE IN COSMETIC**

Monografia apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Curso de Química, para a obtenção do título de Licenciado.

APROVADA em 29 de novembro de 2021.

Dra. Fabiana da Silva Felix UFLA

Dra. Tássia Regina de Oliveira UFSCar

Dr. Luís Marcos Cerdeira Ferreira UFSCar



Prof^a Fabiana da Silva Felix
Departamento de Química
UFLA

Prof^a. Dra. Fabiana da Silva Felix
Orientadora



Letícia Cristina de Assis
Coorientadora

**LAVRAS - MG
2021**

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente aos meus pais, Roberto Martins e Claudia Castro, que sempre me incentivaram nos estudos. Em especial à minha mãe, que desde os meus primeiros passos na universidade sempre me orientou e mostrou o melhor caminho na minha trajetória. Além de termos esse laço de mãe e filha, hoje podemos trabalhar juntas no desenvolvimento de projetos. Portanto, agradeço a ela, também, pela contribuição no desenvolvimento do meu trabalho de conclusão de curso, como professora.

Agradeço também à minha avó Deidamia Sanhueza, que sempre esteve do meu lado me apoiando nos melhores e nos piores momentos da minha trajetória acadêmica.

Em especial aos meus amigos, Luiz Capucho, Natânia Rodrigues e Maria Augusta Marques, deixo o meu muito obrigada pela amizade que formamos desde o nosso primeiro período juntos no curso. Foram muitos altos e baixos, e sempre estivemos juntos nessa montanha russa que foi e ainda é a nossa vida.

Aos meus demais amigos, também deixo meu agradecimento pelas memórias que sempre terei do nosso tempo de UFLA.

Agradeço também a minha orientadora, Professora Dra. Fabiana Felix, que desde o início acreditou em mim e nas minhas ideias. Sempre me auxiliou com muito carinho e parceria.

Agradeço também a Letícia Assis e ao Matheus Julien por todo o auxílio que me foi dado desde o meu primeiro dia no laboratório. Foram muitas horas de trabalho juntos que geraram muitos frutos, sendo o principal deles o conhecimento que pude adquirir trabalhando com vocês.

Aos demais colegas de laboratório, agradeço o companheirismo na organização do espaço físico, a troca de conhecimento e as experiências que passamos juntos.

Agradeço a Professora Dra. Adelir Saczk, a Professora Dra. Zuy Magriotis, ao Professor Dr. Gustavo Tonoli, ao Professor Dr. Fabiano Magalhães, ao grupo de pesquisa do Complexo BIOMAT e ao grupo de pesquisa de Microbiologia Agrícola, que de alguma forma contribuíram com o desenvolvimento deste trabalho, seja com doação de materiais ou disponibilização de laboratório.

Agradeço a Professora Dra. Josefina de Souza, responsável pela disciplina de apresentação de monografia, por sempre estar disponível e pela rapidez na solução das demandas.

Agradeço à banca da apresentação deste trabalho, Dra. Tássia Regina de Oliveira e Dr. Luís Marcos Cerdeira Ferreira, pela disponibilização do tempo e contribuição para o trabalho.

Ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico), pela bolsa de estudos, auxílio financeiro que possibilitou o desenvolvimento desse trabalho.

Ao DQI (Departamento de Química), pela estrutura oferecida para o desenvolvimento de aulas e pesquisas que contribuíram para minha formação acadêmica.

À coordenação do curso, Rita Suart e Paulo Ricardo da Silva, que sempre estiveram disponíveis para sanar dúvidas e auxiliar no que era necessário.

A todos os professores que contribuíram para a minha formação. Em especial ao professor Guilherme Max Dias Ferreira, pela paciência e por sempre transmitir sua paixão pela Química na ministração de suas aulas.

Ao ICN (Instituto de Ciências Naturais), pelo suporte principalmente na fase final da minha graduação.

À UFLA (Universidade Federal de Lavras), pelas oportunidades oferecidas e pelas experiências vividas, que sempre me lembrarei com muito carinho.

*“Há verdadeiramente duas coisas diferentes:
saber e crer que se sabe. A ciência consiste em
saber; em crer que se sabe reside a ignorância.”*

Hipócrates

RESUMO

A hidroquinona (HQ) é um agente despigmentante de pele mais usado topicamente no tratamento de manchas dermatológicas. Esse agente é largamente utilizado em cremes farmacêuticos, sendo de extremo interesse dos laboratórios de controle de qualidade determiná-lo, pois quando utilizado em concentrações superiores a 4% e em uso prolongado pode ocasionar irritação ou até mesmo erupções na pele do consumidor. Neste contexto, foi desenvolvido um biossensor eletroquímico para determinar a HQ em formulações de cremes farmacêuticos. O biossensor proposto foi construído usando pasta de carbono modificada com enzima peroxidase, extraída do jiló (*Solanum gilo*), e imobilizada em zeólita durante as análises de voltametria de onda quadrada. Experimentos espectrofotométricos foram realizados a fim de verificar a melhor atividade enzimática total no extrato bruto de jiló em diferentes materiais para conservação da peroxidase, na qual o extrato de jiló com álcool polivinílico (PVOH) apresentou uma maior atividade, com $2837,5 \text{ U mL}^{-1}$. Para a construção do biossensor, primeiramente foi aplicado um planejamento experimental fatorial fracionado $2^{(9-4)}$ (resolução IV) para determinar a influência no efeito e interações das diferentes variáveis do método proposto (extrato enzimático, zeólita, grafite, óleo mineral, pH, peróxido de hidrogênio e os parâmetros da técnica de voltametria de onda quadrada: frequência, amplitude e incremento de potencial). A resposta monitorada para os experimentos voltamétricos do planejamento experimental foi a corrente catódica, proveniente do processo redox da HQ, em relação ao potencial aplicado. Após verificar a influência no efeito e interações dos valores das variáveis citadas e selecionar aquelas mais significativas na determinação de hidroquinona, aplicou-se um delineamento central composto rotacional 2^4 e os parâmetros principais foram extrato enzimático, zeólita, óleo mineral e pH. A partir dos parâmetros otimizados em voltametria de onda quadrada, uma curva analítica foi obtida de $5,96 \times 10^{-6}$ até $7,01 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ de HQ em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7,5, com r igual a 0,999, indicando uma boa correlação entre a corrente de redução e a concentração do analito. Por fim, o método proposto foi aplicado em amostras reais e mostrou ser uma alternativa simples, rápida, sensível e de baixo custo para análises de hidroquinona em cosméticos.

Palavras-chave: Biossensor voltamétrico, zeólita, agente protetor, peroxidase, hidroquinona.

ABSTRACT

Hydroquinone (HQ) is a skin depigmenting agent most used topically to treat skin blemishes. This agent is widely used in pharmaceutical creams, and it is of extreme interest to quality control laboratories to determine it, because when used in concentrations above 4% and in prolonged use, it can cause irritation or even eruptions on the consumer's skin. In this context, an electrochemical biosensor was developed to determine the HQ in pharmaceutical cream formulations. The proposed biosensor was constructed using carbon paste modified with peroxidase enzyme, extracted from scarlet eggplant (*Solanum gilo*) and immobilized in zeolite (Nay), during square wave voltammetry analyses. Spectrophotometric experiments were carried out and it was verified that the best total enzymatic activity in the raw extract of jilo, in different materials for peroxidase conservation (latex, PVOH, PVP K90), was the extract of jilo with polyvinyl alcohol (PVOH), with an activity value of 2837.5 U mL⁻¹. For the construction of the biosensor, first a fractional factorial experimental design 2⁽⁹⁻⁴⁾ (resolution IV) was applied to determine the influence on the effect and interactions of the different variables of the proposed method (enzymatic extract, zeolite, graphite, mineral oil, pH, hydrogen peroxide, and the parameters of the square wave voltammetry technique: frequency, amplitude and step potential). The monitored response for the voltammetric experiments of the experimental design was the cathodic current, originating from the HQ redox process, in relation to the applied potential. After verifying the influence on the effect and interactions of the values of the variables mentioned and selecting those most significant in the determination of hydroquinone, a central composite rotational design 2⁴ was applied and the main parameters were enzymatic extract, zeolite, mineral oil, and pH. From the parameters optimized in square wave voltammetry, an analytical curve was obtained from 5.96x10⁻⁶ of 7.01x10⁻⁵ mol L⁻¹ of HQ in 0.1 mol L⁻¹ phosphate buffer pH 7.5, with r equal to 0.999, indicating a good correlation between the reduction current and the analyte concentration. Finally, the proposed method was applied to real samples and shows to be a simple, fast, sensitive, and low-cost alternative for hydroquinone analysis in cosmetics.

Palavras-chave: Voltammetric biosensor, zeolite, protective agent, peroxidase, hydroquinone.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	11
2. REFERENCIAL TEÓRICO	13
2.1.BIOSSENSORES	13
2.2.ELEMENTOS DE RECONHECIMENTO BIOLÓGICO PARA IMOBILIZAÇÃO ENZIMÁTICA	14
2.3.ZEÓLITA COMO SUPORTE PARA IMOBILIZAÇÃO ENZIMÁTICA	17
2.4.ENZIMA PEROXIDASE.....	19
2.5.HIDROQUINONA.....	21
2.6.MÉTODOS ELETROANALÍTICOS	23
2.7.MÉTODOS ESTATÍSTICOS	24
3. METODOLOGIA	26
3.1.MATERIAIS E INSTRUMENTAÇÃO.....	26
3.2.OBTENÇÃO DO EXTRATO BRUTO ENZIMÁTICO DE VEGETAIS.....	26
3.3.CONSERVAÇÃO ENZIMÁTICA	27
3.4.DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE DA ENZIMA PEROXIDASE E PROTEÍNAS TOTAIS DO EXTRATO BRUTO ENZIMÁTICO	27
3.5.ESTUDOS QUANTO À TÉCNICA ANALÍTICA VOLTAMÉTRICA.....	28
3.6.CONSTRUÇÃO DO BIOSSENSOR.....	28
3.7.DETERMINAÇÃO DE HIDROQUINONA EM CREMES FARMACÊUTICOS....	32
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	33
4.1.ATIVIDADE DA ENZIMA PEROXIDASE E PROTEÍNAS TOTAIS NO EXTRATO BRUTO ENZIMÁTICO	33
4.2.BIOSSENSOR.....	39
4.2.1. RESULTADOS DO PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL FATORIAL FRACIONADO $2^{(9-4)}$	39
4.2.2. RESULTADOS DO DELINEAMENTO CENTRAL COMPOSTO ROTACIONAL 2^4 (DCCR)	43

4.2.3. ESTUDOS VOLTAMÉTRICOS DE HIDROQUINONA.....	48
4.2.3.1.VOLTAMETRIA CÍCLICA	48
4.2.3.2.VOLTAMETRIA DE PULSO	50
4.2.3.3.CURVA ANALÍTICA, ESTUDO DE REPETIBILIDADE E ANÁLISE DE AMOSTRA	52
5. CONCLUSÃO.....	55
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	56

1. INTRODUÇÃO

A eletroquímica estuda reações de transferência de carga elétrica, que ocorrem devido ao gradiente de potencial eletroquímico. Essa transferência pode ocorrer homogeneamente, em solução, ou heterogeneamente na superfície de um eletrodo. A medição da transferência de carga elétrica é possível, pois muitas espécies químicas têm a capacidade de sofrer reações de oxirredução. As técnicas eletroquímicas podem ser aplicadas em diferentes áreas das ciências, sendo associadas à identificação e determinação de interesse biológico, farmacêutico e industrial (COSTA, 2016).

Os eletrodos de trabalho ou sensores podem reconhecer um ou mais analitos por meio de reações químicas na interface eletrodo-eletrólito. A mudança química resultante será traduzida pelo elemento de transdução em sinal elétrico (COSTA, 2016). Quando há a modificação da superfície dos sensores por materiais biológicos, passa-se a ter um biossensor. Portanto, um biossensor é definido como um dispositivo integrado independente, capaz de provar informações analíticas quantitativas ou semiquantitativas seletivas usando um elemento de reconhecimento biológico (receptor bioquímico) que é mantido em contato espacial direto com um elemento de transdução eletroquímico (THÉVENOT, 2001).

Desde o desenvolvimento do primeiro biossensor, dispositivo que utiliza da especificidade de um componente biológico, em 1962, diversos outros foram construídos utilizando diferentes enzimas e procedimentos de imobilização (OLIVEIRA & VIERA, 2006). O estudo sobre os biossensores cresceu devido a fatores como seletividade, baixo custo relativo de construção e estocagem, potencial para miniaturização, facilidade de automação e construção de equipamentos simples e portáteis para rápidas análises de monitoramento no campo (MELO, 2008).

A detecção realizada pelos biossensores pode ser direta utilizando um ligante não-catalítico como anticorpos, ou indireta em que há utilização de elementos catalíticos, como enzimas. Esses dispositivos ainda podem ser de dois tipos, dependendo da natureza do evento de reconhecimento: de bioafinidade ou bioanalíticos. O primeiro depende da ligação seletiva do analito-alvo ao ligante preso à superfície, como por exemplo, anticorpos. Já o segundo, uma enzima é imobilizada e é utilizada para o reconhecimento do analito-alvo (CALIL & QUEIROZ, 2011).

Por serem econômicos e também por, geralmente, possuírem um tempo de vida superior aos métodos que utilizam enzimas purificadas, há uma tendência na utilização de tecidos de vegetais e/ou extratos brutos no lugar de enzimas purificadas na confecção de biossensores e/ou procedimentos enzimáticos de análise (FATIBELLO & VIEIRA, 2002).

A peroxidase (PER) é uma enzima encontrada em tecidos de vegetais e animais que catalisa a oxidação de alguns substratos pelo peróxido de hidrogênio (H_2O_2), este oxida primeiro a enzima que por sua vez, oxida o substrato. A PER é uma enzima oxidorreductase e termoestável, ou seja, é possível regenerar sua atividade após tratamento térmico. Esta enzima pode ser encontrada em diversas fontes, como tomate, soja, abobrinha, rabanete, nabo, goiaba, jiló e outros. Na literatura é possível encontrar diversos procedimentos utilizando a peroxidase para determinação de peróxido de hidrogênio usando diversos tecidos vegetais (FATIBELLO et al., 2002; BUENO & PEREIRA, 2015). A peroxidase pode ser utilizada, também, na determinação de ácido L-ascórbico e hidroquinona (FATIBELLO & VIEIRA, 2002).

A hidroquinona (1,4 benzenodiol) é uma substância química utilizada em processos como revelador fotográfico, inibidor de polimerização, antioxidante e agente despigmentante. O uso da hidroquinona em cosméticos, como cremes e géis, não provoca reações adversas quando em concentrações de 2 a 5%. Mas, quando utilizado em concentrações superiores e em uso prolongado pode ocasionar irritação ou até mesmo erupções na pele do consumidor. Assim, visando a segurança do consumidor, bem como o controle de qualidade dos produtos, é importante se estabelecer métodos analíticos para a determinação de hidroquinona em diversos produtos farmacêuticos (SAKODINSKAYA et al., 1992; COROMINAS et al., 2004; OLIVEIRA & VIEIRA, 2006).

Diante do exposto, o objetivo desta pesquisa foi desenvolver um biossensor para a determinação de hidroquinona em cremes farmacêuticos, obtendo o extrato bruto do vegetal jiló (*Solanum gilo*) como fonte da enzima peroxidase, posteriormente imobilizada em zeólita, e utilizar a técnica de voltametria de onda quadrada para a etapa de quantificação do analito. Para a otimização dos parâmetros experimentais, tais como pH, concentração da peroxidase, frequência, amplitude de potencial, foi aplicado o método estatístico de delineamento fatorial fracionado na etapa de triagem e o delineamento central composto rotacional para aperfeiçoamento do processo.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1. Biossensores

A palavra “sensor” vem do Latim “sentire”, que significa “identificar”. Segundo Ali e colaboradores (2017), sensores, são dispositivos capazes de registrar uma mudança física, química ou biológica na solução de estudo e convertê-la a um sinal que se pode medir, geralmente potencial ou corrente (ALI et al., 2017).

As duas principais partes que compõem um sensor são o receptor e o transdutor. O primeiro é responsável por receber o estímulo físico, químico ou biológico e transformar essa informação em energia elétrica; e o segundo, de transformar essa energia em um sinal analítico capaz de ser analisado. Existem vários tipos de sensores, dentre eles destacam-se os sensores magnéticos, ópticos e os eletroquímicos. Dentro da subclasse de sensores eletroquímicos existem os biossensores (ALI et al., 2017).

Com o passar dos anos, o conceito de biossensor têm mudado. Primeiro, muitos consideravam um biossensor como um dispositivo que respondia a espécies químicas em amostras biológicas. No entanto, essa definição era bastante genérica e causava certa confusão. Assim, o termo biossensor passou a ser utilizado para sensores químicos em que o sistema de reconhecimento utiliza um mecanismo bioquímico (TURNER et al., 1987; BETTAZZI et al., 2017).

A União internacional da Química Pura e Aplicada (IUPAC, sigla do inglês *International Union of Pure and Applied Chemistry*) fez algumas recomendações quanto a definição, classificação e nomenclatura dos biossensores eletroquímicos: “um biossensor é definido como um dispositivo integrado autônomo, capaz de gerar informações analíticas quantitativas e semiquantitativas usando um elemento biológico de reconhecimento (receptor bioquímico), que é retido em contato direto com o elemento transdutor” (THÉVENOT et al., 2001).

Os biossensores podem ser classificados de acordo com o elemento biológico de reconhecimento, o transdutor físico-químico, o analito e as reações que eles monitoram (TURNER, 2013). Em relação aos princípios de transdução, os biossensores podem ser classificados de acordo com o tipo de transdutor utilizado na análise. Pode ser, por exemplo, um biossensor óptico, de massa, magnético, calorimétrico, piezoelétrico ou eletroquímico (TURNER, 2013).

Devido ao baixo custo, facilidade de aplicação, portabilidade e simplicidade na construção, os biossensores eletroquímicos são os mais utilizados quando se diz respeito à técnica de transdução. Quando monitorada eletroquimicamente, a reação gera um potencial (potenciometria), altera as propriedades de condutividade do meio entre os eletrodos (condutometria) ou gera uma corrente mensurável (voltametria) (RONKAINEN et al., 2010; THÉVENOT et al., 2001; BETTAZZI et al., 2017).

As técnicas voltamétricas envolvem a aplicação de uma diferença de potencial no qual a corrente é monitorada entre o eletrodo de trabalho e o eletrodo auxiliar, assim como o eletrodo de referência monitora o potencial do sistema. Quando o termo “voltametria” é utilizado, é para se referir a técnicas em que um potencial é lido dentro de uma janela de potencial definida. Dentro dos métodos voltamétricos, existem a voltametria de varredura linear, voltametria cíclica, amperometria, voltametria de pulso diferencial, voltametria de onda quadrada e polarografia (RONKAINEN et al., 2010).

Com as técnicas voltamétricas é possível trabalhar com limites de detecção excepcionalmente baixos, o que faz com que elas sejam cada vez mais associadas aos biossensores para diferentes aplicações analíticas. Sendo assim, biossensores voltamétricos têm boa sensibilidade, são confiáveis, de simples montagem e podem realizar análises em uma faixa de concentração diversa sem que haja um pré-tratamento da amostra (CATANANTE et al., 2016).

2.2.Elementos de reconhecimento biológico para imobilização enzimática

O elemento de reconhecimento biológico, ou bioreceptor, usado na construção do biossensor é, geralmente, uma molécula orgânica que detecta um analito específico no meio reacional, enquanto se mantém neutro quanto à resposta de algumas espécies interferentes potenciais. Os bioreceptores típicos para a construção de biossensores são enzimas, anticorpos, microrganismos, ácidos nucleicos e entre outros (Figura 1) (THÉVENOT et al., 2001; ALI et al., 2017).

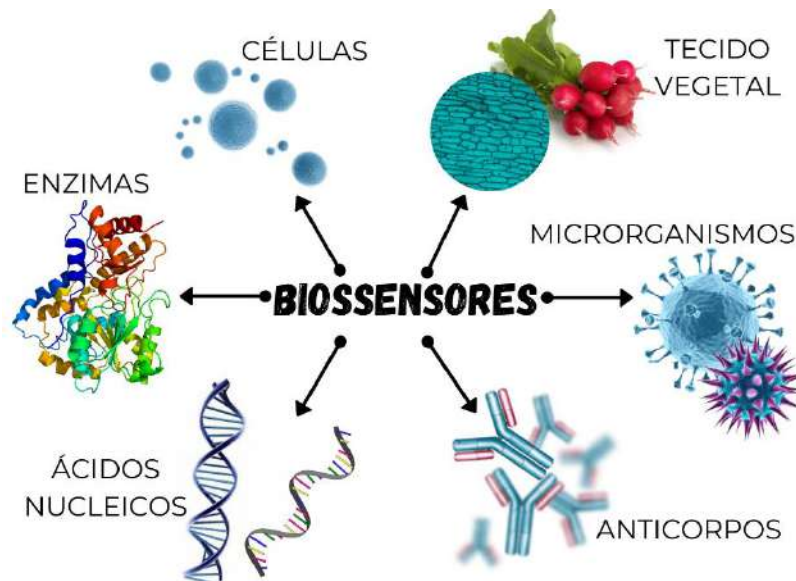


Figura 1: Bioreceptores típicos usados na construção de biossensores. Fonte: Autoria própria.

Para poder utilizar o potencial catalítico das enzimas e melhorar as vantagens dessas proteínas sobre os catalisadores químicos, métodos de imobilização enzimática têm sido estudados para torná-las insolúveis no meio reacional, tais como: encapsulação em membranas poliméricas; confinamento em matrizes poliméricas; adsorção em materiais insolúveis hidrofóbicos ou em resinas de troca iônica; encapsulação; ligação covalente a uma matriz insolúvel ou por reticulação (Figura 2) (FERNANDEZ-FERNANDEZ, 2013; MESQUITA, et al., 2018; SOLEIMANI et al., 2012; JU et al., 2012; SINGH et al., 2014; VIEIRA et al., 2013; CHANG et al., 2013; ZHAO et al., 2013; EHLERT et al., 2010; AI et al., 2014; LANG et al., 2014; CADENA et al., 2010; HOU et al., 2014; YUSDY et al., 2009; SILVA et al., 2014; SUN et al., 2013; KRISHNA et al., 2011).

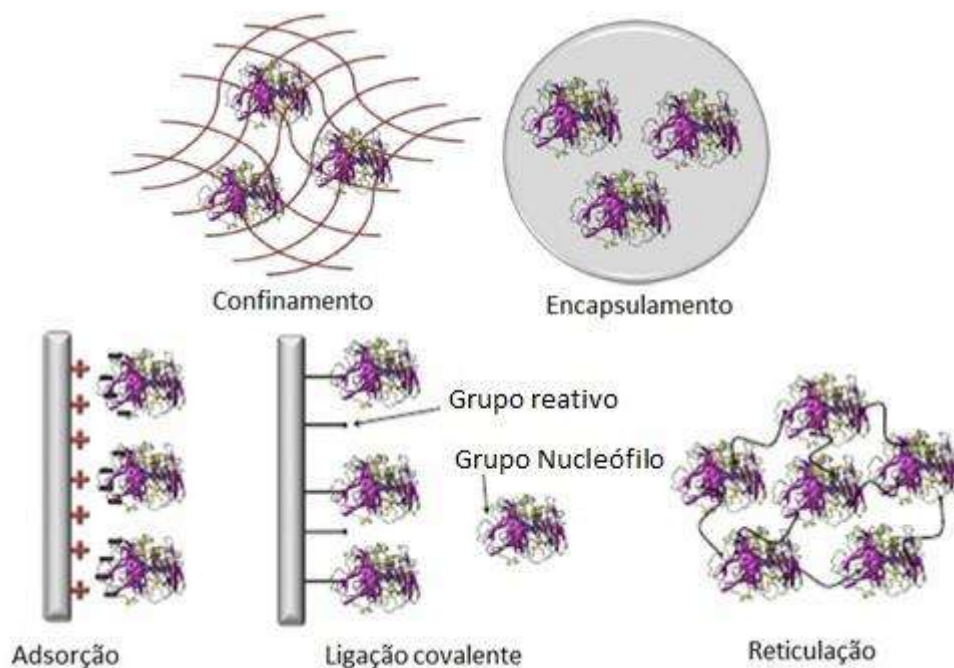


Figura 2: Representação dos métodos de imobilização de enzimas. Fonte: Adaptado de Fernandez-Fernandez, 2013.

Cada método de imobilização tem suas vantagens e suas desvantagens e deve ser eleito levando em conta a natureza da enzima, o transdutor e o método de detecção. É necessário considerar se o objetivo da imobilização seja máxima sensibilidade para o biossensor ou maior estabilidade (SASSOLAS, 2012).

Os biossensores enzimáticos apresentam uma camada de enzima em sua superfície, o que faz com que ele tenha uma maior seletividade e catalise a formação de um produto eletroativo para detecção. Uma vez imobilizados, aumentam a estabilidade dos bioreceptores, reduz custos e, em alguns casos, pode até aumentar a atividade enzimática, melhorando assim o sinal analítico do biossensor desenvolvido (Figura 3).

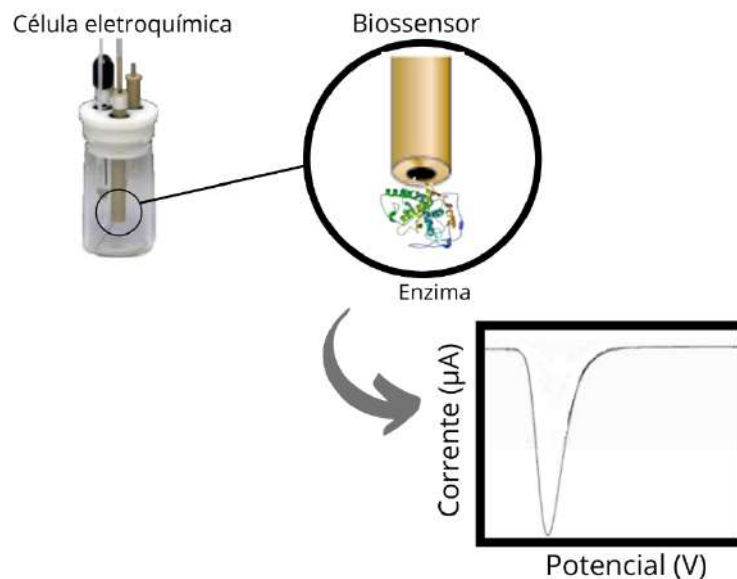


Figura 3: Esquema de representação de um biossensor enzimático genérico apresentando uma camada de enzima em sua superfície. Fonte: Autoria própria.

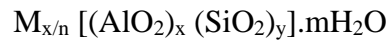
Eletrodos enzimáticos vêm sendo muito estudados, e vários métodos físicos e químicos vêm sendo desenvolvidos para realizar a imobilização enzimática. Tais estudos vêm sendo realizados para que se possa, cada vez mais, melhorar o contato entre a enzima e a superfície sensível do transdutor sem que o sítio ativo da enzima seja bloqueado ou que sua geometria seja alterada de forma drástica (RONKAINEM, et al., 2010).

2.3. Zeólita como suporte para imobilização enzimática

A zeólita é um material que tem propriedades de importante aplicação na imobilização enzimática, devido sua capacidade de performarem com alta eficiência em adsorções. Esta última se dando devido à sua grande superfície interna, as cavidades espaçosas são uma característica da estrutura cristalina das zeólitas (LUZ, 1994).

As zeólitas são minerais naturais e sintéticos que apresentam características comuns. Mais especificamente, são aluminossilicatos hidratados de metais alcalinos ou alcalinos terrosos, estruturados em redes cristalinas tridimensionais, composta por tetraedros da forma TO_4 ($T = Si, Al, B, Ge, Fe, O, Co$) unidos nos vértices através de um átomo de oxigênio (Figura 4). Esses minerais possuem uma estrutura microporosa que faz com que eles tenham uma superfície interna muito grande se comparada à superfície externa (JEWUR et al., 1984; LUZ, 1994; TAGAMI et al., 2001; GRECCO, 2013). Na fórmula TO_4 das zeólitas mais comuns, o T

representa o Si ou o Al. A fórmula química por célula unitária é a seguinte (JEWUR et al., 1984):



Onde:

M = cátion de valência n;

m = número de moléculas de água;

x e y = número de tetraedros por célula unitária.

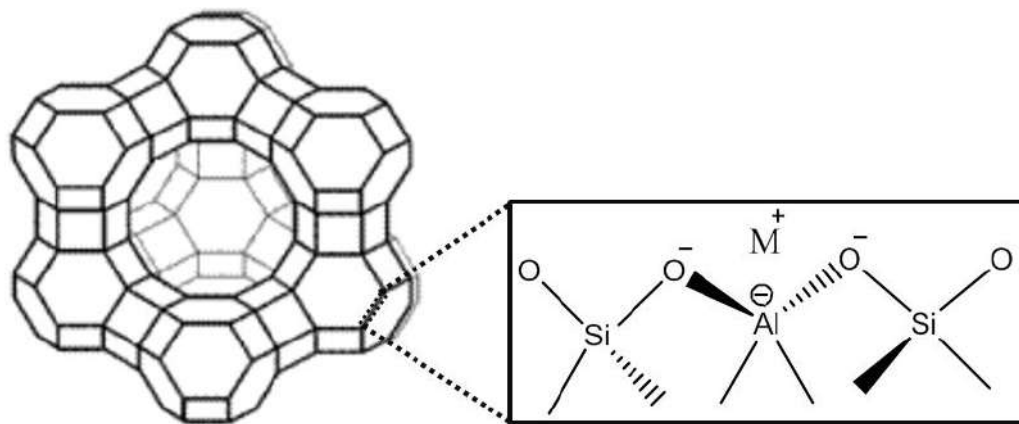


Figura 4: Esquema da estrutura das zeólitas. Devido a carga trivalente do alumínio, os tetraedros AlO_4^- induzem à formação de cargas negativas na estrutura das zeólitas que são neutralizadas por um cátion M^+ (Adaptado de MARTINS; CARDOSO, 2006).

A ocorrência das zeólitas pode ser tanto natural como sintética. As zeólitas naturais podem ocorrer a partir de alterações de vidros vulcânicos, por exemplo. Os fatores que são determinantes para a formação dos diferentes tipos de zeólitas são temperatura, pressão, atividade das espécies iônicas e pressão parcial da água. As zeólitas naturais mais conhecidas e amplamente usadas são; mordenita, clinoptilolita, heulandita, philliosita, erionita e chabazita (LUZ, 1994).

Já as zeólitas sintéticas, podem ser produzidas a partir de soluções aquosas saturadas, e fatores como composição, temperatura e pressão devem ser definidos e pré-determinados. Os dois processos de síntese básicos que são mais utilizados a nível comercial são a formação e cristalização a partir de um hidrogel aluminossilicato, e a cristalização a partir de caulim

calcinado (LUZ, 1994). Neste trabalho, foi utilizada a zeólita NaY, que é sintetizada em meios saturados de sódio. Por isso a denominação “Na” em seu nome, já a letra Y é o nome da zeólita.

2.4. Enzima peroxidase

As enzimas, proteínas que possuem atividade catalítica, dependem somente da sua própria estrutura proteica para realizar tal atividade, ou necessitam de cofatores, que podem ser íons metálicos ou moléculas orgânicas denominadas coenzimas. Algumas enzimas dependem de ambos para realizarem o papel da catálise (LEADLAY et al., 1993; VOET & VOET, 1998; BERG et al., 2001).

Em relação ao grau de especificidade das enzimas pelos substratos, Oliveira e colaboradores (2007) afirmam que existe um alto grau de especificidade, acelerando reações químicas específicas e atuando, em sua maioria, em soluções aquosas e em condições brandas de temperatura e pH (OLIVEIRA et al., 2007).

As enzimas ainda podem ser classificadas em seis grupos: oxidorreduções, transferases, hidrolases, liases, isomerases e ligases. Enzimas como a peroxidase pertencem ao grupo das oxidorreduções (LEHNINGER, 1986; LEADLAY et al., 1993; VOET & VOET, 1998; BERG et al., 2001).

Em 1855, pela primeira vez, foi observada a atividade enzimática das peroxidases por Schönbein. Em 1898, Linossier isolou a enzima do tecido de raiz forte. Em 1920, estudos relacionados à estrutura química, cinética e mecanismo das peroxidases começam a ser desenvolvidos (DUNFORD et al., 1976; VÁMOS-VIGYÁZO, 1981; BRUNETTI & FARIA-OLIVEIRA, 1981; WHITAKER, 1985; ROBINSON, 1991; DUNFORD, 1991; CAMPA, 1991).

A enzima peroxidase possui um sítio ativo constituído de um cofator ferro no seu estado de oxidação 3^+ que se encontra ligado a uma molécula de protoporfirina IX (Heme) e catalisa reações de oxidação de vários substratos doadores de prótons, como: monofenóis, difenóis, polifenóis e aminofenóis na presença de peróxido de hidrogênio. A Figura 5 mostra a estrutura tridimensional da enzima peroxidase e seu sítio ativo (HENRIKSEN, et al., 1999; KUBOTA, et al., 2001; VEITCH, 2004).

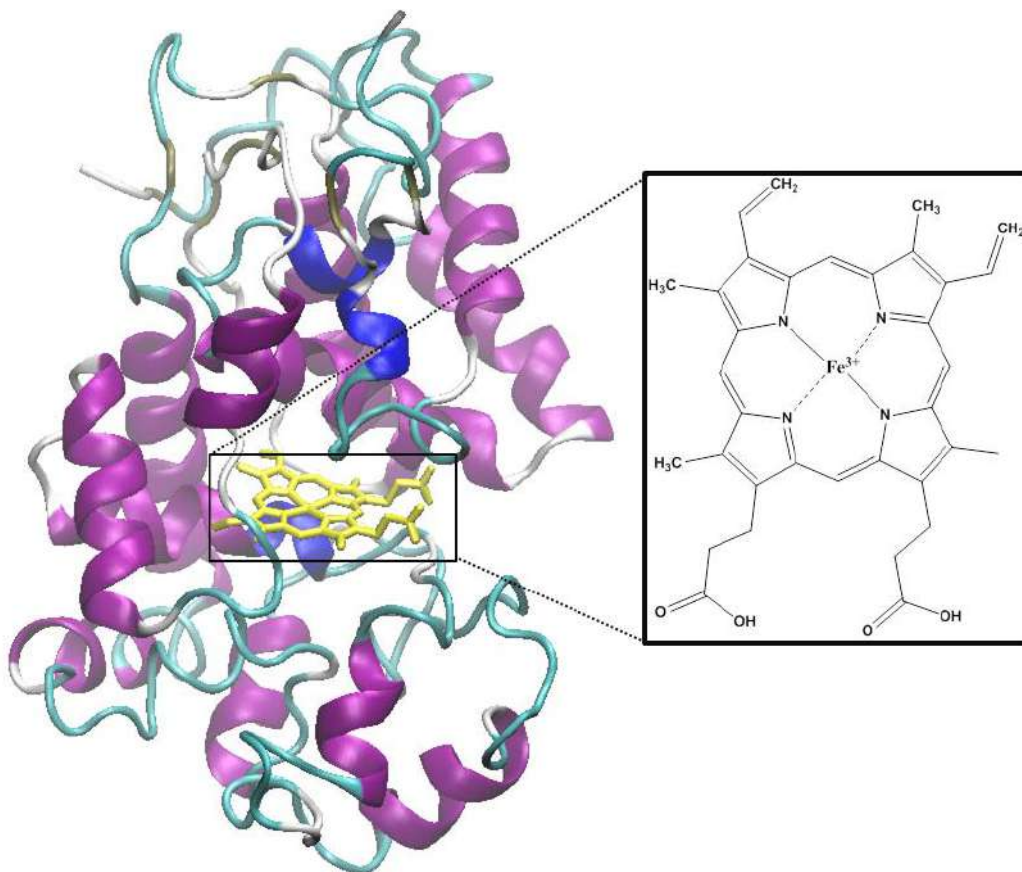


Figura 5: Representação tridimensional da enzima peroxidase com destaque do grupo Heme. Proteína extraída do PDB (6ATJ) Fonte: Autoria própria

Quanto ao ciclo catalítico da peroxidase é esquematizado na Figura 6. O primeiro passo da catálise enzimática ocorre com a oxidação do átomo férrico (Fe^{3+}) da enzima nativa pelo peróxido de hidrogênio (H_2O_2), produzindo o composto I, que consiste no ferro oxiferrila ($\text{Fe}^{4+}=\text{O}$) e o radical protoporfirina (R^\bullet). Por meio de uma transferência de elétrons do substrato (por exemplo, hidroquinona) o Composto I se transforma no Composto II. No último passo do processo, o composto II em mais uma etapa monoeletrônica com a participação do substrato (por exemplo, hidroquinona), é convertido na forma nativa da enzima (KUBOTA, et al., 2001). Em resumo, neste trabalho vamos observar quimicamente que a peroxidase na presença de peróxido de hidrogênio catalisa a oxidação da hidroquinona a p-quinona (FATIBELLO-FILHO, et al., 2002).

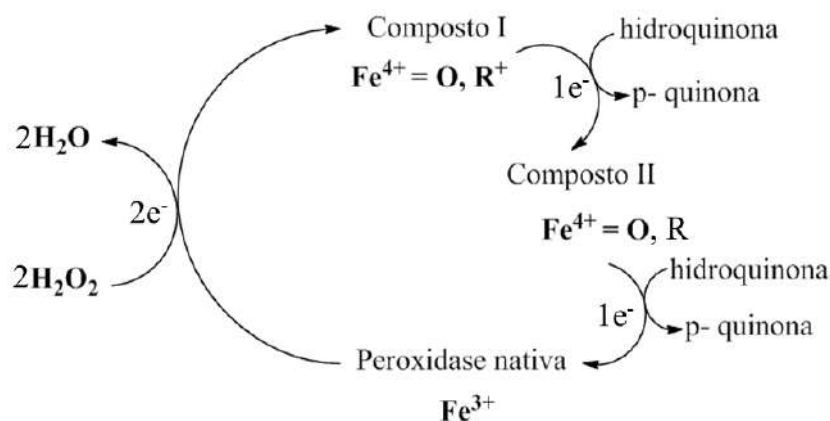


Figura 6: Ciclo catalítico da enzima peroxidase (Adaptado de OLIVEIRA, 2007)

A peroxidase é uma enzima capaz de decompor vários peróxidos (ROOH) para oxidar substratos inorgânicos e orgânicos e está amplamente presente nos reinos animal e vegetal. Apesar da principal fonte de extração de peroxidase ser a raiz forte, estudos quanto a extração, purificação, identificação e propriedades catalíticas dessa enzima vêm sendo realizados em diversos vegetais, como rabanete, abobrinha, nabo, repolho, jiló e entre outros (LEE et al., 1983; MOULDING et al., 1987; LEE et al., 1988; SODA et al., 1991; CIVELLO et al., 1995; BOUEL et al., 2000; HOULSCHUH, 2000; FATIBELLO-FILHO & VIEIRA, 2000; DUARTE-VÁZQUEZ et al., 2001; SANTOS, 2002).

Devido suas propriedades catalíticas, versatilidade de reconhecimento de substratos e termoestabilidade, as peroxidases são largamente utilizadas em processos industriais. Suas áreas de aplicação são, por exemplo, síntese orgânica, remoção de compostos fenólicos em resíduos industriais, imunoenaios enzimáticos e construção e aplicação de biossensores (MILAND et al., 1996; TONG et al., 1997; LOUGHLIN, 2000; FATIBELLO-FILHO & VIEIRA, 2000).

2.5. Hidroquinona

A hidroquinona (1,4 benzenodiol) é uma substância química utilizada em processos como revelador fotográfico, inibidor de polimerização, antioxidante e agente despigmentante. É apresentada em forma de cristais brancos, tem peso molecular de $110,1 \text{ g mol}^{-1}$, ponto de ebulição de 285°C , $\text{pK}_{\text{a}1} = 9,91$, $\text{pK}_{\text{a}2} = 12,04$, densidade relativa de 1,36 ($20^\circ/4^\circ\text{C}$), é solúvel em água, álcool e clorofórmio e possui fórmula molecular $\text{C}_6\text{H}_6\text{O}_2$ (MERK, 2001; OLIVEIRA & VIEIRA, 2006). Essa substância pode ser facilmente oxidada pela exposição ao ar. Tal

facilidade de oxidação é devido ao grupo hidroxila em posição para em sua molécula, como pode ser visto na Figura 7 (GARCÍA, 2004).

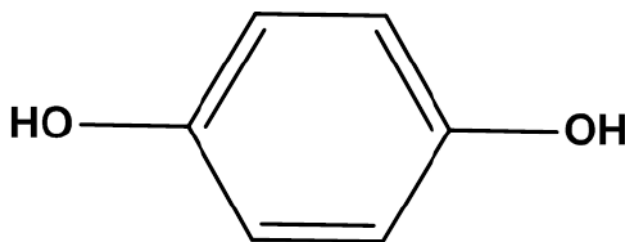


Figura 7: Fórmula estrutural da hidroquinona. Autoria própria.

O uso da hidroquinona em cosméticos, como cremes e géis, não provoca reações adversas quando em concentrações de 2 a 5%, sendo que concentrações de 3 a 4% são as recomendadas para bons resultados para clareamento da pele. Já quando em concentrações superiores a 4% e em uso prolongado, certos efeitos colaterais podem surgir, como coceira, dermatites e eritema, mudanças na coloração da pele e sensibilização da pele (SAKODINSKAYA et al., 1992; COROMINAS et al., 2004).

De acordo com a ANVISA (Agência Nacional Vigilância Sanitária), em 2016, a hidroquinona era autorizada em medicamentos da categoria dos desmelanizantes numa concentração de 4%, estando na forma de creme ou gel dermatológico (BRASIL, 2016). Contudo, segundo a Resolução de Diretoria Colegiada – RDC Nº 529, de 4 de agosto de 2021, a hidroquinona está na lista de substâncias que não podem ser utilizadas em produtos de higiene pessoal, cosméticos e perfumes. Os produtos que foram fabricados de acordo com a Resolução de Diretoria Colegiada – RDC Nº 83, de 17 de junho de 2016, poderão ser comercializados até o final dos seus prazos de validade.

No Canadá, a hidroquinona está na lista de ingredientes proibidos para uso em cosméticos para pele desde 2008. Seu uso é completamente banido na Europa e no Japão (USA, 2009). Em 2006, nos Estados Unidos da América, a FDA (*Food and Drug Administration*) alterou a legislação de 1982, propondo que produtos contendo hidroquinona não deveriam ser disponibilizados (USA, 2006; USA, 2009). A NTP (National Toxicology Program), ainda realiza estudos sobre a hidroquinona e a concentração máxima permitida no país é de 2% (USA, 2009; USA, 2015).

Visando a segurança do consumidor, bem como o controle de qualidade dos produtos, é importante se estabelecer métodos analíticos para a determinação de hidroquinona em diversos

produtos farmacêuticos. Diversos processos são descritos na literatura para realizar tal determinação, entre eles os métodos cromatográficos, espectrofotométricos e eletroanalíticos (FIRTH & RIX, 1986; SAKODINSKAYA et al., 1992; LEE et al., 1993; GAJEWSKA & KASZUBA, 1999; JIA & ZHANG, 2003; OLIVEIRA et al., 2004; LUPETTI et al., 2004; OLIVEIRA et al., 2006).

2.6.Métodos Eletroanalíticos

Os métodos eletroanalíticos oferecem vantagens frente aos métodos analíticos convencionais, pois apresentam baixo limite de detecção, tempo de resposta relativamente rápido, fácil manuseamento e baixo custo (ZAPP et al., 2011). Diversas técnicas são usadas nos estudos eletroanalíticos para o desenvolvimento de biossensores e entre as mais usadas estão a voltametria cíclica, a voltametria de pulso diferencial e a voltametria de onda quadrada.

A voltametria cíclica é muito utilizada para obter informações qualitativas de processos eletroquímicos e é baseada na leitura linear do potencial sobre o tempo. A técnica também permite a rápida obtenção de informações sobre a termodinâmica dos processos redox (PACHECO et al., 2013; PISOSCHI et al., 2020). Com o objetivo de se obter técnicas mais sensíveis, rápidas e com melhor resolução de pico que a técnica de voltametria cíclica, as técnicas de pulso foram desenvolvidas. Dentre as técnicas de pulso, pode-se destacar a voltametria de pulso diferencial e a voltametria de onda quadrada (PACHECO et al., 2013).

A voltametria de pulso diferencial é uma técnica que tem boa detectabilidade e resolução se comparada diretamente com as técnicas de corrente. Nesse tipo de voltametria, pequenos pulsos de potencial padrão são aplicados no eletrodo de trabalho em uma tensão variável linear ou no sentido horário. A corrente é geralmente medida uma vez antes do pulso e no final da aplicação de pulso, diminuindo a contribuição da corrente de carga (PACHECO et al., 2013; PISOSCHI et al., 2020).

A voltametria de onda quadrada é uma técnica mais rápida e sensível que a voltametria de pulso diferencial, devido à amostragem de sinal, que assegura um baixo ruído de fundo. Essa técnica se baseia na aplicação da variação dos potenciais de onda quadrada e de escada, promovendo uma frequência analítica alta (PISOSCHI et al., 2020; SOUZA et al., 2004; CHEN et al., 2011).

2.7. Métodos estatísticos

Em um método analítico, diversas variáveis ou fatores podem influenciar na magnitude e na qualidade do sistema estudado (BEZERRA et al., 2008). Desta forma, métodos analíticos, ao serem desenvolvidos, necessitam de otimização por meio da investigação de variáveis e dos seus níveis. O termo otimização tem sido comumente utilizado em análises químicas, como meio de descobrir quais as condições ideais de um procedimento para produzirem a melhor resposta possível garantindo a este, maior sensibilidade e melhores características analíticas (ARAÚJO et al., 1996; BEZERRA et al., 2008). A otimização de parâmetros experimentais de relevância talvez seja uma das etapas mais críticas de uma pesquisa.

A maioria das vezes, a otimização de variáveis experimentais é realizada por meio de procedimentos que avaliam o efeito de uma variável por vez, ou seja, alteram-se as quantidades ou concentrações de uma variável independente e mantêm todos os outros parâmetros em um nível fixo, tornando-se uma análise univariada, que pode ser extremamente demorada e onerosa no caso de um elevado número de variáveis. De maneira geral, realizar uma análise univariada impede o estabelecimento de ótimos verdadeiros em função da frequência com que as variáveis se apresentam altamente correlacionadas (PERALOTA_ZAMORA et al., 2005; CUNICO et al., 2008) além de desvantagens, tais como o tempo gasto para otimização e a falta de avaliação acerca das interações entre as variáveis que afetam o processo em estudo (CUNICO et al., 2008). A observação dos efeitos de variáveis e suas interações é de extrema importância para entender os processos que estão sendo monitorados em um determinado sistema (PEREIRA-FILHO et al., 2002).

De acordo com Peralta-Zamora et al. (2005), planejamentos experimentais fatoriais permitem avaliar simultaneamente o efeito de um grande número de variáveis a partir de um número reduzido de ensaios experimentais (PERALTA-ZAMORA, et al., 2005). Cunico e colaboradores (2008), corroboram com essa ideia e concluíram que um planejamento fatorial determina quais fatores têm efeitos relevantes na resposta e, também, como o efeito de um fator varia com os níveis dos outros fatores. Além disso, um planejamento fatorial permite estabelecer e quantificar as correlações entre os diferentes fatores e que sem o uso de planejamentos fatoriais de experimentos, importantes interações entre fatores podem não ser detectadas e a otimização máxima do sistema pode levar mais tempo para ser alcançada. Sistemas multivariados, fundamentados em planejamento fatorial de experimentos, permitem viabilizar o reconhecimento de condições de ótimo verdadeiro a partir de um reduzido número

de experimentos (CUNICO et al., 2008). A metodologia de superfícies de resposta (ou RSM, do inglês *Response Surface Methodology*) é uma técnica de otimização baseada em planejamentos fatoriais. São métodos estatísticos aplicados após uma triagem dos fatores importantes, que geralmente é realizada previamente por um planejamento fatorial (DE BARROS et al., 2005). A otimização tem como objetivo melhorar o desempenho de um sistema, de um processo ou de um produto de forma a obter deles o máximo de benefícios possíveis (NOVAES et al., 2017)

De acordo com Barros e colaboradores (2005), as variáveis de processo, tais como pH, temperatura e concentrações de reagentes podem influenciar a resposta de um sistema químico. Alterações nos níveis das variáveis de processo podem afetar o resultado experimental através de seus efeitos principais (efeitos individuais) e de interação com outras variáveis de processo, mas seus níveis podem ser variados de forma independente uns dos outros durante o modelamento, como acontece nos planejamentos fatoriais (DE BARROS et al., 2005).

Por representarem uma abordagem extremamente promissora, os biossensores devem ser estudados e explorados empregando-se sistemas multivariados e aplicando planejamentos fatoriais e metodologia de superfícies de respostas para selecionar variáveis experimentais que influenciem significativamente a resposta analítica e assim otimizar o processo. Ao estudar o efeito e interações das concentrações de diferentes variáveis ou fatores no desenvolvimento de um biossensor existe a possibilidade de encontrar novos agentes bioativos ou componentes biológicos mais eficientes (DE BARROS et al., 2005).

3. METODOLOGIA

3.1. Materiais e instrumentação

O fosfato de sódio monobásico e bibásico usados para o preparo da solução tampão foram adquiridos da Dinâmica Química Contemporânea Ltda[®] (São Paulo/Brasil). O peróxido de hidrogênio foi adquirido pela Alphatec (São Paulo/Brasil). Reagente de biureto (Hidróxido de sódio + sulfato de cobre + tartarato de sódio e potássio adquiridos) da Dinâmica Química Contemporânea Ltda[®] (São Paulo/Brasil). A Albumina de soro bovino e o Guaiacol foram adquiridos da Sigma-Aldrich (Missouri, EUA). Óleo mineral adquirido da Nujol[®] (São Paulo/Brasil). Grafite em pó foi adquirido da Synth (Brasil) e a Zeólita NAY (estrutura MFI) usada neste trabalho foi fornecida pela Zeochem (referência n V1148.4) com uma razão Si / Al de 14. Os agentes protetores (látex, PVP K90 e PVOH) foram doados pelo Programa de Pós-Graduação de Engenharia de Biomateriais da Universidade Federal de Lavras. As formulações farmacêuticas da Hidroquinona (Leviate[®] - lote: 10026) e do creme (EMS Saúde[®] - lote 2J9485) foram adquiridos em drogaria local.

Para o desenvolvimento dos métodos voltamétricos foi utilizado um potenciostato da marca Ivium Vertex acoplado a um computador com o software IviumSoft e uma célula eletroquímica com capacidade de 15 mL composta por um arranjo de três eletrodos. O eletrodo de trabalho foi o de pasta de carbono modificada com o extrato enzimático (carbon paste electrode - CPE) com haste de teflon (7 cm) e um orifício de 0,262 mm de diâmetro e 0,300 mm de profundidade. O eletrodo auxiliar foi o de fio de platina e o eletrodo de referência foi o de Ag|AgCl (KCl sat).

3.2. Obtenção do extrato bruto enzimático de vegetais

Após lavagem e secagem, 25 g do material vegetal (repolho verde, abobrinha, rabanete e jiló) foram picados e homogeneizados em liquidificador com 100 mL de tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ (pH 6,5), contendo 2,5 g de diferentes agentes protetores, tais como Polivinilpirrolidona (PVP K90), látex, cera vegetal de coco e álcool polivinílico (PVOH). O homogenato foi filtrado em quatro camadas de tecido (gaze) e centrifugado a 9.000 rpm durante 20 minutos a 4 °C. A solução sobrenadante foi dividida em diversas alíquotas, armazenadas em refrigerador a 4 °C e usadas como fonte enzimática de peroxidase (LUPETTI et al., 2003).

3.3. Conservação enzimática

Quatro diferentes tipos de materiais foram utilizados nesta etapa do processo: PVP K90, látex e PVOH. Desta forma, testes espectrofotométricos quanto à conservação enzimática foram realizados no decorrer do trabalho. As extrações de repolho verde, abobrinha, rabanete e jiló foram realizadas com o reagente PVP K90. Já os demais reagentes como látex e PVOH, que foram cedidos pelo grupo de pesquisa da Engenharia Florestal, sob coordenação do professor Gustavo Henrique Denzin Tonoli, foram utilizados apenas com o jiló, sendo testadas como novas alternativas (Figura 8).



Figura 8: Extratos enzimáticos de jiló com PVOH e látex.

3.4. Determinação da atividade da enzima peroxidase e proteína total do extrato bruto enzimático

Para a determinação da atividade enzimática total da peroxidase nos extratos brutos enzimáticos, seguindo a metodologia proposta por Fatibello-Filho & Vieira (2000), foi preparada, em um tubo de ensaio, uma solução com 2,7 mL de solução de guaiacol ($0,05 \text{ mol L}^{-1}$); 0,2 mL do extrato enzimático e 0,10 mL de peróxido de hidrogênio ($10 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$), que foi rapidamente transferida para uma cubeta para leitura de absorbância no comprimento de onda de 470 nm. As leituras foram realizadas a temperatura ambiente e em triplicata, sendo a primeira leitura realizada imediatamente após a rápida transferência da solução para a cubeta e

em intervalos de 10 segundos durante um período total de 120 segundos. A atividade total de peroxidase nos extratos dos vegetais foi obtida por meio da Equação 1 (MOCCELINI, 2011).

$$\text{Unidades mL}^{-1} = \frac{\Delta \text{ABS} \times 1000}{\Delta t \times V} \text{ (Equação 1)}$$

No qual unidades mL^{-1} é a unidade de atividade da peroxidase por mL; ΔABS é a variação da absorbância; Δt é a variação do tempo de reação em min; V é o volume de extrato enzimático utilizado no ensaio em mL. Uma unidade de atividade é definida como a quantidade de enzima que causa um aumento de 0,001 unidade por minuto de absorbância para o tetraguaiacol produzido (FATIBELLO-FILHO e VIEIRA, 2002).

A concentração de proteínas total foi determinada por meio do método de biureto (GORNALL et al, 1949), empregando-se albumina de soro bovino como padrão. A atividade específica enzimática ($\text{U } \mu\text{g}^{-1}$ de proteína) pode ser então calculada pela razão da atividade total da enzima (U mL^{-1}) e o teor de proteína total ($\mu\text{g mL}^{-1}$).

3.5. Estudos quanto à técnica analítica voltamétrica

Previamente à otimização da construção do biossensor via planejamento fatorial, foi feito um estudo em relação à técnica voltamétrica a ser utilizada para as análises, sendo as técnicas estudadas a voltametria de pulso diferencial (DPV) e a voltametria de onda quadrada (SWV). Durante esses experimentos voltamétricos, curvas analíticas (de $5,96 \times 10^{-4}$ a $1,77 \times 10^{-3}$ mol L^{-1} de HQ) foram obtidas levando-se em consideração faixa de potencial aplicado de 0,15 até -0,29 V e concentração de peróxido de hidrogênio de $2,0 \times 10^{-3}$ mol L^{-1} , bem como foi utilizado um eletrodo de pasta de carbono modificado com a enzima peroxidase imobilizada previamente em zeólita NaY (1300 U mL^{-1} de enzima + 0,02g de zeólita NaY).

3.6. Construção do biossensor

O biossensor foi construído a partir de uma adaptação da metodologia de Lupetti et al. (2003), visto que a professora orientadora Fabiana Felix, do grupo do Laboratório de Analítica e Eletroanalítica (LAE – DQI/UFLA), já possui experiência no desenvolvimento de sensores e biossensores voltamétricos (FELIX et al., 2006; FELIX e ANGNES, 2018).

Foi aplicado um planejamento experimental fatorial fracionado $2^{(9-4)}$ (resolução IV) para determinar a influência no efeito e interações das diferentes variáveis do biossensor. A Tabela 1 mostra as variáveis independentes estudadas no processo e seus níveis de variação. A resposta para os ensaios do planejamento experimental foi a corrente em relação ao potencial aplicado.

A Tabela 2 mostra a matriz do delineamento experimental fatorial fracionado $2^{(9-4)}$ e os níveis das variáveis estudadas.

Tabela 1 - Variáveis independentes e níveis de variação.

Variáveis Independentes	Unidade	Código	Níveis mínimos	Níveis máximos
Extrato enzimático	U/mL	X ₁	250	2600
Zeólita	g	X ₂	0,01	0,08
Grafite	g	X ₃	0,10	0,40
Óleo Mineral	μL	X ₄	1 gota	3 gotas
pH		X ₅	5,5	7,5
Peróxido de hidrogênio	Mol/L	X ₆	0,0008	0,0040
Frequência	Hz	X ₇	5,0	55,0
Amplitude	mV	X ₈	10	110
Incremento de potencial	mV	X ₉	1	19

*1 gota = 25 μL

Tabela 2: Matriz do delineamento experimental fatorial fracionado $2^{(9-4)}$ e os níveis das variáveis estudadas.

Ensaio	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	X ₅	X ₆	X ₇	X ₈	X ₉
1	250	0,01	0,10	1	5,5	0,0040	55	110	19
2	2600	0,01	0,10	1	5,5	0,0040	5	10	1
3	250	0,08	0,10	1	5,5	0,0008	55	10	1
4	2600	0,08	0,10	1	5,5	0,0008	5	110	19
5	250	0,01	0,40	1	5,5	0,0008	5	110	1
6	2600	0,01	0,40	1	5,5	0,0008	55	10	19
7	250	0,08	0,40	1	5,5	0,0040	5	10	19
8	2600	0,08	0,40	1	5,5	0,0040	55	110	1
9	250	0,01	0,10	3	5,5	0,0008	5	10	19
10	2600	0,01	0,10	3	5,5	0,0008	55	110	1
11	250	0,08	0,10	3	5,5	0,0040	5	110	1
12	2600	0,08	0,10	3	5,5	0,0040	55	10	19
13	250	0,01	0,40	3	5,5	0,0040	55	10	1
14	2600	0,01	0,40	3	5,5	0,0040	5	110	19
15	250	0,08	0,40	3	5,5	0,0008	55	110	19
16	2600	0,08	0,40	3	5,5	0,0008	5	10	1
17	250	0,01	0,10	1	7,5	0,0008	5	10	1
18	2600	0,01	0,10	1	7,5	0,0008	55	110	19

19	250	0,08	0,10	1	7,5	0,0040	5	110	19
20	2600	0,08	0,10	1	7,5	0,0040	55	10	1
21	250	0,01	0,40	1	7,5	0,0040	55	10	19
22	2600	0,01	0,40	1	7,5	0,0040	5	110	1
23	250	0,08	0,40	1	7,5	0,0008	55	110	1
24	2600	0,08	0,40	1	7,5	0,0008	5	10	19
25	250	0,01	0,10	3	7,5	0,0040	55	110	1
26	2600	0,01	0,10	3	7,5	0,0040	5	10	19
27	250	0,08	0,10	3	7,5	0,0008	55	10	19
28	2600	0,08	0,10	3	7,5	0,0008	5	110	1
29	250	0,01	0,40	3	7,5	0,0008	5	110	19
30	2600	0,01	0,40	3	7,5	0,0008	55	10	1
31	250	0,08	0,40	3	7,5	0,0040	5	10	1
32	2600	0,08	0,40	3	7,5	0,0040	55	110	19
33	1425	0,05	0,25	2	6,5	0,0024	30	60	10
34	1425	0,05	0,25	2	6,5	0,0024	30	60	10
35	1425	0,05	0,25	2	6,5	0,0024	30	60	10

Fonte: Autoria própria (2021).

Após verificar a influência e as interações dos valores das variáveis e selecionar as variáveis mais significativas na determinação da produção de corrente proveniente da reação redox de hidroquinona, aplicou-se um delineamento central composto rotacional 2^4 para otimização da determinação da produção de corrente. A Tabela 3 mostra as variáveis selecionadas e seus níveis de variação e a Tabela 4 mostra a matriz do delineamento central composto rotacional 2^4 e os níveis das variáveis estudadas.

Tabela 3 - Variáveis independentes selecionadas e seus níveis de variação.

Variáveis Independentes	Unidade	Código	Níveis mínimos	Níveis máximos
Extrato enzimático	U/mL	X ₁	250	2600
Zeólita	g	X ₂	0,01	0,08
Óleo Mineral	μL	X ₃	1gota	3 gotas
pH		X ₄	5,5	7,5

*1 gota = 25 μL

Tabela 4: Matriz do delineamento central composto rotacional 2^4 e os níveis das variáveis estudadas.

Ensaio	Extrato Enzimático (U/mL)	Zeólita (g)	Óleo Mineral (gotas)	pH
1	1000,0	0,05	2,0	5,5
2	1000,0	0,05	2,0	7,5
3	1000,0	0,05	4,0	5,5
4	1000,0	0,05	4,0	7,5
5	1000,0	0,10	2,0	5,5
6	1000,0	0,10	2,0	7,5
7	1000,0	0,10	4,0	5,5
8	1000,0	0,10	4,0	7,5
9	2600,0	0,05	2,0	5,5
10	2600,0	0,05	2,0	7,5
11	2600,0	0,05	4,0	5,5
12	2600,0	0,05	4,0	7,5
13	2600,0	0,10	2,0	5,5
14	2600,0	0,10	2,0	7,5
15	2600,0	0,10	4,0	5,5
16	2600,0	0,10	4,0	7,5
17	200,0	0,075	3,0	6,5
18	3400,0	0,075	3,0	6,5
19	1800,0	0,03	3,0	6,5
20	1800,0	0,13	3,0	6,5
21	1800,0	0,075	1,0	6,5
22	1800,0	0,075	5,0	6,5
23	1800,0	0,075	3,0	4,5
24	1800,0	0,075	3,0	8,5
25	1800,0	0,075	3,0	6,5
26	1800,0	0,075	3,0	6,5

Fonte: Autoria própria (2021).

Além das variáveis independentes para a construção do biossensor foram utilizados valores fixos de pó de grafite (0,10g), peróxido de hidrogênio ($0,0008 \text{ mol L}^{-1}$), frequência (5 Hz), amplitude (10 mV) e incremento de potencial (1 Hz).

Primeiramente, foi feita a imobilização da enzima utilizando a zeólita NaY. As quantidades de zeólita e de extrato enzimático de cada ensaio foram colocadas em contato durante 48 horas. Passado esse período, foi feita a lavagem dessa mistura com tampão fosfato 0,1 mol/L a pH 6,5, descartando o sobrenadante. Por fim, a mistura foi deixada para secar durante um período entre 24 e 48 horas. Após esse processo, foram homogeneizadas as quantidades de pó de grafite e da enzima imobilizada de acordo com a matriz do delineamento experimental. Após a homogeneização da pasta de carbono, a mesma foi inserida no eletrodo de trabalho.

3.7.Determinação de hidroquinona em cremes farmacêuticos

Para avaliar o desempenho do biossensor, a concentração de hidroquinona foi determinada em creme farmacêutico comprado em farmácia local da cidade de Lavras (MG). Todos os experimentos foram realizados em temperatura ambiente em tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹, solução utilizada como eletrólito durante os experimentos voltamétricos.

O preparo da amostra foi feito seguindo metodologia adaptada proposta por Vieira & Fatibello-Filho (2000). Foi pesada uma quantidade de 1,5 g de amostra de creme farmacêutico, que foi dissolvida em 40 mL de tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ e mantida em agitação até a dissolução completa. Após esse processo, o volume foi ajustado com a mesma solução tampão em um balão volumétrico de 50 mL.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Atividade da enzima peroxidase e proteína total no extrato bruto enzimático

É possível observar, a partir dos resultados de absorvância da Tabela 5, que há a presença da enzima peroxidase em todos os extratos brutos vegetais (repolho verde, abobrinha, rabanete e jiló). Sabe-se que a atividade catalítica dessa enzima em tecidos vegetais depende de alguns fatores, como o local do plantio, período, estado de amadurecimento, ente outros (FATIBELLO-FILHO e VIEIRA, 2002).

Tabela 5: Resultados, em absorvância, da atividade enzimática nos extratos brutos dos vegetais em diferentes materiais para conservação enzimática

Tempo (s)	Rabanete /PVP K90	Repolho /PVP K90	Abobrinha /PVP K90	Jiló/PVOH	Jiló /Látex	Jiló/PVP K90
0	0,017	0,081	0,03	0,122	0,276	0,084
10	0,032	0,099	0,066	0,339	0,513	0,254
20	0,044	0,111	0,117	0,485	0,705	0,396
30	0,056	0,135	0,176	0,646	0,863	0,533
40	0,07	0,16	0,239	0,783	0,971	0,656
50	0,085	0,182	0,319	0,899	1,059	0,759
60	0,101	0,208	0,384	0,996	1,102	0,840
70	0,115	0,23	0,457	1,076	1,137	0,923
80	0,129	0,258	0,519	1,149	1,06	0,973
90	0,145	0,287	0,586	1,195	1,187	1,013
100	0,158	0,313	0,642	1,217	1,189	1,041
110	0,174	0,336	0,695	1,245	1,202	1,062
120	0,189	0,361	0,744	1,257	1,207	1,078

Os resultados apresentados, a partir de experimentos realizados em comprimento de onda máximo de 470 nm, são provenientes do mecanismo de formação do produto da reação entre guaiacol, peroxidase e H₂O₂, proposto por Doerge et al. (1997). A peroxidase, na presença de guaiacol e peróxido de hidrogênio, catalisa a reação levando a formação do tetraguaiacol. Detalhadamente, observa-se que o radical fenoxil derivado de guaiacol sofre substituição na posição para de guaiacol. Após o rearranjo do intermediário, o produto 3,3'-dimetoxi-4, 4'-

dihidroxibifenil é formado. A 3,3'-dimetoxi-4, 4'-bifenoquinona colorida é formada como resultado da oxidação do 3,3'-dimetoxi-4, 4'-dihidroxibifenil (Figura 9).

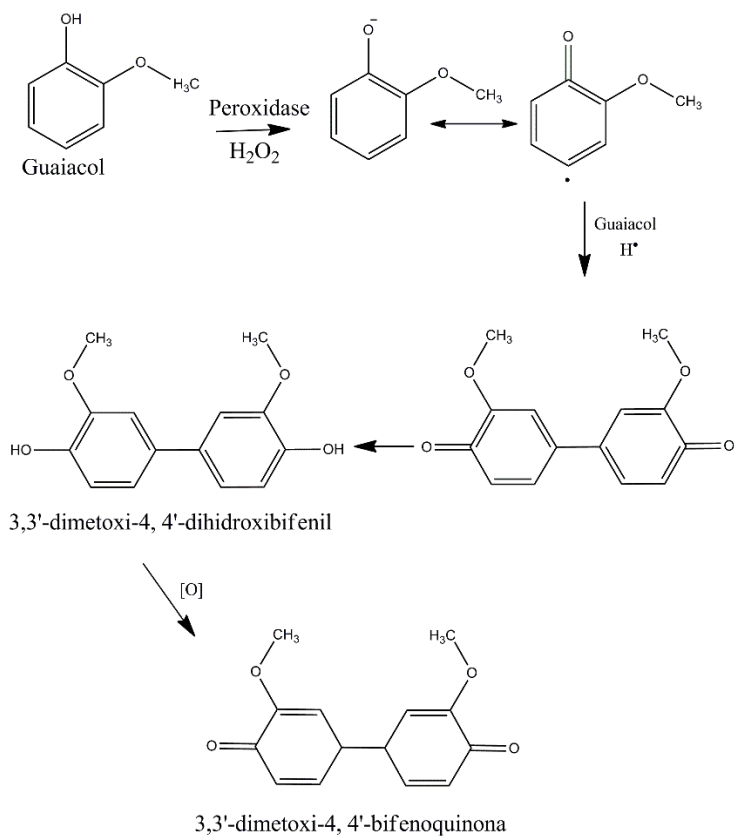


Figura 9: Mecanismo de formação do produto da reação entre guaiacol, peroxidase e H_2O_2 proposto por Doerge et al. (1997).

Durante a realização do experimento, foram tiradas fotos em que é possível visualizar a ocorrência da reação no decorrer do tempo (Figura 10)

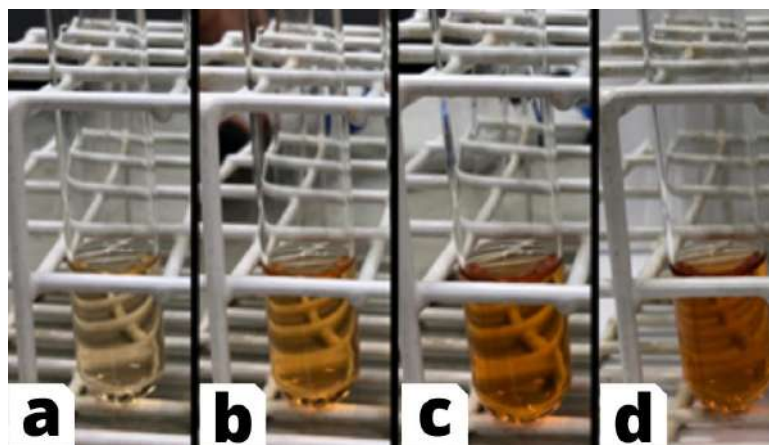


Figura 10: Reação de oxidação do guaiacol realizada para determinação de atividade enzimática total no extrato de repolho. a) Tempo: 10 segundos. b) Tempo: 50 segundos. c) Tempo: 100 segundos. d) Tempo: 120 segundos.

A concentração de proteínas total foi determinada por meio do método de biureto (GORNALL et al, 1949), empregando-se albumina de soro bovino como padrão.

A partir dos valores de absorvância das soluções padrão de albumina bovina, foi possível obter uma curva padrão, conforme Figura 11.

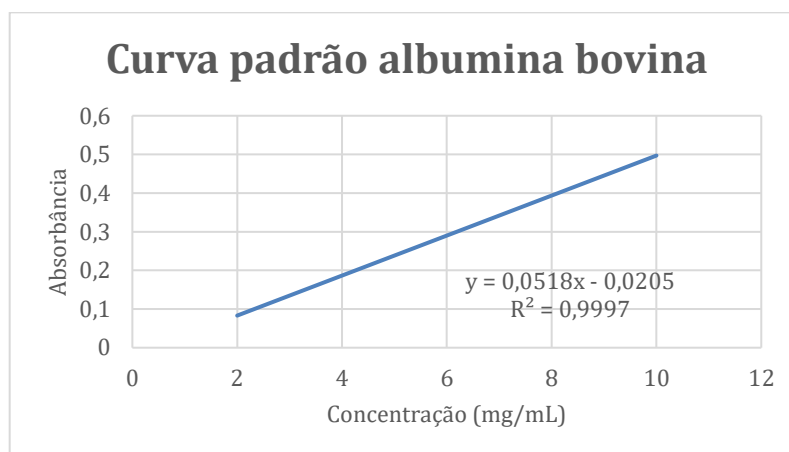


Figura 11: Curva padrão de albumina bovina.

Através dos dados de regressão linear foi possível determinar o teor de proteínas totais presentes nas amostras dos extratos enzimáticos produzidos a partir da Equação 2.

$$C = \frac{\text{Absorvância}}{\text{Coeficiente angular}} \text{ (Equação 2)}$$

Os resultados de absorção para cada extrato enzimático estão apresentados na Tabela 6, bem como os teores de proteínas totais, calculados a partir da curva padrão de albumina.

Tabela 6: Resultados do teor de proteína total nos extratos brutos dos vegetais em diferentes materiais para conservação enzimática (absorbância e mg mL⁻¹)

Vegetal/Agente protetor	Teor de proteínas totais (Absorbância)	Teor de proteínas totais (mg mL ⁻¹)
Jiló/Látex	0,034	0,6564
Jiló/PVOH	0,023	0,4440
Jiló/PVP K90	0,042	0,8108
Rabanete/PVP K90	0,005	0,0965
Abobrinha/PVP K90	0,010	0,1930
Repolho/PVP K90	0,003	0,0579

A atividade total de peroxidase nos extratos brutos dos vegetais foi obtida por meio da Equação 1 e são apresentadas na Tabela 7, bem como os valores de atividade específica enzimática (U µg⁻¹ de proteína), calculada pela razão da atividade total da enzima (U mL⁻¹) e o teor de proteína total (µg mL⁻¹).

Tabela 7: Resultados médios de atividade enzimática total (U mL⁻¹) e atividade enzimática específica (U.mg⁻¹) nos extratos enzimáticos brutos dos vegetais.

Amostras	Atividade Enzimática Total (U.mL ⁻¹)	Atividade Específica (U.mg ⁻¹ de proteína)
Rabanete/PVP K90	430,0	4454,6
Repolho/PVP K90	700,0	12087,7
Abobrinha/PVP K90	1785,0	9246,3
Jiló/PVP K90	2484,2	3063,8
Jiló/Látex	2327,5	3546,0
Jiló/PVOH	2837,5	6390,6

É possível observar que, a partir dos resultados apresentados na Tabela 7, há a presença da enzima peroxidase em todos os extratos brutos vegetais (repolho verde, abobrinha, rabanete e jiló) utilizados neste experimento.

Os resultados da atividade enzimática total no extrato bruto enzimático de jiló foram os melhores em comparação com os demais vegetais utilizados neste experimento, assim como é possível verificar com os dados da literatura ($4960,0 \text{ U mL}^{-1}$) de que o jiló é uma opção vantajosa como fonte de peroxidase (OLIVEIRA, 2017). Dentre os diferentes polímeros testados com os extratos brutos enzimáticos de jiló, o que obteve melhor resultado neste trabalho foi o extrato contendo jiló e PVOH, com valor de $2837,5 \text{ U mL}^{-1}$; seguido dos extratos de jiló com PVP K90 ($2484,2 \text{ U mL}^{-1}$) e com látex ($2327,5 \text{ U mL}^{-1}$). Portanto, o polímero PVOH é uma alternativa viável como agente protetor durante a obtenção do extrato bruto enzimático do jiló (vegetal com maior quantidade de peroxidase conforme dados de atividade enzimática total).

O extrato bruto enzimático do repolho obteve um desempenho mediano se comparado ao valor encontrado na literatura ($3175,0 \text{ U mL}^{-1}$), com uma diferença em $2475,0 \text{ U mL}^{-1}$ quando comparado ao valor de referência (HAAS et al., 2019). O mesmo desempenho mediano é percebido no extrato bruto enzimático do rabanete, com resultado de $430,0 \text{ U mL}^{-1}$, ocasionando uma diferença em $2951,0 \text{ U mL}^{-1}$ em relação ao valor da literatura ($3381,0 \text{ U mL}^{-1}$). Por fim, o extrato enzimático de abobrinha foi o extrato vegetal com o menor desempenho constatado quando comparado ao valor da literatura ($6726,0 \text{ U mL}^{-1}$) (LUPETTI et al., 2003).

Além de ter sido possível calcular a atividade enzimática total, no qual refere-se à eficiência da peroxidase no extrato bruto vegetal, também foi possível realizar os cálculos da atividade enzimática específica para todos os extratos brutos enzimáticos vegetais empregados nesta pesquisa com o objetivo de verificar o grau de pureza da enzima. Pode-se perceber com os dados da Tabela 7 que o melhor valor de atividade específica (U mg^{-1} de proteína) foi para o extrato de repolho, com valor de $12087,7 \text{ U mg}^{-1}$; seguido dos extratos brutos enzimáticos de abobrinha ($9246,3 \text{ U mg}^{-1}$), jiló com PVOH ($6390,6 \text{ U mg}^{-1}$), rabanete ($4454,6 \text{ U mg}^{-1}$), jiló com látex ($3546,0 \text{ U mg}^{-1}$) e jiló com PVP K90 ($3063,8 \text{ U mg}^{-1}$).

O valor obtido de atividade enzimática específica para o extrato bruto enzimático de abobrinha está próximo do esperado quando comparados com o valor da literatura, de $13700,00 \text{ U mg}^{-1}$ de proteína, estando menor em $4453,7 \text{ U mg}^{-1}$ de proteína. Já o extrato enzimático de rabanete encontra-se com valor de atividade enzimática específica com $5745,4 \text{ U mg}^{-1}$ de proteína menor do valor encontrado na literatura ($10200,00 \text{ U mg}^{-1}$ de proteína). O extrato enzimático de repolho verde chegou a um valor com $17112,3 \text{ U mg}^{-1}$ de proteína, valor este

menor do que aquele encontrado na literatura (29200,00 U mg⁻¹ de proteína) (LUPETTI et al., 2003; FUJITA et al, 1995).

O extrato bruto enzimático de jiló também está com valores de atividade enzimática específica diferente daquele descrito na literatura. As diferenças em U mg⁻¹ de extrato de jiló com PVOH, jiló com látex e jiló com PVP K90 quando comparados com o valor da literatura (20840,00 U mg⁻¹) são de 14449,4 U mg⁻¹; 17294,0 U mg⁻¹ e 17776,2 U mg⁻¹ respectivamente (OLIVEIRA, 2017). Tais diferenças podem ter ocorrido devido às condições de plantio e colheita do vegetal, a região de cultivo, a qualidade de estoque, a maturação do jiló, e entre outros fatores externos.

Embora a atividade enzimática específica, ou seja, a pureza do repolho seja melhor, neste trabalho optou-se por priorizar o melhor resultado de atividade enzimática total dos extratos. Portanto, o extrato enzimático proveniente do jiló foi escolhido para este estudo.

Além do valor calculado de atividade enzimática através de experimentos espectrofotométricos, é possível observar tal constatação nas respostas analíticas dos experimentos aplicando a voltametria de pulso diferencial (DPV) para o estudo do melhor sinal de corrente catódica entre os agentes protetores testados (látex, PVP K90 e PVOH), como observado na Figura 12.

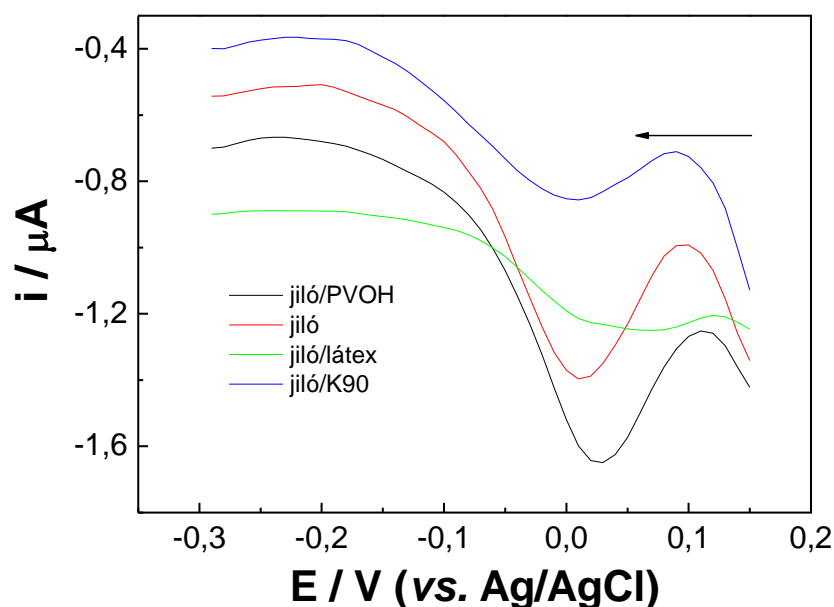


Figura 12: Estudos com voltametria de pulso diferencial quanto à atuação dos agentes protetores para soluções de HQ $4,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ e H₂O₂ $2,0 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹ em tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹.

O perfil voltamétrico do jiló sem agente protetor ficou similar ao perfil do jiló com PVOH, enquanto que os demais voltamogramas de jiló com látex e PVP K90 ficaram mais distintos, provavelmente por uma ação isolante desses agentes protetores.

O melhor sinal de corrente catódica produzida no estudo eletroquímico dos agentes protetores foi aquele proveniente do extrato enzimático de jiló e PVOH, sendo o maior valor de corrente de redução em comparação com os demais protetores como destacado na Figura 12. Sendo assim, o PVOH é uma nova alternativa para atuar como agente protetor enzimático.

4.2 Biossensor

4.2.1 Resultados do planejamento experimental fatorial fracionado $2^{(9-4)}$

Na Figura 13, é apresentado o gráfico de Pareto dos efeitos em $p \leq 0,05$ na detecção de corrente. Todos os valores que se localizam à direita da linha tracejada, foram estatisticamente significativos ($p \leq 0,05$).

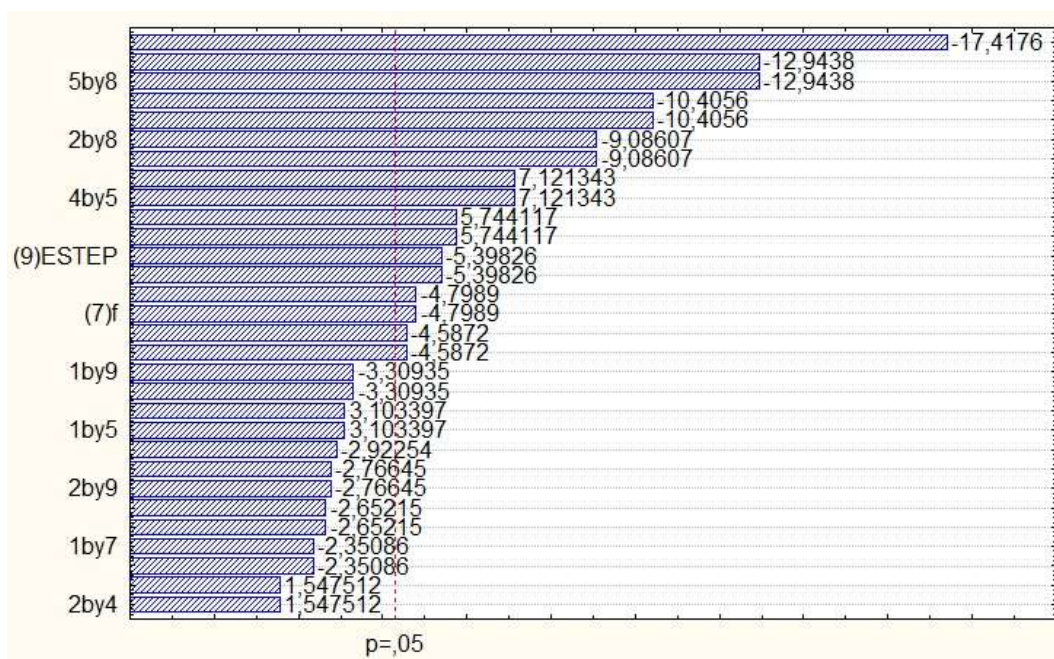


Figura 13: Gráfico de Pareto dos efeitos em $p \leq 0,05$ na produção de corrente. E *step*: incremento de potencial.

Analisando o gráfico de Pareto (Figura 9), observa-se que a interação entre as variáveis óleo mineral (X_4) e pH (X_5) tiveram efeito positivo mais relevante (7,121243) seguido da

interação entre as variáveis extrato enzimático (X_1) e zeólita (X_2) (5,744117) sendo ambas estatisticamente significativas ($p \leq 0,05$). O pH (X_5) apresentou um efeito negativo mais relevante (-17,4176) que a interação entre as variáveis pH (X_5) e amplitude (X_8) (-12,9438), seguido da interação das variáveis zeólita (X_2) e pH (X_5) (-10,4056) e da interação das variáveis zeólita (X_2) e amplitude (X_8) (-9,08607), sendo esses efeitos negativos estatisticamente significativos ($p \leq 0,05$). O efeito negativo das variáveis independentes e suas interações indicam que um aumento nas suas concentrações, provocaria uma diminuição da detecção de corrente e uma diminuição das concentrações destes parâmetros dentro da faixa estudada, incrementaria a detecção de corrente.

Na Tabela 8 observam-se as estimativas dos efeitos de cada variável, suas interações e a significância ($p \leq 0,05$). O coeficiente de determinação (R^2) foi de 0,9898 o que indica uma excelente relação dos dados experimentais com a curva estabelecida pelo modelo matemático, ou seja, somente 1,02% da variação da falta de detecção da corrente não pode ser explicado pelos parâmetros estudados, existindo outros parâmetros que poderiam ser importantes para conseguir uma detecção de corrente.

A detecção de corrente pode ser influenciada por fatores tais como a velocidade das espécies ao se movem do seio da solução para a superfície do eletrodo (transporte de massa) e a velocidade que os elétrons são transferidos do eletrodo para a espécie em solução e vice-versa (PACHECO et al., 2013).

Tabela 8: Estimativas dos efeitos de cada variável, suas interações e significância ($p \leq 0,05$)

	Variável	Efeito	P
1	Extrato Enzimático	0,000004	0,090029
2	Zeólita	-0,000015	0,009110*
3	Grafite	-0,000006	0,044383*
4	Óleo Mineral	0,000010	0,019154*
5	pH	-0,000025	0,003280*
6	Peróxido de hidrogênio	-0,000004	0,117610
7	Frequência	-0,000007	0,040785*
8	Amplitude	-0,000018	0,005916*
9	Incremento de potencial	-0,000008	0,032645*
Interações			
	1 e 2	0,000008	0,028996*
	1 e 3	-0,000004	0,109598
	1 e 4	-0,000013	0,011897*

1 e 5	0,000004	0,090029*
1 e 6	-0,000004	0,099851*
1 e 7	-0,000003	0,143103
1 e 8	0,000002	0,261816
1 e 9	-0,000005	0,080445*
2 e 3	-0,000005	0,080445*
2 e 4	0,000002	0,261816
2 e 5	-0,000015	0,009110*
2 e 8	-0,000013	0,011897*
2 e 9	-0,000004	0,109598
3 e 4	-0,000003	0,143103
3 e 5	-0,000006	0,044383*
3 e 9	0,000008	0,028996*
4 e 5	0,000010	0,019154*
5 e 6	-0,000004	0,117610
5 e 7	-0,000007	0,040785*
5 e 8	-0,000018	0,005916*
5 e 9	-0,000008	0,032645*

Números seguidos de asterisco (*) são estatisticamente significativos ao nível de 95% de confiança ($p \leq 0,05$). Fonte: Autoria própria (2021).

Os resultados de valor de corrente do planejamento experimental fatorial fracionado $2^{(9-4)}$ (resolução IV) para determinar a influência no efeito e interações das diferentes variáveis na construção do biossensor para detecção de corrente nas diferentes condições experimentais estão descritos na Tabela 9.

Tabela 9: Resultados do planejamento experimental fatorial fracionado $2^{(9-4)}$ na produção de corrente (microA) em diferentes condições experimentais

Ensaio	Variáveis Independentes									Variável Dependente
	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	X ₅	X ₆	X ₇	X ₈	X ₉	Corrente (A)
1	250	0,01	0,10	1	5,5	0,0040	55	110	19	0
2	2600	0,01	0,10	1	5,5	0,0040	5	10	1	0
3	250	0,08	0,10	1	5,5	0,0008	55	10	1	0
4	2600	0,08	0,10	1	5,5	0,0008	5	110	19	0
5	250	0,01	0,40	1	5,5	0,0008	5	110	1	0
6	2600	0,01	0,40	1	5,5	0,0008	55	10	19	0

7	250	0,08	0,40	1	5,5	0,0040	5	10	19	0
8	2600	0,08	0,40	1	5,5	0,0040	55	110	1	0
9	250	0,01	0,10	3	5,5	0,0008	5	10	19	0
10	2600	0,01	0,10	3	5,5	0,0008	55	110	1	0
11	250	0,08	0,10	3	5,5	0,0040	5	110	1	0
12	2600	0,08	0,10	3	5,5	0,0040	55	10	19	0
13	250	0,01	0,40	3	5,5	0,0040	55	10	1	0
14	2600	0,01	0,40	3	5,5	0,0040	5	110	19	0
15	250	0,08	0,40	3	5,5	0,0008	55	110	19	0
16	2600	0,08	0,40	3	5,5	0,0008	5	10	1	0
17	250	0,01	0,10	1	7,5	0,0008	5	10	1	0
18	2600	0,01	0,10	1	7,5	0,0008	55	110	19	-3,10x10 ⁻⁰⁵
19	250	0,08	0,10	1	7,5	0,0040	5	110	19	-9,15x10 ⁻⁰⁵
20	2600	0,08	0,10	1	7,5	0,0040	55	10	1	-3,21 x10 ⁻⁰⁶
21	250	0,01	0,40	1	7,5	0,0040	55	10	19	-1,72x10 ⁻⁰⁵
22	2600	0,01	0,40	1	7,5	0,0040	5	110	1	-2,28x10 ⁻⁰⁵
23	250	0,08	0,40	1	7,5	0,0008	55	110	1	-9,84x10 ⁻⁰⁵
24	2600	0,08	0,40	1	7,5	0,0008	5	10	19	-1,26x10 ⁻⁰⁵
25	250	0,01	0,10	3	7,5	0,0040	55	110	1	-1,30x10 ⁻⁰⁶
26	2600	0,01	0,10	3	7,5	0,0040	5	10	19	0
27	250	0,08	0,10	3	7,5	0,0008	55	10	19	-1,26x10 ⁻⁰⁵
28	2600	0,08	0,10	3	7,5	0,0008	5	110	1	-5,00x10 ⁻⁰⁶
29	250	0,01	0,40	3	7,5	0,0008	5	110	19	-6,18x10 ⁻⁰⁶
30	2600	0,01	0,40	3	7,5	0,0008	55	10	1	-6,23x10 ⁻⁰⁷
31	250	0,08	0,40	3	7,5	0,0040	5	10	1	-4,21x10 ⁻⁰⁶
32	2600	0,08	0,40	3	7,5	0,0040	55	110	19	-8,61x10 ⁻⁰⁵
33	1425	0,05	0,25	2	6,5	0,0024	30	60	10	-2,16x10 ⁻⁰⁵
34	1425	0,05	0,25	2	6,5	0,0024	30	60	10	-1,60x10 ⁻⁰⁵
35	1425	0,05	0,25	2	6,5	0,0024	30	60	10	-1,39x10 ⁻⁰⁵

extrato enzimático (X₁), zeólita (X₂), grafite (X₃), óleo mineral (Nujol®) (X₄), pH (X₅), peróxido de hidrogênio (X₆), e os parâmetros da técnica de voltametria de onda quadrada: frequência (X₇), amplitude (X₈) e incremento de potencial (X₉). Fonte: Autoria própria (2021).

Levando em consideração as condições experimentais, os resultados apresentados na Tabela 8 mostraram que a detecção de corrente (A) nos experimentos variou de -6,23x10⁻⁰⁷ a -1,26x10⁻⁰⁵ A, ressaltando a aplicabilidade do biossensor em detectar corrente (A). A condição que pareceu mais favorável para detectar a corrente (A), foi no experimento 23, que produziu -

$9,84 \times 10^{-05}$ de corrente (A) e a condição que pareceu menos favorável para detectar a corrente (μA), foi no experimento 30, com $-6,23 \times 10^{-07}$ de corrente (A).

De acordo com os resultados observados na Tabela 8, a diferença entre os experimentos 23 e 30 está representada pela modificação da quantidade de extrato enzimático (X_1), de zeólita (X_2) e de óleo mineral (X_4), além de amplitude (X_8).

Desta forma, a diferença observada na resposta dos experimentos 23 e 30 ($-9,84 \times 10^{-05} - (-6,23 \times 10^{-07}) = -9,77 \times 10^{-05}$ A) indicou que a detecção de corrente aumentou quando a quantidade de extrato enzimático (X_1) e de zeólita (X_2), foi modificada do nível mínimo para o nível máximo e quando quantidade de óleo mineral (X_4) foi modificada de um nível máximo para o nível mínimo, e o valor de amplitude (X_8) indo do nível mínimo para o nível máximo. A influência do óleo vegetal na resposta de corrente pode ser devido ao seu efeito isolante, assim como o efeito do valor do pH do meio pode estar ligado com a desnaturação da enzima.

Assim, levando em consideração a significância das variáveis estudadas, bem como os resultados de corrente detectada, as variáveis selecionadas para otimização do processo foram o extrato enzimático (X_1), zeólita (X_2), óleo mineral (X_4) e pH (X_5).

4.2.2 Resultados do delineamento central composto rotacional 2^4 (DCCR)

Na Figura 14, é apresentado o gráfico de Pareto dos efeitos em $p \leq 0,05$ na produção de corrente. Todos os valores que se localizam à direita da linha tracejada, foram estatisticamente significativos ($p \leq 0,05$).

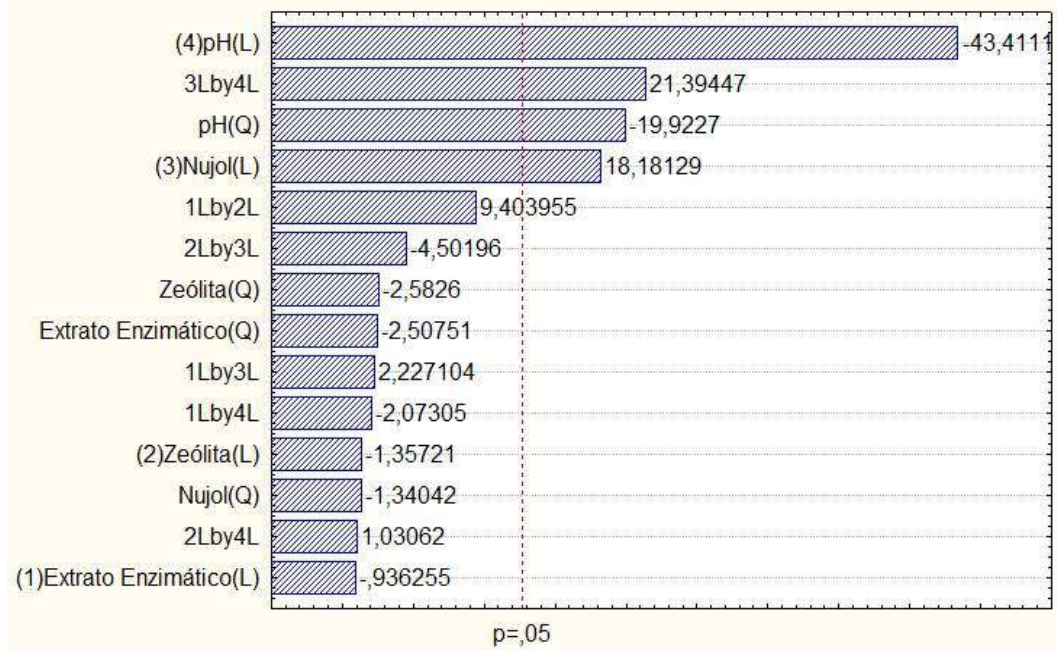
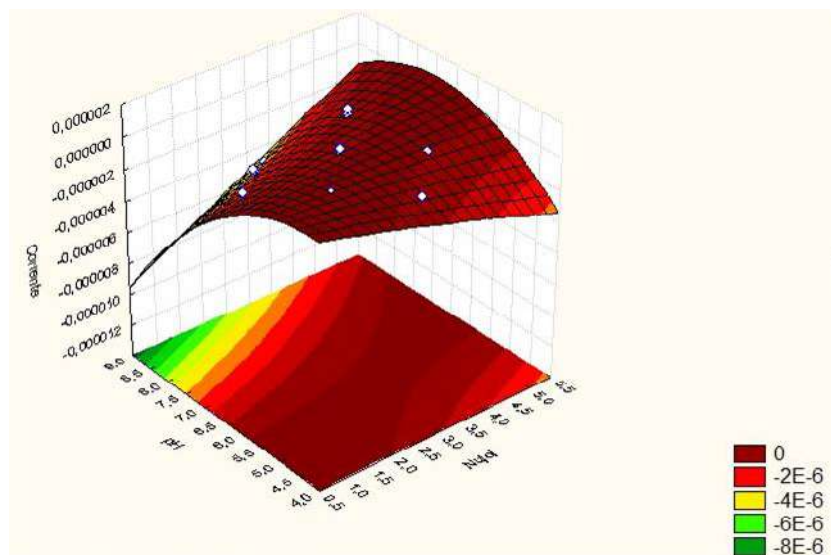


Figura 14. Gráfico de Pareto dos efeitos em $p \leq 0,05$ na produção de corrente

Analisando o gráfico de Pareto (Figura 14) e os gráficos de superfície e de curva de nível (Figura 15) dos efeitos das variáveis independentes na resposta voltamétrica, verifica-se que a interação entre o óleo mineral (Nujol® - X_3) e pH (X_4) apresentou efeito linear positivo mais relevante, seguido pelo efeito linear positivo do óleo mineral (Nujol® - X_3), sendo ambos os efeitos estatisticamente significativos ($p \leq 0,05$). A variável pH (X_4) apresentou o efeito linear e quadrático negativo mais relevante e estatisticamente significativo ($p \leq 0,05$).



A. Gráfico de superfície

Figura 15. Gráfico de superfície na produção de corrente em DCCR 2^4

Na Tabela 10 observam-se as estimativas dos efeitos de cada variável, suas interações e a significância ($p \leq 0,05$).

Tabela 10. Estimativa dos efeitos de cada variável, suas interações e significância com $p \leq 0,05$ na produção de corrente em DCCR 2⁴

Variáveis	Estimativa dos efeitos	P
(X ₁) Extrato enzimático (Linear)	-0,12764	0,900738
Extrato enzimático (Quadrático)	-0,34185	0,738906
(X ₂) Zeólita (Linear)	-0,18503	0,856574
Zeólita (Quadrático)	-0,35209	0,731427
(X ₃) Óleo mineral (Linear)	2,47866	0,030647*
Óleo mineral (Quadrático)	-0,18274	0,858327
(X ₄) pH (Linear)	-5,91824	0,000100*
pH (Quadrático)	-2,71606	0,020072*
1*2 (Linear)	1,28204	0,226189
1*3 (Linear)	0,30362	0,767082
1*4 (Linear)	-0,28262	0,782716
2*3 (Linear)	-0,61375	0,551859
2*4 (Linear)	0,14050	0,890801
3*4 (Linear)	2,91671	0,014020*

Números seguidos de asterisco (*) são estatisticamente significativos ao nível de 95% de confiança ($p \leq 0,05$). Fonte: Autoria própria (2021).

De acordo com a análise estatística, a estimativa dos efeitos das variáveis corrente produzida (A), o extrato enzimático ($X_1 = -0,12764$), a zeólita ($X_2 = -0,18503$) e o pH ($X_4 = -5,91824$) apresentaram efeito linear negativo na produção de corrente (A). Já o óleo mineral (Nujol® - $X_3 = 2,47866$) apresentou efeito linear positivo na produção do corrente (A). Somente as variáveis independentes óleo mineral (Nujol® - X_3) e pH (X_4) foram estatisticamente significativas ($p \leq 0,05$).

Após analisar os dados de forma individual, pode-se inferir que, à medida que as concentrações de óleo mineral (X_4) diminuem e pH (X_4) aumentam, pode ocorrer um incremento na produção de corrente (μA). A interação entre as variáveis óleo mineral (Nujol®) e pH foi positiva e estatisticamente significativa ($p \leq 0,05$). As demais interações apresentaram efeitos positivos (1*2, 1*3 e 2*4) e negativos (1*4 e 2*3) entretanto não foram estatisticamente significativas ($p \geq 0,05$).

Desta forma pode-se inferir que as variáveis independentes óleo mineral (X_3), pH (X_4) e a interação entre elas, influenciaram significativamente a resposta voltamétrica (detecção de corrente).

Analisando o gráfico de curva de nível dos efeitos das variáveis independentes na produção de corrente em DCCR 2^4 (Figura 16) é possível observar que um aumento na concentração de óleo mineral (Nujol - X_3), provocaria uma diminuição da produção de corrente. O aumento do pH (X_4), dentro na faixa estudada, provocaria um incremento da produção de corrente e uma diminuição deste parâmetro provocaria um decréscimo na detecção de corrente.

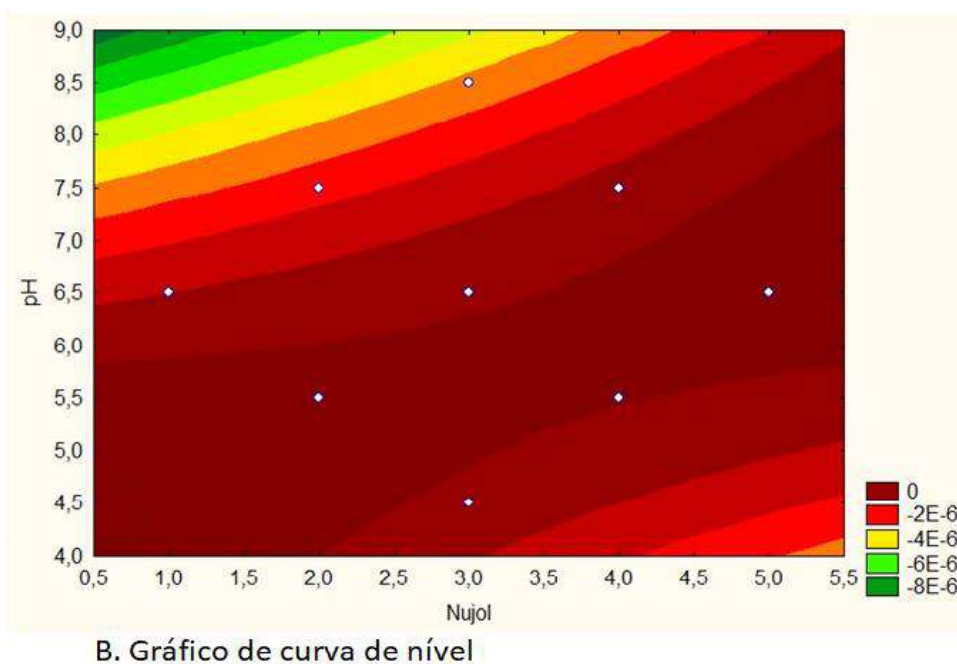


Figura 16. Gráfico de superfície e de curvas de nível dos efeitos das variáveis independentes na produção de corrente em DCCR 2^4

Os resultados da otimização da produção de corrente (A) utilizando um delineamento central composto rotacional 2^4 (DCCR) estão descritos na Tabela 11.

Tabela 11 – Resultados da produção de corrente utilizando um delineamento central composto rotacional 2^4 (DCCR)

Ensaio	Variáveis independentes			Variável dependente	
	Extrato Enzimático (X ₁)	Zeólita (X ₂)	Óleo Mineral (X ₃)	pH (X ₄)	Corrente (A)
1	1000,0	0,05	2,0	5,5	0
2	1000,0	0,05	2,0	7,5	-1,68x10 ⁻⁰⁶
3	1000,0	0,05	4,0	5,5	0
4	1000,0	0,05	4,0	7,5	-6,01x10 ⁻⁰⁷
5	1000,0	0,10	2,0	5,5	0
6	1000,0	0,10	2,0	7,5	-3,23x10 ⁻⁰⁶
7	1000,0	0,10	4,0	5,5	0
8	1000,0	0,10	4,0	7,5	-6,29x10 ⁻⁰⁷
9	2600,0	0,05	2,0	5,5	0
10	2600,0	0,05	2,0	7,5	-4,24x10 ⁻⁰⁶
11	2600,0	0,05	4,0	5,5	-5,26x10 ⁻⁰⁸
12	2600,0	0,05	4,0	7,5	-2,76x10 ⁻⁰⁷
13	2600,0	0,10	2,0	5,5	0
14	2600,0	0,10	2,0	7,5	-1,56x10 ⁻⁰⁶
15	2600,0	0,10	4,0	5,5	0
16	2600,0	0,10	4,0	7,5	-9,24x10 ⁻⁰⁷
17	200,0	0,075	3,0	6,5	-3,98x10 ⁻⁰⁷
18	3400,0	0,075	3,0	6,5	-1,65x10 ⁻⁰⁷
19	1800,0	0,03	3,0	6,5	0
20	1800,0	0,13	3,0	6,5	-5,77x10 ⁻⁰⁷
21	1800,0	0,075	1,0	6,5	-2,84x10 ⁻⁰⁷
22	1800,0	0,075	5,0	6,5	-6,14x10 ⁻⁰⁸
23	1800,0	0,075	3,0	4,5	0
24	1800,0	0,075	3,0	8,5	-3,81x10 ⁻⁰⁶
25	1800,0	0,075	3,0	6,5	-2,25x10 ⁻⁰⁷
26	1800,0	0,075	3,0	6,5	-8,73x10 ⁻⁰⁸

Pode-se observar que a produção de corrente variou de $-5,26 \times 10^{-8}$ A a $-4,24 \times 10^{-6}$ A. O ensaio experimental que apresentou a melhor condição para a detecção de corrente foi encontrado no ensaio 10 sendo constituído por 2600 U/mL de extrato enzimático, 0,05 g de zeólita, 2 gotas de óleo mineral (cerca de 0,0460g ou 50 μ L), pH 7,5 e os valores mínimos das

demais variáveis (pó de grafite (0,10g), peróxido de hidrogênio ($0,0008 \text{ mol L}^{-1}$), frequência (5,0 Hz), amplitude (10 mV) e incremento de potencial (1 mV)).

Por outro lado, o ensaio 11, constituído por 2600 U/mL de extrato enzimático, 0,05 g de zeólita, 4 gotas de óleo mineral, pH 5,5 e os valores mínimos das demais variáveis apresentou uma condição desfavorável para detecção de corrente evidenciada pelo menor valor ($-5,26 \times 10^{-8} \mu\text{A}$).

De acordo com os resultados apresentados na Tabela 11, a diferença entre o ensaio 10, com corrente $-4,24 \times 10^{-06}$ e o ensaio 11 com valor de corrente $-5,26 \times 10^{-08}$ está representado pela modificação da variável óleo mineral (X_3) e valor de pH (X_4) o que parece ter provocado essa diferença no resultado. O ensaio 06, com corrente $-3,23 \times 10^{-06}$, foi o que se aproximou mais do valor de corrente do ensaio 10, contendo os mesmos valores de óleo mineral (X_3) (2,0) e pH (X_4) (7,5) diferindo a concentração/quantidade de extrato enzimático (X_1) e zeólita (X_2). O coeficiente de determinação (R^2) foi de 0,8481, o que indica uma boa relação dos dados experimentais, se tratando de sistemas biológicos, com a curva estabelecida pelo modelo matemático, ou seja, 84,81% da variação na produção de corrente podem ser explicadas pelos fatores estudados e apenas 15,19% dessa variação não pode ser explicada pelos fatores estudados, existindo outros fatores que poderiam ser importantes para conseguir uma produção maior de corrente.

4.2.3. Estudos voltamétricos de hidroquinona

4.2.3.1. Voltametria cíclica

A Figura 17 apresenta o voltamograma cíclico para uma solução de HQ $0,3 \text{ mol L}^{-1}$ em eletrólito tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,5) e peróxido de hidrogênio ($0,0008 \text{ mol L}^{-1}$), utilizando o eletrodo de trabalho com pasta de carbono modificada com enzima peroxidase imobilizada em zeólita NaY (linha cheia). A linha tracejada da Figura 17 corresponde ao voltamograma cíclico realizado apenas em solução eletrólito.

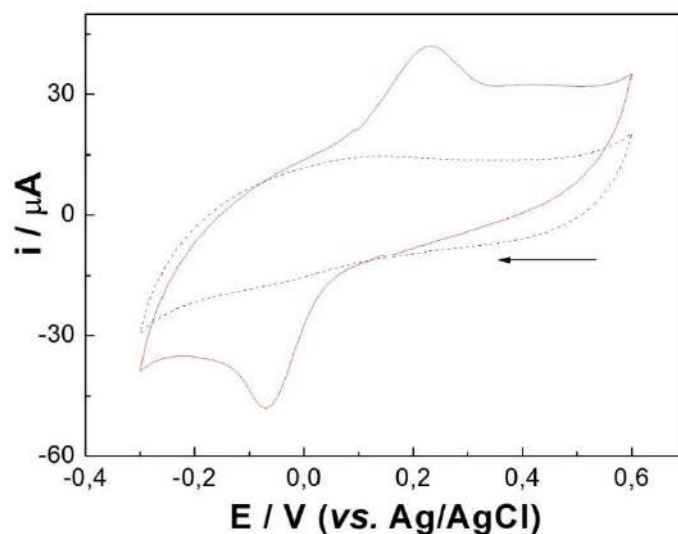


Figura 17: Voltamograma cíclico para uma solução de HQ $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ (linha cheia) e branco de tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,5) e peróxido de hidrogênio $0,0008 \text{ mol L}^{-1}$ (linha trecejada). Pasta de carbono modificada com 2600 U/mL de extrato enzimático, 0,05 g de zeólita, pó de grafite (0,10g) e 2 gotas de óleo mineral (cerca de 0,0460g ou $50 \mu\text{L}$). Velocidade de varredura = 50 mV s^{-1} .

Na Figura 17, observa-se o voltamograma cíclico para a HQ em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,5), na qual os picos de redução e de oxidação do analito estão bem definidos. O pico de redução da HQ é verificado em $-0,07 \text{ V vs. Ag/AgCl}$, e o de oxidação em $0,23 \text{ V vs. Ag/AgCl}$.

A enzima peroxidase, na presença de peróxido de hidrogênio, catalisa a oxidação da hidroquinona a quinona, que é eletroquimicamente reduzida a hidroquinona novamente, obtendo-se o pico de corrente catódica que é o sinal medido. Assim, o processo de reação pode ser dividido em duas etapas: a primeira etapa, que envolve reações químicas, e a segunda, que envolve uma reação eletroquímica (OLIVEIRA, 2007).

Na primeira etapa, o peróxido de hidrogênio presente em solução oxida a enzima peroxidase um processo que envolve dois elétrons. Essa enzima oxidada reage com a hidroquinona adicionada, oxidando-a a quinona. Numa segunda etapa, com a aplicação de potencial, a quinona formada em solução é reduzida eletroquimicamente a hidroquinona, gerando o pico correspondente (Figura 18).

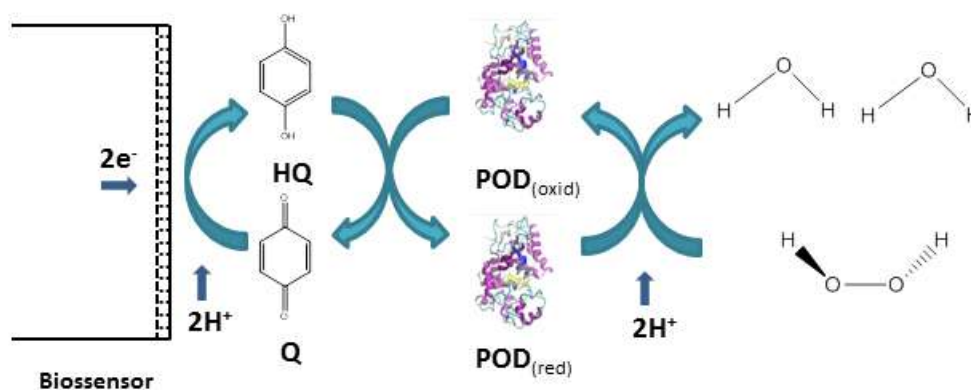


Figura 18: Reação da Hidroquinona (HQ) em contato com a Peroxidase (PER).

4.2.3.2. Voltametria de pulso

A Figura 19 apresenta a curva analítica realizada com a técnica DPV, nas condições previamente citadas. É possível observar um aumento da corrente de redução conforme adições crescentes da concentração do analito.

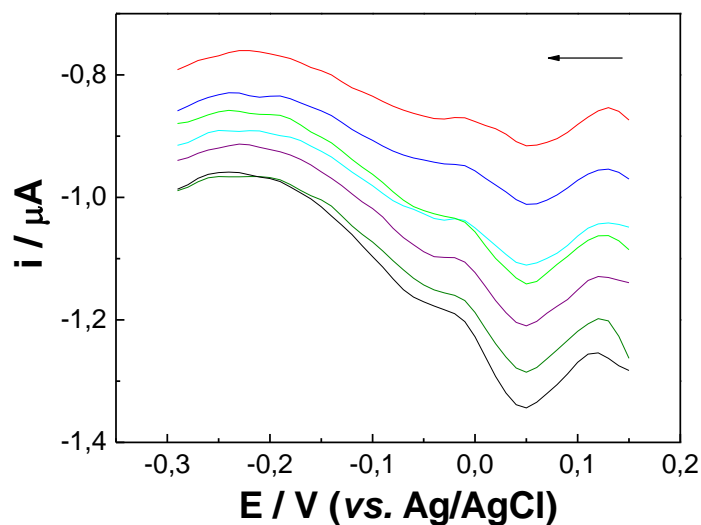


Figura 19: Voltamogramas para hidroquinona em DPV para o intervalo de concentração de $5,96 \times 10^{-4}$ a $1,77 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹ em tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹. Faixa de potencial aplicado de 0,15 até -0,29 V, concentração de peróxido de hidrogênio de $2,0 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹, eletrodo de pasta de carbono modificado com a enzima peroxidase imobilizada previamente em zeólita NaY (1300 U mL⁻¹ de enzima + 0,02g de zeólita NaY).

Após a regressão linear dessa curva em DPV, obtém-se uma equação de $-i = 3,56 \times 10^{-8} + 6,74 \times 10^{-5} [\text{HQ}]$ com $r = 0,990$, com os valores de corrente em A e concentração em mol L^{-1} (Figura 20).

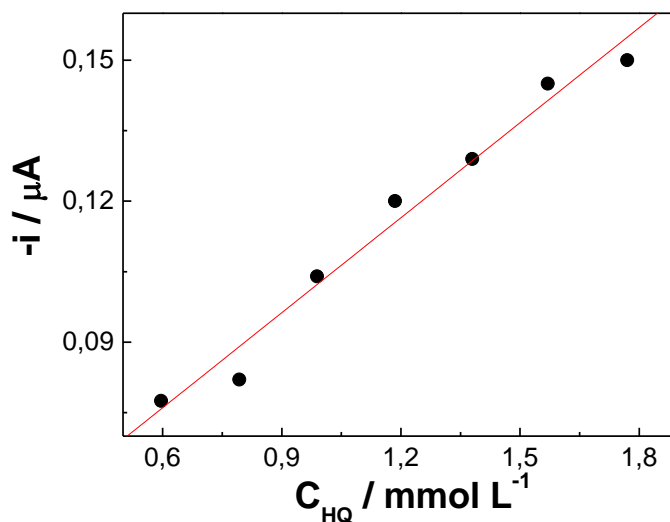


Figura 20: Regressão linear da curva analítica para hidroquinona em DPV.

Já na Figura 21, é apresentada a curva analítica realizada com a técnica de SWV nas condições experimentais descritas para DPV. É possível perceber a melhora de sinal analítico em relação à técnica DPV, uma vez que o sinal obtido na SWV leva em consideração a corrente resultante dos processos de redução e oxidação do analito.

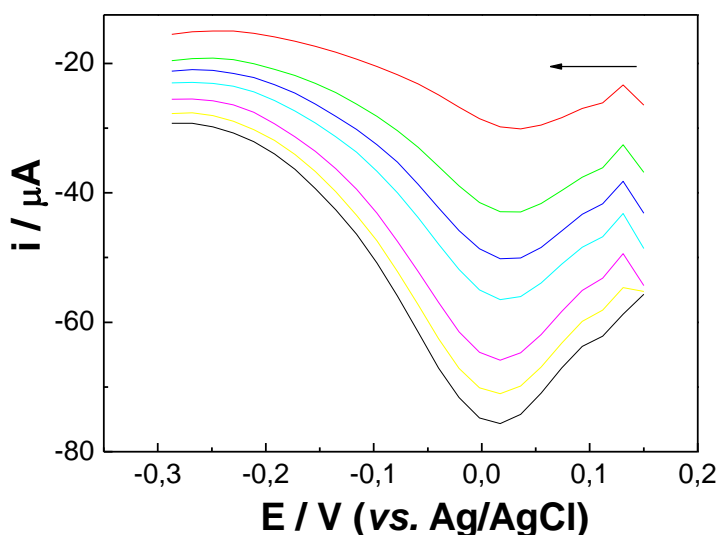


Figura 21: Voltamogramas para hidroquinona em SWV para o intervalo de concentração de $5,96 \times 10^{-4}$ a $1,77 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$. Faixa de potencial aplicado de 0,15 até -0,29 V, concentração de peróxido de hidrogênio de $2,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, eletrodo de pasta

de carbono modificado com a enzima peroxidase imobilizada previamente em zeólita NaY (1300 U mL⁻¹ de enzima + 0,02g de zeólita NaY).

Para a regressão linear em SWV (Figura 22), obtém-se uma equação de $-i = 1,30 \times 10^{-8} + 0,017 [\text{HQ}]$ com $r = 0,996$, sendo os valores de corrente em A e a concentração em mol L⁻¹.

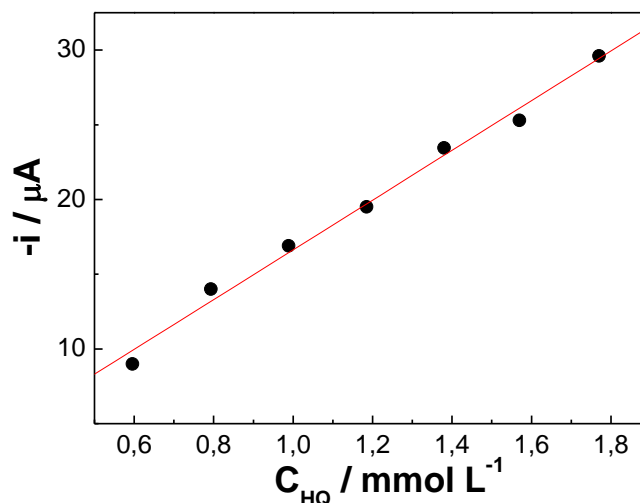


Figura 22: Regressão linear da curva analítica para hidroquinona em SWV.

Com base nos resultados obtidos para os experimentos em DPV e SWV, optou-se por novos estudos voltamétricos com a voltametria de onda quadrada tanto para o planejamento fatorial quanto para a curva analítica destinada à quantificação de HQ em amostras de cremes farmacêuticos.

4.2.3.3. Curva analítica, estudos de repetibilidade e análise de amostra

Visto que a técnica de SWV produziu melhores correntes catódicas para o processo redox da hidroquinona, uma nova curva analítica foi obtida. Diferentes alíquotas de uma solução estoque de HQ $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ foram adicionadas ao tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ com pH 7,5 no intuito de determinar a relação linear entre os sinais de corrente voltamétrica e a concentração de HQ. A partir dos resultados obtidos, foi possível estabelecer uma curva analítica para o pico de redução na faixa de concentração situada entre de até $5,96 \times 10^{-6}$ e $7,01 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ (Figura 23 - A). A equação de regressão correspondente à faixa linear de concentração para a HQ (Figura 23 - B) é $i/\mu\text{A} = -3,73728 \times 10^{-7} - 0,00594 [\text{HQ}]$, com $r = 0,999$, no qual c corresponde à concentração de HQ em mol L⁻¹. O limite de detecção foi estimado em $1,18 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ (3 vezes o desvio padrão de 10 brancos/coeficiente angular) e o limite de

quantificação (10 vezes o desvio padrão de 10 brancos/coeficiente angular) foi calculado em $3,93 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$.

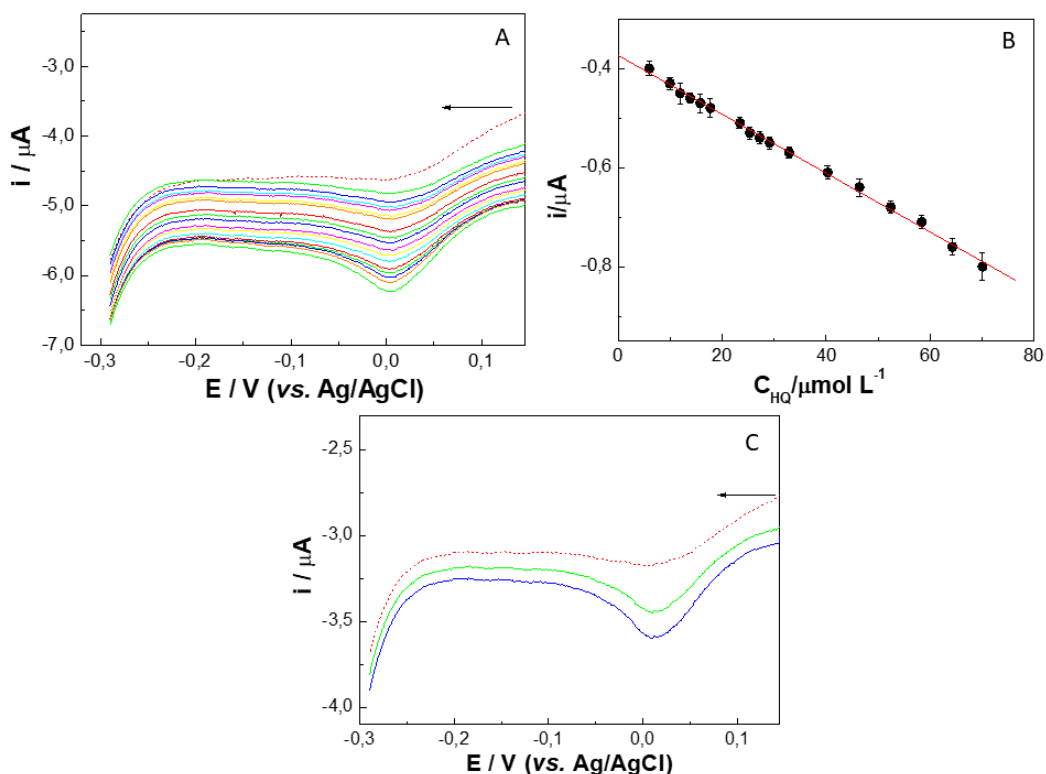


Figura 23: A) Voltamogramas para o pico de redução na faixa de concentração situada entre de até $5,96 \times 10^{-6}$ e $7,01 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, onde as linhas cheias são as adições de HQ e a linha pontilhada, o branco. B) Faixa linear de concentração para a HQ, $i / \mu\text{A} = -3,73728 \times 10^{-7} - 0,00594 [\text{HQ}]$, com $r = 0,999$. C) Sinais voltamétricos referentes à adição de 250 μL da solução da amostra real convenientemente diluída em tampão fosfato 0,1 mol L^{-1} : as linhas cheias são sinais da amostra ($n = 2$) e a linha pontilhada é referente à solução eletrólito.

O método desenvolvido para a análise rápida de HQ foi testado em creme genérico. A Figura 23 - C apresenta os sinais voltamétricos referentes à adição de 250 μL da solução da amostra real convenientemente diluída em tampão fosfato 0,1 mol L^{-1} . Nos experimentos realizados, a concentração de HQ na amostra resultou em um valor de 43 ($\pm 0,5$) mg, valor satisfatório quando comparado ao esperado segundo a rotulagem da amostra (40 mg). O resultado encontrado com o método proposto (usando biossensor modificado com peroxidase extraída de jiló com agente protetor PVOH e imobilizada em zeólita) está de acordo com o valor recomendado pela ANVISA, com o máximo permitido de 4%. Os resultados eletroquímicos

obtidos com o biossensor proposto serão futuramente comparados com aqueles valores provenientes do método cromatográfico e espectrofotométrico (USP-NF35).

Para a avaliação da repetibilidade inter-biossensores, três sensores preparados de forma independente foram inseridos separadamente em soluções de HQ $2,50 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ em tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹. A resposta de cada biossensor foi monitorada através da SWV e um desvio padrão relativo (DPR) de 5,78 % foi obtido.

A repetibilidade intra-biossensor foi avaliada ao monitorar a corrente de redução de um mesmo sensor por meio de 12 medições sucessivas em SWV para duas soluções diferentes de analito ($6,0 \times 10^{-6}$ e $2,50 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ de HQ). Os desvios padrões relativos (DPR) foram de 4,07 % e 4,18 % para as soluções de $6,0 \times 10^{-6}$ e $2,50 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ de HQ, respectivamente.

5. CONCLUSÃO

A enzima peroxidase extraída do jiló apresentou um bom valor de atividade enzimática quando feito o processo de extração utilizando o agente protetor PVOH, uma nova alternativa para essa finalidade. Esta enzima, quanto comprada pura, tem um valor muito alto, chegando a R\$994,00 (100 mg – Sigma Aldrich). Sendo assim, a sua extração a partir do jiló (R\$10,00/quilo - CEASA) se torna algo muito rentável.

Além da inovação no sentido da extração enzimática, há também a utilização do material poroso zeólita na construção do biossensor desenvolvido. Esse nanomaterial ainda vem sendo pouco explorado na composição de biossensores, assim, pode-se abrir novas portas para maior desenvolvimento de sua aplicação.

O biossensor desenvolvido tem bons resultados quanto à quantificação de HQ em amostras reais, resultado que foi possível devido aos estudos de significância da influência das variáveis envolvidas no processo de construção, bem como a otimização das mesmas, sendo as condições ideais para a construção do biossensor: 2600 U mL⁻¹ de extrato enzimático; 0,05 g de zeólita, 2 gotas de óleo mineral (cerca de 0,0460 g ou 50 µL), pH 7,5; 10,0 g de pó de grafite; 0,0008 mol L⁻¹ de peróxido de hidrogênio; 5,0 Hz de frequência; 10 mV de amplitude e 1,0 mV de incremento de potencial.

Os resultados do método desenvolvido para a análise rápida de HQ serão, mais tarde, comparados aos métodos cromatográfico e espectrofotométrico recomendados pela farmacopeia americana.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ai Q, Yang D, Li Y, Shi J, Wang X, Jiang Z. Highly efficient covalent immobilization of catalase on titanate nanotubes. *Biochem Eng J.* 2014;83(1):8-15.
- Ali J, Najeeb J, Asim Ali M, et al. Biosensors: Their Fundamentals, Designs, Types and Most Recent Impactful Applications: A Review. *J Biosens Bioelectron.* 2017;08:1–9.
- Berg, J.M.; Tymoczko, J.L.; Stryer, L.; *Biochemistry*, W.H. Freeman and Company, New York, 2001, p. 189.
- Bettazzi F, Marrazza G, Minunni M, et al. Biosensors and Related Bioanalytical Tools [Internet]. *Compr. Anal. Chem.* Elsevier Ltd; 2017. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/bs.coac.2017.05.003>.
- Bouel, G.; Bauw, G.; Legrand, B.; Rambour, S.; Purification and characterization of a basic peroxidase from the medium of cell suspension cultures of chicory. *Plant Physiol. Biochem.* 2000, 38, 217-224.
- BRASIL, J. L.; VAGHETTI, J. C. P.; SANTOS JR , B. R. A.; SIMON, N. M.; PAVAN, F. A.; DIAS, Brunetti, J.L.; Faria-Oliveira, O.M.M.; Sistemas quimiluminescentes com peroxidase E.C.:1.11.1.7 e suas aplicações em análises clínicas. *Rev. Ciênc. Farm.* 1981, 15, 49-52.
- BUENO, NATIELLE GIANINE; PEREIRA, AIRTON VICENTE. SPECTROPHOTOMETRIC DETERMINATION OF METHYLDOPA IN A DISSOLUTION TEST OF TABLETS USING AN EXTRACT OF RADISH AS A SOURCE OF PEROXIDASE. *Química Nova (Impresso)*, v. 38, p. 1107-1111, 2015.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Cosméticos vs Medicamentos. Disponível em de 23 de junho de 2016. Acessado em: 02 dez.
- ANVISA. AGENCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução da diretoria colegiada- RDC nº 529, de 04 de agosto de 2021. Acessado em: 02 dez.
- Cadena PG, Jeronimo RAS, Melo JM, Silva RA, Lima Filho JL, Pimentel MCB. Covalent immobilization of invertase on polyurethane, plast-film and ferromagnetic Dacron. *Bioresour Technol.* 2010;101(6):1595-602.
- CALIL, S. S.; QUEIROZ, Paulo Roberto. Biossensores: estrutura, funcionamento e aplicabilidade. *Mostra de Produção Científica da Pós-Graduação Lato Sensu da PUC Goiás*, v. 1, p. 1-20, 2011.
- Campa, A.; Biological Roles of Plant Peroxidases: Know and Potential Function, In: K. Everse and M. B. Grisham (Eds), *Peroxidase in Chemistry and Biology*, CRC Press, New York, Vol. II, 1991, p. 1.
- Catanante G, Rhouati A, Hayat A, et al. An Overview of Recent Electrochemical Immunosensing Strategies for Mycotoxins Detection. *Electroanalysis.* 2016;28:1750–1763.)
- Catanante G, Rhouati A, Hayat A, et al. An Overview of Recent Electrochemical Immunosensing Strategies for Mycotoxins Detection. *Electroanalysis.* 2016;28:1750–1763.
- Chang J, Lee Y-S, Fang S-J, Park D-J, Choi Y-L. Hydrolysis of isoflavone glycoside by immobilization of β -glucosidase on a chitosan-carbon in two-phase system. *Int J Biol Macromol.* 2013;61(1):465-70.

Chen H, Yu S, Shen X, et al. The *Mycoplasma gallisepticum* α -enolase is cell surface-exposed and mediates adherence by binding to chicken plasminogen. *Microb Pathog* [Internet]. 2011;51:285–290. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0882401011000647>.

Corominas, B.G.T.; Icardo, M.C.; Zamora, L.L.; Mateo, J.V.G.; MartínezCalatayud, J.; A tandem-flow assembly for the chemiluminometric determination of hydroquinone. *Talanta* 2004, 64, 618-625.

COSTA, Erivaldo de Oliveira. Desenvolvimento de sensor nanoestruturado e biossensor de dsDNA para determinação de substâncias de interesse biológico: nitrotirosina, ácido ascórbico e ácido úrico. 2016. 136 f. Tese (Doutorado em Química e Biotecnologia) - Instituto de Química e Biotecnologia, Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia, Universidade Federal de Alagoas, Maceió, 2016.

da Unicamp: Campinas, 2003.

De Barros Neto, B.; Scarminio, I. S.; Bruns, R. E.; Como Fazer Experimentos: Pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria, Ed.

Duarte-Vázquez, M.A.; García-Almendárez, B.E.; Regalado, C.; Whitaker, J.R.; Purification and properties of a neutral peroxidase isoenzyme from turnip (*Brassica nabus* L. var. purple top white globe) roots. *J. Agric. Food Chem.* 2001, 49, 4450- 4456.

Dunford, H.B.; Horseradish Peroxidase: Structure and Kinetic Properties, In: K. Everse and M. B. Grisham (Eds), *Peroxidase in Chemistry and Biology*, CRC Press, New York, Vol. II, 1991, p. 1.

Dunford, H.B.; Stillman, J.S., On the function and mechanism of action of peroxidases. *Coord. Chem. Reviews* 1976,19, 187-193.

Ehlert N, Müller PP, Stieve M, Behrens P. Immobilization of alkaline phosphatase on modified silica coatings. *Microporous Mesoporous Mat.* 2010;131(1-3):51-7.

FATIBELLO O; VIEIRA, I. C. ; SOUZA, M. G.. Determinação Espectrofotométrica por Injeção em Fluxo de Compostos Fenólicos em Águas Residuárias Empregando Peroxidase de Abobrinha (*Cucurbita Pepo*). *Eclética Química (Araraquara)*, Araraquara/SP, v. 27, p. 51-56, 2002.

FATIBELLO, O. ; Vieira, IC . L-Ascorbic acid determination in pharmaceutical using a Biosensor based on carbon paste modified with crude extract of zucchini (*curcubita pepo*). *Journal of the Brazilian Chemical Society (Impresso)*, v. 11, n.4, p. 412-418, 2000.

FATIBELLO, O; VIEIRA, I. C. . Uso Analítico de Tecidos e de Extratos Brutos Vegetais Como Fonte Enzimática. *Química Nova (Impresso)*, São Paulo, v. 25, n.3, p. 455-464, 2002.

Fatibello-Filho, O.; Vieira, I.C.; L-Ascorbic acid determination in pharmaceutical formulations using a biosensor based on carbon paste modified with crude extract of zucchini (*Cucurbita pepo*). *J. Braz. Chem. Soc.* 2000, 11, 412-418.

FATIBELLO-FILHO, Orlando; VIEIRA, Iolanda da Cruz. Uso analítico de tecidos e de extratos brutos vegetais como fonte enzimática. *Química Nova*, v. 25, n. 3, p. 455-464, 2002. Fernández-Fernández M, Sanromán MÁ, Moldes D. Recent developments and applications of immobilized laccase. *Biotechnol Adv.* 2013 Dec;31(8):1808-25.

Firth, J.; Rix, I.; Determination of hydroquinone in skin-toning creams using high-performance liquid-chromatography. *Analyst* 1986, 111, 129-132.

Gajewska, T.; Kaszuba, A.; The UV spectrophotometric determination of migrated hydroquinone. *Polymer* 1999, 44, 690-696

García, Pedro López. Desenvolvimento de metodologias analíticas para determinação de hidroquinona em cosméticos e medicamentos. 2004. 113 f. Dissertação (mestrado) – Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós-Graduação em Fármaco e Medicamentos. Área de Produção e Controle de Farmacêuticos. USP, São Paulo, SP.

GRECCO, S.T.F.; RANGEL, M.C.; URQUIETA-GONZÁLEZ, E.A. Zeólitas hierarquicamente estruturadas. *Quim. Nova*, v.36, n.1, p.131-142, 2013.

HENRIKSEN, Anette; SMITH, Andrew T.; GAJHEDE, Michael. The structures of the horseradish peroxidase C-ferulic acid complex and the ternary complex with cyanide suggest how peroxidases oxidize small phenolic substrates. *Journal of Biological Chemistry*, v. 274, n. 49, p. 35005-35011, 1999.

Holschuh, H.J.; Isolamento, purificação e caracterização bioquímica da peroxidase de carambola (*Averrhoa carambola*, L.). Tese (Doutorado em Ciência de alimentos), Universidade Estadual de Campinas, 2000.

Hou J, Dong G, Ye Y, Chen V. Laccase immobilization on titania nanoparticles and titania-functionalized membranes. *J Membrane Sci.* 2014;452(1):229-40.

Jewur, S. S. Química de zeólitas e catálise. *Quim. Nova*, 1985. p.99-105.

Jia, L.P.; Zhang, A.M.; Catalytic spectrophotometric determination of trace hydroquinone. *Chinese. J. Anal. Chem.* 2003 31, 1508-1510.

Ju H-Y, Kuo C-H, Too J-R, Huang H-Y, Twu Y-K, Chang C-MJ, et al. Optimal covalent immobilization of α -chymotrypsin on Fe₃O₄-chitosan nanoparticles. *J Mol Catal B: Enzym.* 2012;78(1):9-15.

Krishna BL, Singh AN, Patra S, Dubey VK. Purification, characterization and immobilization of urease from *Momordica charantia* seeds. *Process Biochem.* 2011;46(7):1486-91.

KUBOTA, L. T.; ROSATTO, S. S.; FREIRE, R. S.; DURÁN, N. Biossensores amperométricos para determinação de compostos fenólicos em amostras de interesse ambiental. *Química Nova*, v. 24, n. 1, p. 77-86, 2001.

KUBOTA, L. T.; ROSATTO, S. S.; FREIRE, R. S.; DURÁN, N. Biossensores amperométricos para determinação de compostos fenólicos em amostras de interesse ambiental. *Química Nova*, v. 24, n. 1, p. 77-86, 2001.

Lang Q, Yin L, Shi J, Li L, Xia L, Liu A. Co-immobilization of glucoamylase and glucose oxidase for electrochemical sequential enzyme electrode for starch biosensor and biofuel cell. *Biosens Bioelectron.* 2014;51(1):158-63.

Leadlay, P.F.; DPhil, M.A.; An Introduction to Enzyme Chemistry, Department of Biochemistry, Oxford University. Cambridge, 1993, p.190.

Lee, B.L.; Ong, H.Y.; Shi, C.Y.; Ong, C.N.; Simultaneous determination of hydroquinone, catechol and phenol in urine using high-performance liquid chromatography with fluorometric detection. *J. Chromatogr. Biomed. Appl.* 1993, 619, 259-266.

- Lee, C.Y.; Penessi, A.P. Smith, N.L. Purification and some properties of peroxidase from de chaunac grapes. *Am. J. Enol. Vitic.* 1983, 34, 128-129.
- Lee, H.C.; Klein, B.P.; A simple method of identifying peroxidase isoenzymes from crude pea seed extracts. *Food Chem.* 1988, 29, 275-282.
- Lehninger, A. L.; *Princípios de Bioquímica*, Sarvier, São Paulo, 1986, p.154.
- Loughlin, W.A.; Biotransformation in organic synthesis. *Bioresour Technol.* 2000, 74, 49-62.
- Lupetti, K.O.; Vieira, I.C.; Fatibello-Filho, O.; Jack fruit-capric acid biosensor for total phenols determination in wastewaters. *Anal. Lett.* 2004, 37, 1833-1846.
- LUZ, A. B.. *Zeólitas: propriedades e usos industriais*. Rio de Janeiro: CETEM/MCT, 1994.
- MARTINS, L.; CARDOSO, D. Catalytic applications of basic micro and mesoporous molecular sieves. *Química Nova*, São Paulo, v. 29, n. 2, p. 358-364, abr. 2006.
- MELO, Ariana Farias. *DESENVOLVIMENTO PRELIMINAR DE UM BIOSSENSOR ENZIMÁTICO PARA DETERMINAÇÃO DE TANINOS HIDROLISÁVEIS*. 108 f. Tese (Doutorado em Engenharia de Processos Químicos e Bioquímicos) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, UFRJ, Brasil, 2008.
- MESQUITA, M. V. N. et al. Imobilização enzimática em matrizes poliméricas. *Boletim Informativo Geum*, v.9, n.2, p. 38-50, jun. 2018.
- Miland, E.; Smyth, M.R.; Fagain, C.O.; Modification of horseradish peroxidase with bifunctional N-hydroxysuccinimide esters: Effects on molecular stability. *Enzyme Microb. Technol.* 1996, 19, 242-249.
- Moulding, P.H.; Grant, H.F.; Mclellan, K.M.; Robinson, D.S.; Heat stability of soluble and ionically bound peroxidases extracted from apples. *Int. J. Food Sci. Technol.* 1987, 22, 391-397.
- Oliveira, I. R. W. Z.; VIEIRA, I. C. .mmobilization on procedures for the development of a biosensor for determination of hydroquinone using chitosan and gilo (*solum gilo*). *Enzyme and Microbial Technology*, v. 38, p. 449-456, 2006.
- OLIVEIRA, I. R. W. Z.; VIEIRA, I. C. . Construção e aplicação de biossensores usando diferentes procedimentos de imobilização da peroxidase de vegetal em matriz de quitosana. *Química Nova (Impresso)*, v. 29, p. 932-939, 2006.
- Oliveira, I.R.W.Z.; Vieira, I.C.; Lupetti, K.O.; Fatibello-Filho, O.; Fávère, V.T.; Laranjeira, M.C.M.; Biosensor basead on chitosan biopolymer and crude extract of ginger (*Zingiber Officinales Rocs.*) for the determination of hidroquinone in wastewater of photographic process. *Anal. Lett.* 2004, 15, 3111-3127.
- OLIVEIRA, Inês Rosane Welter Zwirtes de et al. *Desenvolvimento de biossensores e sensores biomiméticos para determinação de compostos fenólicos*. 2007.
- Oliveira, Inês Rosane Welter Zwirtes de. *Desenvolvimento de biossensores e sensores biomiméticos para determinação de compostos fenólicos*. 2007. 148 f. Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Físicas e Matemáticas. Programa de Pós-Graduação em Matemática. UFSC, Florianópolis, SC.
- otimização das condições de biossorção de Cu(II) em batelada utilizando-se casca de nozes

Pacheco WF, Semaan FS, De Almeida VGK, et al. Voltammetry: A brief review about concepts. *Rev Virtual Quim.* 2013;5:516–537.

pecã como biossorvente. *Quimica Nova*, v.30, n.3, p.548-553, 2007

PEREIRA-FILHO, E. R.; POPPI, R. J.; ARRUDA, M. A. Z. Emprego de planejamento fatorial para a otimização das temperaturas de pirólise e atomização de Al, Cd, Mo e Pb por ETAAS. *Química Nova*, 25 (2): 246-253, 2002.

Pisoschi AM, Pop A, Gajaila I, et al. Analytical methods applied to the assay of sulfur-containing preserving agents. *Microchem J* [Internet]. 2020;155:104681. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0026265X19334915>.)

Robinson, D.S.; Peroxidase and Catalases in Food, In: D.S. Robinson and N.A.M. Eskin (Eds.), *Oxidative Enzymes in Food*, Elsevier Applied Science, New York, 1991, p.1.

Ronkainen NJ, Halsall HB, Heineman WR. Electrochemical biosensors. *Chem Soc Rev.* 2010;39:1747–1763.

S. L. P.; LIMA, E. C. Planejamento estatístico de experimentos como uma ferramenta para Sakodinskaya, I.K.; Desiderio, C.; Nardi, A.; Fanali, S.; Micellar electrokinetic chromatographic study of hydroquinone and some its ethers determination of hydroquinone in skin-toning cream. *J. Cromatogr.* 1992, 596, 95-100.

Santos WTP Dos, Gimenes DT, Richter EM, et al. Análise por injeção em fluxo com detecção amperométrica de múltiplos pulsos: Potencialidades e aplicações. *Quim Nova.* 2011;34:1753–1761.

Santos, E.R.; Caracterização bioquímica da peroxidase e polifenol oxidase de açaí *Euterpe oleracea*. Dissertação de Mestrado - Ciência de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2002.

Sassolas, Audrey & Blum, Loïc & Leca-Bouvier, Béatrice. (2012). Immobilization strategies to develop enzymatic biosensors. *Biotechnology advances.* 30.489-511.

Silva NCA, Miranda JS, Bolina ICA, Silva WC, Hirata DB, de Castro HF, et al. Immobilization of porcine pancreatic lipase on poly-hydroxybutyrate particles for the production of ethyl esters from macaw palm oils and pineapple flavor. *Biochem Eng J.* 2014;82(1):139-49.

Singh N, Srivastava G, Talat M, Raghubanshi H, Srivastava ON, Kayastha AM. Cicer α -galactosidase immobilization onto functionalized graphene nanosheets using response surface method and its applications. *Food Chem.* 2014;142(1):430-8.

Soda, I.; Hasegawa, T.; Suzuki, T.; Ogura, N.; Purification and some properties of peroxidase from kiwi fruit. *Agric. Biol. Chem.* 1991, 55, 1677-1678. Civello, P.M.; Martínez, G.A.; Chaves, A.R.; Anon, M.C.; Peroxidase from strawberry fruit (*Fragaria ananassa* Duch). *J. Agric. Food Chem.* 1995, 43, 2596- 2601. 123

Soleimani M, Khani A, Najafzadeh K. α -Amylase immobilization on the silica nanoparticles for cleaning performance towards starch soils in laundry detergents. *J Mol Catal B: Enzym.* 2012;74(1-2):1-5.

Souza D de, Codognoto L, Malagutti AR, et al. Voltametria de onda quadrada. Segunda parte: aplicações. *Quim Nova.* 2004;27:790–797.

Sun J, Hu K, Liu Y, Pan Y, Yang Y. Novel superparamagnetic nanoparticles for trypsin immobilization and the application for efficient proteolysis. *J Chromatogr B*. 2013;942-943(1):9-14.

Tagami, L., Andreo dos Santos, O. A., Sousa-Aguiar, E. F., Arroyo, P. A., & Barros, M. A. S. D. de. (2001). NaY and CrY zeolites ion exchange. *Thermodynamics. Acta Scientiarum. Technology*, 23, 1351-1357. <https://doi.org/10.4025/actascitechnol.v23i0.2761>.

THÉVENOT, D. R., Toth, K., Durst, R. A., & Wilson, G. S. (2001). Electrochemical biosensors: Recommended definitions and classification. *Biosensors and Bioelectronics*, 16(1-2), 121-131. [https://doi.org/10.1016/S0956-5663\(01\)00115-4](https://doi.org/10.1016/S0956-5663(01)00115-4)

Tong, Z.; Qingxiang, Z.; Hui, H.; Qin, L.; Yi, Z.; Removal of toxic phenol and 4-chlorophenol from wastewater by horseradish peroxidase. *Chemosphere* 1997, 34, 893-903.

Turner A, Karube I, Wilson GS. *Biosensors : Fundamentals and Applications* [Internet]. 1st ed. Oxford, New York: Oxford University Press; 1987. p. 770. Available from: <http://liu.diva-portal.org/smash/get/diva2:619968/FULLTEXT01.pdf>.

Turner APF. *Biosensors: Sense and sensibility*. *Chem Soc Rev*. 2013;42:3184–3196.

USA. Food & Drug Administration. Department of health and human services. 21 CFR Part 300. August 29, 2006.

U.S.A. Food & Drug Administration. Department of Health and Human Services. Hydroquinone: Nomination Profile. 21 may 2009.

USA. Food & Drug Administration. Department of health and human services 21 CFR Part 310. April 1, 2015.

Uslu B, Ozkan SA. *Electroanalytical Methods for the Determination of Pharmaceuticals: A Review of Recent Trends and Developments*. *Anal Lett* [Internet]. 2011;44:2644–2702. Available from: <https://doi.org/10.1080/00032719.2011.553010>.)

USP-NF35 - United States Pharmacopea, 35° edição.

Vámos-Vigyázo, L.; Polifenol oxidase and peroxidase in fruits and vegetables. *CRC Critical Reviews in Food Sci. Nutrition* 1981, 49-127.

VEITCH, N. C. Horseradish peroxidase: a modern view of a classic enzyme. *Phytochemistry*, v. 65, n. 3, p. 249-259, 2004.

Vieira DC, Lima LN, Mendes AA, Adriano WS, Giordano RC, Giordano RLC, et al. Hydrolysis of lactose in whole milk catalyzed by β -galactosidase from *Kluyveromyces fragilis* immobilized on chitosan-based matrix. *Biochem Eng J*. 2013;81(1):54-64.

Voet, D.; Voet, J.G.; *Biochemistry*, John Wiley & Sons, New York, 1998, p. 331.

Whitaker, J.R.; *Principles of Enzymology for the Food Sciences*, Marcel Dekker, New York, 1985, p.592.

Yusdy, Patel SR, Yap MGS, Wang DIC. Immobilization of l-lactate dehydrogenase on magnetic nanoclusters for chiral synthesis of pharmaceutical compounds. *Biochem Eng J*. 2009;48(1):13-21. 568 *Biotecnologia Aplicada à Agro&Indústria*

ZAPP, E.; BRONDANI, D.; VIEIRA, I. C.; DUPONT, J.; SCHEEREN, C. W. Gold Nanoparticles and Hydrophobic Ionic Liquid Applied on the Development of a Voltammetric Biosensor for Polyphenol Determination. *Electroanalysis*, v. 23, n. 5, p. 1124–1133, 2011.

Zhao L, Liu Q, Yan S, Chen Z, Chen J, Li X. Multimeric immobilization of alcohol oxidase on electrospun fibers for valid tests of alcoholic saliva. *J Biotechnol.* 2013;168(1):46-54.