



**RENORBIO**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

**Uso da Enzima Polifenol Oxidase e das Nanopartículas de Mesocarpo de  
Babaçu (*Orbignya phalerata* Mart) para Construção de Biossensor para  
Detecção de Sulfito**

**ANA SIQUEIRA DO NASCIMENTO MARREIRO TEIXEIRA**

**TERESINA-PI**

**2019**

**ANA SIQUEIRA DO NASCIMENTO MARREIRO TEIXEIRA**

**Uso da Enzima Polifenol Oxidase e das Nanopartículas de Mesocarpo de  
Babaçu (*Orbignya phalerata* Mart) para Construção de Biossensor para  
Detecção de Sulfito**

Trabalho submetido ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia - RENORBIO, Ponto Focal Piauí, Universidade Federal do Piauí, como requisito a aprovação na defesa de tese para a obtenção do Título de Doutora em Biotecnologia. Área de concentração: Biotecnologia em Saúde.

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dra<sup>a</sup> Carla Eiras

**TERESINA-PI**

**2019**

## FOLHA DE APROVAÇÃO – DEFESA DE TESE

**ALUNA:** ANA SIQUEIRA DO NASCIMENTO MARREIRO TEIXEIRA

**TÍTULO DO PROJETO:** “Uso da Enzima Polifenol Oxidase e das Nanopartículas de Mesocarpo de Babaçu (*Orbignya phalerata* Mart) para Construção de um Biossensor para Detecção de Sulfito.”

**PROFESSORA ORIENTADORA:** Profa. Dra. Carla Eiras

<b>BANCA EXAMINADORA:</b>	<b>CONCEITO</b>	<b>ASSINATURA</b>
Prof. Dra. Carla Eiras - UFPI (Presidente)	<u>Satisfatório</u>	<u>Carla Eiras</u>
Profa. Dra. Maria Rita de Moraes Chaves Santos - UFPI (Examinadora)	<u>Satisfatório</u>	<u>Maria Rita</u>
Prof. Dr. José Milton Elias de Matos - UFPI (Examinador)	<u>Satisfatório</u>	<u>José Milton</u>
Prof. Dr. Roberto Alves de Sousa Luz - UFPI (Examinador)	<u>Satisfatório</u>	<u>Roberto Alves</u>
Profa. Dra. Andressa Galli - UNICENTRO (Examinadora)	<u>Satisfatório</u>	<u>Andressa Galli</u>

**DATA DA AVALIAÇÃO:** 24 de junho de 2019.

**HORÁRIO:** 14h30

**LOCAL:** Auditório do PPGCM/CT/UFPI

**Ao meu esposo Paulo, e aos meus filhos  
Laura Carollyne e Paulo Júnior, pelo amor  
carinho e companheirismo ao longo dessa  
jornada, mesmo quando não pude retribuir  
à altura.**

## AGRADECIMENTOS

Uma vez escutei que "a gratidão é a lembrança do coração", o que para mim faz todo o sentido. Chegar até aqui só foi possível com a ajuda de muitos, aos quais não poderia deixar de registrar aqui meus sinceros agradecimentos.

Agradeço...

A Deus, arquiteto do universo, pelas maravilhas e graças que tem me proporcionado. Por ter me dado força e coragem para terminar este trabalho, e por ter me mostrado os caminhos e saídas em todos os momentos difíceis.

Aos meus pais, José Marreiro e Graça Siqueira, responsáveis por toda minha educação, princípios, ensinamentos e valores tais como: dignidade, respeito e humildade. Foi com vocês que aprendi a transformar as dificuldades em pontes para ir mais longe e a nunca desistir dos meus objetivos.

Ao meu esposo Paulo Ronaldo, companheiro incondicional. Sempre ao meu lado, me fazendo acreditar que eu posso mais do que imagino. O convívio ao teu lado tem sido um laboratório de ensaios bem-sucedidos. Por conta do seu amor, amizade, paciência e compreensão, este trabalho pôde ser concretizado. Obrigada por ter feito do meu sonho o nosso sonho. Te amo!

Aos meus filhos Laura Carollyne e Paulo Júnior, que são a razão da minha vida, pessoas que me inspiram a querer ser mais do que já fui até hoje.

As minhas irmãs Liana e Adriana pelo amor incondicional. Vocês foram peças fundamentais para que esse trabalho se concretizasse.

A todos os meus familiares, tios (as) e primos (as), não citarei nomes, para não me esquecer de ninguém. Aos modelos em que procuro me espelhar sempre: as minhas avós maternas Alba (in memoriam) e paterna Luiza (in memoriam), por terem me ensinado a ser nobre na essência da palavra. Que falta vocês me fazem!

A família do meu esposo, em especial ao meu sogro Joaquim Lúcio Teixeira (*in memoriam*), que apesar de não estar presente fisicamente, sei que está em festa com mais essa realização.

A Universidade Federal do Piauí (UFPI), que por meio do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia (RENORBIO), contribuiu significativamente para o meu crescimento profissional, intelectual e humano.

A minha orientadora professora Dr<sup>a</sup> Carla Eiras que com sua sabedoria e competência orientou este trabalho com muito empenho. Obrigada por ter me acolhido tão bem durante esses quatro anos no seu laboratório. Agradeço a sua amizade e as orientações recebidas durante esta jornada.

A minha amiga de doutorado Cristiany Marinho (Cris), muito obrigada por ser meu ombro amigo em dias difíceis durante todo esse processo. Você é um presente de Deus que ganhei do doutorado.

Aos demais membros que fizeram e/ou fazem parte do Laboratório de Pesquisa e Desenvolvimento de Novos Materiais e Sensores: Moises Santana, Railson Machado, Rafael Rodrigues, Wollia Vitorino, Kayo Hesdras, Emanuel Airton, Éster Fernanda, Maria Clara, Joziel Alves e todos os outros que, na medida do possível, me ajudaram em tudo o que precisei ao longo desses anos. A gente vai mais longe quando trabalha em conjunto!

A Professora Dr<sup>a</sup> Durcilene Alves da Silva, colaboradora deste trabalho. Meus sinceros agradecimentos e respeito.

A professora Dr<sup>a</sup> Kátia Bonfim Leite de Moura Sérvulo e o seu aluno Brandon Ferraz e Sousa pelas ajudas na determinação da Proteína da enzima Polifenol Oxidase.

A técnica de laboratório do departamento de Farmácia Jéssica Freire S. Figueiredo pelas ajudas na centrifugação para a obtenção do extrato bruto enzimático.

Aos funcionários do LIMAV, em especial Edgar, Kelson, Kilson, e Raimundo, pelo auxílio em todos os momentos.

Ao Instituto Federal de Educação Ciência e Tecnologia do Piauí (IFPI), por conceder a liberação das minhas atividades como professora, para me dedicar aos estudos de doutorado.

E, finalmente, a todos aqueles que, de maneira direta ou indireta, contribuíram para a realização deste sonho.

**A todos meu muito obrigado!**

**"Não é sobre chegar no topo do  
mundo e saber que venceu  
É sobre escalar e sentir que o  
caminho te fortaleceu"**

**(Ana Vilela)**

**"Tudo é do Pai  
Toda honra e toda glória  
É Dele a vitória  
Alcançada em minha vida"**

**(Padre Fábio de Melo)**



## RESUMO

Alergias alimentares têm sido cada vez mais frequentes devido ao crescente uso de aditivos, como os agentes sulfitantes, que apesar de sua eficácia na conservação de alimentos, tem apresentado inúmeras reações adversas. Diante disso, percebe-se a necessidade de dispositivos confiáveis, sensíveis e seletivos, tais como, os biossensores, para avaliar a presença destes aditivos em um determinado produto alimentício. A partir desta problemática, o presente trabalho objetivou a construção de um biossensor eletroquímico para determinação de sulfito em alimentos, utilizando a enzima polifenol oxidase (PFO) e os polímeros naturais quitosana e o mesocarpo de babaçu (*Orbignya phalerata* Mart), sendo este último utilizado na forma de nanopartículas poliméricas (MBNPs). As MBNPs foram sintetizadas pelo método de diálise e, após caracterização estas mostraram um formato irregular além de terem sido determinados seu tamanho médio em 121,5 nm, PDI 0,254 e potencial zeta -28,1mV. Posteriormente, as MBNPs foram empregadas na construção do biossensor ECP/MBNPs/QUIT/GA/PFO a partir da técnica “*casting*”, com a adsorção do filme multicamadas sobre o eletrodo de carbono grafite pirolítico. A caracterização eletroquímica do sistema foi realizada pelas técnicas de Voltametria Cíclica (VC) e Voltametria de Onda Quadrada (VOQ), e este mostrou-se eficiente para detecção do sulfito em sucos industrializados, apresentando limite de detecção de 0,151  $\mu\text{mol L}^{-1}$  e limite de quantificação de 0,452  $\mu\text{mol L}^{-1}$ . As amostras de sucos comerciais analisadas apresentaram concentração de sulfito abaixo de 10,0 $\mu\text{M}$ , estando dentro que do que preconiza a legislação Internacional sobre a orientação da *Joint Expert Commitee on Food Additives* que estabelece o limite máximo de 0,002g/100mL. Diante do que foi exposto, por ser construído a partir de polímeros naturais de baixo custo e apresentar sensibilidade a baixas concentrações deste aditivo, acredita-se que o biossensor seja uma alternativa economicamente viável para determinação de sulfito em produtos alimentares.

**palavras-chave:** nanopartículas poliméricas, mesocarpo de babaçu, biossensor, sulfito

## ABSTRACT

Food allergies have been increasingly common due to the increasing use of additives such as sulphite agents, which despite their effectiveness in food preservation, have shown numerous adverse reactions. Given this, we realize the need for reliable, sensitive and selective devices, such as biosensors, to evaluate the presence of these additives in a particular food product. From this problem, the present work aimed the construction of an electrochemical biosensor for determination of sulfite in foods, using the enzyme polyphenol oxidase (PPO) and the natural polymers chitosan and babassu mesocarp (*Orbignya phalerata* Mart.) in the form of polymeric nanoparticles (BMNPs). BMNPs were synthesized by the dialysis method and after characterization they showed an irregular shape and their mean size at 121.5 nm, PDI 0.254 and zeta potential -28.1 mV were determined. Subsequently, BMNPs were used to construct the ECP/BMNPs /CHIT/GA/PPO biosensor using the casting technique, with the multilayer film adsorption onto the pyrolytic graphite carbon electrode. The electrochemical characterization of the system was performed by the Cyclic Voltammetry (CV) and Square Wave Voltammetry (SWV) techniques, and it was efficient for the detection of sulfite in industrialized juices, with detection limit of  $0.151 \mu\text{mol L}^{-1}$  and limit. of quantification of  $0.452 \mu\text{mol L}^{-1}$ . The samples of commercial juices analyzed presented sulfite concentration below  $10.0 \mu\text{M}$ , being within what is recommended by the International legislation on the orientation of the Joint Expert Committee on Food Additives which sets the maximum limit of  $0.002 \text{g} / 100 \text{mL}$ . In view of the above, being constructed from low cost natural polymers and presenting low concentration sensitivity of this additive, it is believed that the biosensor is an economically viable alternative for sulfite determination in food products.

**keywords:** polymer nanoparticles, babassu mesocarp, polyphenol oxidase, biosensor, sulfite.

## LISTA DE FIGURAS

### CAPÍTULO 1

#### Referencial Bibliográfico

<b>Figura 1</b> - Palmeira babaçu ( <i>Orbygnia phalerata</i> Mart) .....	29
<b>Figura 2</b> – Composição física do coco babaçu .... ..	30
<b>Figura 3</b> – Esquema das reações de catálise envolvendo enzimas.....	33
<b>Figura 4</b> – Modelo esquemático do sítio ativo da polifenol oxidase.....	35
<b>Figura 5</b> - Mecanismo de catalisação enzimática do fenol para o-quinona pela PFO na presença de H <sub>2</sub> O.....	35
<b>Figura 6</b> - Funcionamento de um biossensor.....	37
<b>Figura 7</b> - Mecanismo de inibição irreversível entre o inibidor e o sítio ativo da enzima.....	41
<b>Figura 8</b> - Mecanismo de inibição reversível competitiva entre o inibidor e o sítio ativo da enzima.....	42
<b>Figura 9</b> - Mecanismo de inibição reversível não competitiva entre o inibidor e o sítio ativo da enzima.....	42
<b>Figura 10</b> - Mecanismo de inibição reversível incompetitiva entre o inibidor e o sítio ativo da enzima.....	43
<b>Figura 11</b> - Técnicas de imobilização enzimática.....	44

### CAPÍTULO 2

#### Uso de Nanopartículas do Mesocarpo do Babaçu (*Orbignya Phalerata* Mart) como Plataforma para Ancoragem de Enzimas no Desenvolvimento de Biossensores: Um Mapeamento Tecnológico

<b>Figura 1</b> – Artigos publicados nos últimos 10 anos para a palavra “Babassu Mesocarp”.....	83
---	----

<b>Figura 2</b> - Principais áreas de publicações com a palavra chave “Mesocarpo de Babaçu”.....	84
<b>Figura 3</b> - Artigos publicados nos últimos 10 anos para a combinação “Biosensor” e “Sulfite”.....	86
<b>Figura 4</b> - Principais áreas de publicações relacionadas a combinação das palavras chaves “Biosensor” e “Sulfite”.....	87

### CAPÍTULO 3

#### **Biossensor a Base de Nanopartículas de Mesocarpo de Babaçu (*Orbignya phalerata* Mart) para Detecção Indireta de Sulfito em Sucos Industrializados**

<b>Figura 1</b> - Ilustração esquemática das diferentes etapas de preparação do biossensor ECP/MBNPs/QUIT/GA/PFO.....	101
<b>Figura 2</b> – A) Distribuição do tamanho das MBNPs sintetizadas pela técnica de diálise e B) Potencial Zeta das Nanopartículas.....	103
<b>Figura 3</b> – A) Imagem de MEV das MBNPs obtida por 100 000x. B) Frequência das partículas pelo tamanho médio.....	104
<b>Figura 4</b> - Espectroscopia na Região do Infravermelho com Transformada de Forrier- FTIR das camadas do Biossensor.....	105
<b>Figura 5</b> – Voltamogramas cíclicos obtidos para o ECP (—) e os sistemas: ECP/MBNPs (—), ECP/MBNPs/QUIT, (—), ECP/MBNPs/QUIT/GA/PFO (—), em solução de catecol 1,0 mmol L <sup>-1</sup> em tampão fosfato 0,1 mol L <sup>-1</sup> , pH 7,2, v= 10 mV s <sup>-1</sup> . .....	107
<b>Figura 6</b> – Efeito do pH sobre a resposta analítica do biossensor ECP/MBNPs/QUIT/GA/PFO em solução de catecol 1,0 mmol L <sup>-1</sup> em tampão fosfato 0,1 mol L <sup>-1</sup> , a uma velocidade de varredura de 10 mV s <sup>-1</sup> .....	108
<b>Figura 7</b> – (A) Variação da velocidade de varredura de 10, 25, 50, 75, 100, 125, 150, 175, 200, 225 e 250 mV s <sup>-1</sup> . (B) Influência da velocidade de varredura nos valores de corrente de pico para os processos de oxidação I e II e, para os processos de redução, I' e II' para o biossensor ECP/MBNPs/QUIT/GA/PFO. Todos os voltamogramas foram registrados em solução de catecol 1,0 mmol L <sup>-1</sup> em tampão fosfato 0,1 mol L <sup>-1</sup> , pH 7,2.....	109
<b>Figura 8</b> – Voltamogramas cíclicos obtidos para o sistema: ECP/MBNPs/QUIT/GA/PFO (a) Sem a presença de sulfito e (b) na presença	

de 800 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de sulfito em solução de catecol 1,0 $\text{mmol L}^{-1}$ em tampão fosfato 0,1 $\text{mol L}^{-1}$ , pH 7,2.....	111
<b>Figura 9</b> - Representação esquemática da reação de inibição da enzima PFO na reação de oxidação de catecol a o-quinona na presença de sulfito.....	112
<b>Figura 10</b> - A) Respostas dos voltamogramas de onda quadrada (VOQ) obtidas utilizando o biossensor ECP/MBNPs/QUIT/GA/PFO solução de catecol 1,0 $\text{mmol L}^{-1}$ em tampão fosfato 0,1 $\text{mol L}^{-1}$ , (pH 7,2) (a); 5 (b); 10 (c); 15 (d); 20 (e); 25 (f); 30 (g); 35 (h); 40 (i); 45 (j); 50 (k); 55 (l); 60 (m); 65 (n); 70 (o); 75 (p) e 80 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de sulfito (q). B) Inserções: Curva analítica para o Sulfito.....	113
<b>Figura 11</b> - Voltamogramas de onda quadrada obtidos na presença de diferentes concentrações de A) sorbato de potássio, B) sacarose e C) ácido ascórbico. Todos os voltamogramas foram obtidos utilizando o biossensor ECP/MBNPs/QUIT/GA/PFO em solução de catecol 1,0 mM solubilizada em tampão fosfato 0,1 M, pH 7,2, amplitude 10 mV, frequência 20 Hz e tempo de equilíbrio de 10s.....	118

## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO 1

#### Referencial Bibliográfico

<b>Tabela 1</b> – Classificação das enzimas segundo a IUBMB.....	34
<b>Tabela 2</b> – Alimentos em que os agentes sulfitantes podem ser adicionados com a função de conservadores e seus respectivos limites máximos, de acordo com a legislação brasileira vigente. ....	49

### CAPÍTULO 2

#### Uso de Nanopartículas do Mesocarpo do Babaçu (*Orbignya Phalerata* Mart) como Plataforma para Ancoragem de Enzimas no Desenvolvimento de Biossensores: Um Mapeamento Tecnológico

<b>Tabela 1</b> – Número patentes encontradas com as palavras chave nos bancos Espacenet, USPTO e INPI.....	80
<b>Tabela 2</b> - Número patentes encontradas combinando duas palavras chave relativas ao trabalho nos bancos Espacenet, USPTO e INPI.....	81
<b>Tabela 3</b> - Número patentes encontradas combinando três palavras chave relativas ao trabalho nos bancos Espacenet, USPTO e INPI.....	82
<b>Tabela 4</b> - Número de artigos encontrados com as palavras chave nas bases científicas Web of Science, Scopus e Scielo.....	83
<b>Tabela 5</b> - Número de artigos publicados com as combinações das palavras chaves nas bases de dados Web of Science e Scopus.....	85

### CAPÍTULO 3

#### Biossensor a Base de Nanopartículas de Mesocarpo de Babaçu (*Orbignya phalerata* Mart) para Detecção Indireta de Sulfito em Sucos Industrializados

<b>Tabela 1</b> – Características da curva de calibração do sulfito frente ao biossensor ECP/MBNPs/QUIT/GA/PFO.....	114
---	-----

<b>Tabela 2-</b> Comparação dos parâmetros analíticos obtidos usando diferentes biossensores para determinação de sulfito.....	114
<b>Tabela 3-</b> Concentração de sulfito em 3 amostras de sucos industrializados usando o biosensor ECP/MBNPs/QUIT/GA/PFO.....	116
<b>Tabela 4 -</b> Recuperação de sulfito em amostras comerciais de suco previamente enriquecidas.....	117

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<b>DLS</b>	Espalhamento Dinâmico da Luz
<b>DMSO</b>	N,N Dimetilsufóxido
<b>ECP</b>	Eletrodo de Carbono Grafite Pirolítico
<b>ECS</b>	Eletrodo de Calomelano Saturado
<b>FTIR</b>	Espectroscopia na Região do Infravermelho com Transformada de Forrier
<b>GA</b>	Glutaraldeído
<b>IDA</b>	Ingestão Diária Aceitável
<b>INPI</b>	Instituto Nacional de Propriedade Intelectual
<b>IUBMB</b>	Nomenclatura da União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular
<b>IUPAC</b>	União Internacional de Química Pura e Aplicada
<b>LD</b>	Limite de Detecção
<b>LQ</b>	Limite de Quantificação
<b>MB</b>	Mesocarpo de Babaçu
<b>MBNPs</b>	Nanopartículas do Mesocarpo de Babaçu
<b>MEV</b>	Microscopia Eletrônica de Varredura
<b>PDI</b>	Índice de Polidispersão
<b>PFO</b>	Polifenol Oxidase
<b>PVP</b>	Polivinilpirrolidona
<b>QUIT</b>	Quitosana
<b>SO<sub>2</sub></b>	Dióxido de Enxofre
<b>USPTO</b>	Escritório de Patentes e Marcas dos Estados Unidos
<b>VC</b>	Voltametria Cíclica
<b>VOQ</b>	Voltametria de Onda Quadrada



## SUMÁRIO

<b>INTRODUÇÃO</b> .....	20
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	22
<b>CAPÍTULO 1- REFERENCIAL BIBLIOGRAFICO</b> .....	25
<b>1. POLÍMERO NATURAIS</b> .....	26
1.1 Nanopartículas Poliméricas .....	27
1.2 Mesocarpo de Babaçu ( <i>Orbignya phareolata</i> Mart) .....	29
1.3 Quitosana.....	31
<b>2. ENZIMAS</b> .....	32
2.1 Polifenol Oxidase (PFO).....	34
<b>3. BIOSSENSORES</b> .....	36
3.1 Biossensores Enzimáticos.....	38
3.2 Biossensores Baseados na Inibição Enzimática.....	39
3.2.1 Inibição Irreversível.....	40
3.2.2 Inibição Reversível.....	41
3.3 Imobilização Enzimática.....	43
3.3.1 Adsorção Física.....	44
3.3.2 Ligação Covalente.....	45
3.3.3 Ligação Covalente Cruzada.....	45
3.3.4 Aprisionamento.....	45
<b>4. ADITIVOS ALIMENTARES</b> .....	46

4.1 Sulfitos.....	47
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>53</b>

<b>CAPÍTULO 2 - ARTIGO DE PROSPECÇÃO CIENTÍFICA E TECNOLÓGICA- Uso de Nanopartículas do Mesocarpo do Babaçu (<i>Orbignya Phalerata</i> Mart) como Plataforma para Anclagem de Enzimas no Desenvolvimento de Biossensores: Um Mapeamento Tecnológico .....</b>	<b>73</b>
---	-----------

<b>RESUMO.....</b>	<b>74</b>
<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>75</b>
<b>2. METODOLOGIA.....</b>	<b>78</b>
<b>3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>79</b>
3.1 Análise das Patentes Publicadas.....	79
3.2 Análise dos Artigos Publicados.....	82
<b>4. CONCLUSÃO.....</b>	<b>87</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>87</b>

<b>CAPÍTULO 3 - ARTIGO CIENTÍFICO: Biossensor a Base de Nanopartículas de Mesocarpo de Babaçu (<i>Orbignya phalerata</i> Mart) para Detecção Indireta de Sulfito em Sucos Industrializados.....</b>	<b>91</b>
---	-----------

<b>RESUMO .....</b>	<b>93</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>94</b>
<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>95</b>
<b>2. EXPERIMENTAL.....</b>	<b>97</b>
2.1 Materiais e Reagentes.....	97
2.2 Síntese das MBNPs.....	98

2.2.1 Espalhamento Dinâmico da Luz (DLS) e Potencial Zeta.....	98
2.2.2 Microscopia Eletrônica de Varredura.....	98
2.3 Preparação do Extrato Bruto Enzimático.....	99
2.3.1 Determinação da Atividade da PFO no Extrato Bruto.....	99
2.3.2 Determinação de Proteínas Solúveis Totais no Extrato Bruto.....	100
2.4 Preparação do Biossensor ECP/MBNPs/QUIT/GA/PFO.....	100
2.5 Espectroscopia na Região do Infravermelho com Transformada de Forrier-FTIR das camadas do Biossensor.....	102
2.6 Medidas Eletroquímicas do Sistema ECP/MBNPs/QUIT/GA/PFO.....	102
2.7 Determinação Indireta de Sulfito em Amostras de Suco Industrializado.....	102
2.8 Teste de Interferentes.....	102
<b>3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>103</b>
3.1 Caracterização das Nanopartículas MBNPs.....	103
3.2 Determinação da Atividade e a Concentração de Proteínas Totais da PFO.....	105
3.3 Espectroscopia na Região do Infravermelho com Transformada de Forrier-FTIR das camadas do Biossensor.....	105
3.4 Comportamento Eletroquímico do Catecol no Biossensor ECP/MBNPs/QUIT/GA/PFO.....	106
3.5 Efeito do pH.....	108
3.6 Efeito da Velocidade de Varredura.....	109
3.7 Desempenho Analítico do Biossensor ECP/MBNPs/QUIT/GA/PFO na Presença de Sulfito.....	110
3.8 Determinação Indireta do Sulfito por Voltametria de Onda Quadrada.....	112

3.9 Determinação Indireta de Sulfito em Amostras de Suco Industrializado.....	116
3.10 Teste de Interferentes.....	117
<b>4. CONCLUSÃO.....</b>	<b>119</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>119</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>126</b>

## INTRODUÇÃO

Com o desenvolvimento da agricultura moderna e da indústria de alimentos, percebe-se uma mudança nos hábitos alimentares da população mundial, o que tem atraído a atenção dos órgãos reguladores como um todo, principalmente pela substituição de alimentos *in natura* por alimentos processados, o que vem aumentando consideravelmente o consumo de aditivos alimentares (Sandhi *et al*, 2005; Bathinapatla *et al*, 2015).

Com o advento da modernidade e o crescimento da indústria química e alimentícia, a humanidade sentiu a necessidade de processar os alimentos de forma a conservar pelo maior tempo possível, visando garantir a sobrevivência em períodos de escassez, como em invernos ou secas rigorosas (Polônio & Peres, 2009).

No passado, os alimentos eram fabricados e produzidos na mesma região ou em regiões próximas àquelas de comercialização. Atualmente, com a globalização e o desenvolvimento da logística a nível nacional e internacional, o alimento processado normalmente é transportado em grandes distâncias para chegar aos consumidores, necessitando o uso de aditivos e conservantes para garantir sua integridade, evitando sua contaminação e deterioração (Cheng *et al*, 2010; Lener & Lerner, 2011).

De acordo com o Comitê de Segurança Alimentar do Conselho Alimentar e Nutricional, os aditivos alimentares podem ser definidos como uma substância, ou mistura de substâncias, que não sejam gêneros alimentícios de base, mas cuja adição intencional ao alimento em suas fases de fabricação, elaboração, preparação, tratamento, envasamento, empacotamento, transporte ou armazenamento, resulte na modificação das características físicas, químicas, biológicas ou sensoriais do alimento (Branen *et al*, 2005).

Apesar dos aditivos serem utilizados na maioria das vezes com o intuito de aumentar o tempo de vida útil dos produtos alimentícios, diversos estudos apontam reações adversas aos aditivos, quer seja aguda ou crônica, desde reações tóxicas desencadeantes de alergias, até o desenvolvimento de tumores carcinogênicos, estes últimos observados a longo prazo (Pollock, 1991; Sugimura *et al*, 2003).

Dentre os aditivos largamente utilizados na indústria de alimentos, podemos destacar os agentes sulfitantes, que incluem o dióxido de enxofre (SO<sub>2</sub>) e seus sais de sódio, potássio e cálcio. Estes aditivos alimentares atuam como conservantes, atuando na inibição da deterioração provocada por bactérias, bolores e leveduras em alimentos, e na inibição de reações de escurecimento enzimático e não enzimático durante processamento e estocagem (Pizzoferrato *et al*, 1998; Machado e Toledo, 2006; Oliveira *et al*, 2008).

Embora os sulfitos sejam amplamente utilizados na indústria de alimentos, o emprego deste aditivo como conservante acarreta alguns problemas, como a redução da biodisponibilidade de algumas vitaminas tais como a: tiamina (B1), ácido fólico (B9), piridoxina e a nicotinamida, reduzindo a qualidade nutricional dos alimentos tratados (Machado e Toledo, 2006; Scampicchio *et al*, 2008). Também foram relatados na literatura sintomas como dermatites, brocoesposmos, urticária, rubor, hipotensão, dor abdominal e diarreia (Branen *et al*, 2005; Machado e Toledo, 2006; Stohs & Miller, 2014).

Diante desta problemática, percebe-se a necessidade de métodos que sejam eficientes e rápidos na monitoração dos níveis de sulfito em alimentos, no sentido de manter o cumprimento das diretrizes reguladoras propostas pelas legislações vigentes.

Nas análises em produtos alimentícios, os biossensores têm sido utilizados principalmente na detecção de compostos químicos e biológicos uma vez que estes dispositivos permitem a quantificação dos componentes que são encontrados naturalmente e daqueles que são adicionados intencionalmente, como alguns aditivos e vitaminas (Oliveira e Pereira, 2016).

A tendência hoje nos estudos envolvendo os biossensores é a combinação destes com nanotecnologia por meio uso de nanopartículas, devido às propriedades elétricas e químicas únicas de nanomateriais, que tm o potencial de melhorar a velocidade de resposta, a sensibilidade e a selectividade para satisfazer a necessidade de detecção de contaminantes em amostras complexas de alimentos (Warriner *et al*, 2014; Govindhan *et al*, 2014)

Nesta perspectiva, o presente trabalho apresenta o desenvolvimento de um biossensor eletroquímico a base de nanopartículas do mesocarpo de babaçu (*Orbignya Phalerata* Mart), do polímero natural quitosana e da enzima polifenol oxidase, como uma alternativa para monitorar os níveis de sulfitos em alimentos.

O biossensor foi proposto por ser um dispositivo simples, que apresenta elevada sensibilidade, além de utilizar materiais de baixo custo como os polímeros naturais (Rawal *et al*, 2012).

O polímero natural utilizado na síntese das nanopartículas poliméricas (MBNPs), o mesocarpo de babaçu, é um material lignocelulósico derivado do coco do babaçu (*Orbignya phareolata* Mart), encontrado entre o epicarpo e o endocarpo, caracterizando-se por ser um produto não-tóxico, renovável e biodegradável (Vieira *et al*, 2009; Lorenzi *et al*, 2010; Liu *et al*, 2007). O outro polímero natural utilizado na construção do biossensor é a quitosana, que é a forma desacetilada da quitina, encontrada na parede das plantas inferiores e esqueléticas de artrópodes e moluscos (Gupta e Jabrail, 2006). Este material caracteriza-se por ser de baixo custo, renovável e biodegradável, possuindo estrutura molecular similar à da celulose, diferenciando-se somente nos grupos funcionais, onde são verificados a presença de grupos amino (NH<sub>2</sub>) na estrutura da quitosana (Krajewska, 2004; Berger *et al*, 2004).

A enzima polifenol oxidase pertence ao grupo das oxidoredutases e apresenta o cobre como sítio ativo, sendo capaz de catalisar as reações de hidroxilação de monofenóis a difenóis, e de oxidação difenóis a o-quinonas (Juana *et al*, 2002; Haghbeen *et al*, 2003).

Diante do que foi exposto, acredita-se que o biossensor construído seja uma alternativa viável para a monitoração dos agentes sulfitantes, visto que este dispositivo se mostrou eficiente na detecção deste aditivo em amostras reais, além de utilizar materiais naturais e de baixo custo no seu desenvolvimento.

## REFERENCIAS

Bathinapatla, A.; Kanchi, S.; Singh, P.; Sabela, M.I.; Bisetty, K. Fabrication of copper nanoparticles decorated multiwalled carbon nanotubes as a high performance electrochemical sensor for the detection of neotame. **Biosensors Bioelectronics**, v.67, p. 200-207, 2015.

Berger, J.; Reist, M.; Mayer, J. M.; Felt, O.; Peppas, N. A.; Gurny, R. Structure and interactions in covalently and ionically crosslinked chitosan hydrogels for biomedical applications. **European Journal Pharmaceutics Biopharmaceutics**, v. 57, p.19-34, 2004.

Branen, A.L.; Davidson, R.M.; Salminen, Thorngate, J.H. Food Additives. In: **Introduction to Food Additives** Branen, A.L.; Haggerty, R.J. New York: Marcel Dekker, p.1-11, 2005

Cheng, H.; Friis, A.; Leth T. Partition of selected food preservatives in fish oil–water systems. **Food Chemistry**, v. 122, p.60–64, 2010.

Govindhan, M.; Adhikari, B.R.; Chen, A. Detecção eletroquímica baseada em nanomateriais de contaminantes químicos. **RSC Advances**, v. 4, p.63741 – 63760, 2014.

Gupta, K. C.; Jabrail, F. H. Effects of degree of deacetylation and cross-linking on physical characteristics, swelling and release behavior of chitosan microspheres. **Carbohydrate Polymer**, v. 66, p. 43-54, 2006.

Hagbbeen, K.; Tan, E.W. Direct spectrophotometric assay of monooxygenase and oxidase activities of mushroom tyrosinase in the presence of synthetic and natural substrates. **Analytical Biochemistry**, v. 312, p. 23-32, 2003.

Juana, C.; Soledad, C.; G. Francisco, G. Tyrosinase kinetics: a semi-quantitative model of the mechanism of oxidation of monohydric and dihydric phenolic substrate-reply. **Journal of Theoretical Biology**, v. 214, p. 321-325, 2002.

Krajewska, B. Application of chitin- and chitosan-based materials for enzyme immobilizations: a review. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 35, p.126-139, 2004.

Lerner, B.W.; Lerner, K.L. **Food: in context**. Farmington Hills, Michigan.: Cengage Learning, 2011.

Liu, C.F.; Sun, R.C.; Zhang, A.P.; Ren, J.L.; Wang, X.A.; Qin, M.H.; Chao, Z.N. & Luo, W. Homogeneous modification of sugarcane bagasse cellulose with succinic anhydride using a ionic liquid as reaction medium. **Carbohydrate Research**, v. 342, n. 7, p. 919–926, 2007.

Lorenzi, H. **Flora brasileira Lorenzi: Arecaceae (palmeiras)**. 1 ed. São Paulo: Nova Odessa, 367, p. 2010.

Machado, R.M.; Toledo, M.C. Sulfitos em Alimentos. **Brazilian Journal Food Technology**, v.9, n. 4, p. 265-75, 2006.

Oliveira, A. E. F.; Pereira, A. C. Biossensores e a Indústria Alimentar – Revisão. **Revista Virtual de Química**, v.8, n. 5, p. 1311-1333, 2016.

Oliveira, T.M.; Soares, N.F.; Paula, C.D.; Viana, G.A. Uso de embalagem ativa na inibição do escurecimento enzimático de maçãs. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 29, n. 1, p. 117-128, 2008.



Pizzoferrato, L.; Di Lullo, G.; Quattrucci, E. Determination of free, bound and total sulphites in foods by indirect photometry-HPLC. **Food Chemistry**, v.63, n. 2, p.275-79, 1998.

Pollock, I. Hyperactivity and food additives. **Bibliotheca Nutritio Et Dieta – Journals**, v. 48, p.81-89, 1991.

Polônio, M.L.T.; Peres, F. Consumo de aditivos alimentares e efeitos à saúde: desafios para a saúde pública brasileira. **Caderno Saúde Pública**, v. 25, n. 8, p.1653-166, 2009.

Rawal, R.; Chawla, S.; Pundir, C.S. An electrochemical sulfite biosensor based on gold coated magnetic nanoparticles modified gold electrode. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 31, p.144–150, 2012.

Sandhi, M.B.; Pinheiro, A.R.O.; Sichieri, R.; Monteiro, C.A.; Filho, M.B.; Schmidt, M.I. Análise da Estratégia Global para Alimentação, Atividade Física e Saúde, da Organização Mundial da Saúde. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v.14, p.41-68, 2005.

Scampicchio, M.; Lawrence, N.S.; Arecchi, A.; Mannino, S. Determination of Sulfite in Wine by Linear Sweep Voltammetry. **Electroanalysis**, v.20, n. 4, p.444-447, 2008.

Stohs, S.J.; Miller, M. J. S. A case study involving allergic reactions to sulfur-containing compounds including, sulfite, taurine, acesulfame potassium and sulfonamides. **Food Chemical Toxicology**, v. 63, p.240–243, 2014.

Sugimura, T.; Wakabayashi, K. Carcinogênios nos alimentos. In: Shills, M.E.; Olson, J.A.; Moshi, S.; Rossi, C. organizadores. **Tratado de nutrição moderna na saúde e na doença**. v. II. 9ª Ed. Barueri: Editora Manole, p. 1343-345, 2003

Vieira, A. P.; Santana, S. A. A.; Bezerra, C. W. B.; Silva, H. A. S.; Chaves, J. A. P.; Melo J.C.P.; Silva Filho, E.C. & Airoldi, C. Kinetics and thermodynamics of textile dye adsorption from aqueous solutions using babassu coconut mesocarp, **Journal Hazardous Materials**, v. 166, n. 2, p.1272–1278, 2009.

Warriner, K.; Reddy, S.M.; Namvar, A.; Neethirajan, S. Desenvolvimentos em nanopartículas para uso em biossensores para avaliar a segurança e a qualidade dos alimentos. **Trends Food Science Technology**, v. 40, p.183 – 199, 2014.

# **CAPÍTULO 1**

## Referencial Bibliográfico

## REFERENCIAL BIBLIOGRÁFICO

### 1. POLÍMEROS NATURAIS

O avanço tecnológico tem impulsionado a busca por materiais alternativos nos diversos campos da indústria, visando uma redução na quantidade de resíduos gerados, possibilitando ações mais sustentáveis ao meio ambiente. Nessa perspectiva, pesquisas vem sendo desenvolvidas no sentido de substituir os polímeros sintéticos pelos polímeros naturais existentes (Ma *et al*, 2012).

Os polímeros naturais também chamados de biopolímeros, são polímeros formados durante o ciclo de crescimento de organismos vivos, sendo que a síntese destes materiais envolve geralmente reações catalisadas por enzimas, e reações de crescimento de cadeia a partir de monômeros ativados, que são formados dentro das células por processos metabólicos complexos (Franchetti e Marconato, 2006).

Os polímeros naturais podem ser classificados estruturalmente como polissacarídeos, poliésteres e poliamidas, sendo que estes materiais se degradam gerando dióxido de carbono, água e biomassa, como resultado da ação de organismos vivos ou enzimas (Zhang *et al*, 2001).

Estes materiais constituem uma importante fonte de materiais com grande versatilidade química e elevado potencial em diversas aplicações. As suas propriedades podem ser facilmente alteradas por diferentes métodos físicos e químicos (Plank, 2003). Isto permite a seleção de propriedades importantes (Kaplan, 1998), tais como, capacidade de absorção de água e propriedades mecânicas com especificações apropriadas a determinadas aplicações nos setores biomédicos (Bedade e Sutar, 2019), farmacêutico (Lima *et al*, 2018) e de biocombustíveis (Sondhi *et al*, 2018).

O grande diferencial dos polímeros naturais são sua baixa toxicidade, biodegradabilidade, características filmogênicas, disponibilidade e baixo custo, características que possibilitam seu uso em diversas áreas de aplicação, que vão desde a indústria alimentar, até as áreas biomédicas e farmacêuticas (Vandame *et al*, 2002).

Os polímeros naturais podem ser utilizados na fabricação de filmes e revestimentos comestíveis (Elsabee e Abdou, 2013; Vejdani *et al*, 2016), na liberação controlada de fármacos (Takeuchi *et al*, 2017; Kiani *et al*, 2016), na síntese de nanocompósitos (Deng *et al*, 2016) e na síntese de nanopartículas poliméricas (Wang *et al*, 2016).

### **1.1 Nanopartículas Poliméricas**

As nanopartículas poliméricas são definidas como partículas coloidais com tamanho no intervalo de 10-1000 nm, sendo elaboradas a partir de polímeros que podem ter origem natural ou sintética (Kreuter, 1994; Vauthier e Bouchemal, 2009; Kumari *et al*, 2010; Plapied *et al*, 2011).

Podem ser classificados em nanocápsulas e nanoesferas, as quais diferem entre si segundo a composição e organização estrutural (Kumari *et al*, 2010). As nanoesferas podem ser definidas como sistemas nanoparticulados constituídos de uma matriz polimérica densa, cuja massa interna é sólida e possibilita a adsorção de moléculas em sua superfície ou a encapsulação destas no seu interior (Mora-Huertas *et al*, 2010; Rao e Geckeler, 2011). Já as nanocápsulas são sistemas vesiculares, atuando como uma espécie de reservatório, em que as substâncias bioativas são armazenadas em uma cavidade que consiste de um núcleo líquido (óleo ou água) envolvido por material sólido, e/ou são incluídas ou adsorvidas na parede polimérica (Zhang e Webster, 2009; Kumari *et al*, 2011).

As nanopartículas poliméricas são frequentemente empregadas como mecanismos de entrega e liberação de fármacos por serem produzidas a partir de matéria-prima de fácil obtenção, por meio de processos de produção relativamente simples, além de apresentarem-se como estrutura de elevada área superficial, o que proporciona maior interação com os componentes biológicos (Schaffazick *et al*, 2003; Mainardes *et al*, 2009; Jain e Kumar, 2010).

Estes nanomateriais vêm sendo utilizados como materiais suportes na adsorção de biomoléculas pois apresentam elevada área superficial, devido a grandes proporções área-volume, tornando-as mais ativas que seu material na escala macro, fornecendo mais locais para fixação de moléculas biológicas do que as membranas poliméricas convencionalmente usadas (Wang *et al*, 2007).

Possuem alta energia livre de superfície, facilitando a transferência de elétrons do material biológico para a superfície do eletrodo, quando utilizados na modificação do eletrodo para aplicação como biossensor (Luo *et al*, 2006; Mohanraj e Chen, 2007; Ansari e Husain, 2012). Além disso, eles têm o tamanho das nanopartículas é compatível com o das moléculas biológicas, que podem aumentar a atividade e a vida útil das moléculas biológicas após sua imobilização na superfície de materiais nanoestruturados (Fathil *et al*, 2015; Noor e Krull, 2014).

Estudos demonstraram que a imobilização de enzimas nas nanopartículas pode reduzir o desdobramento das proteínas e melhorar a estabilidade e o desempenho das mesmas (Gupta *et al*, 2011).

As nanopartículas poliméricas podem ser preparadas por dois métodos: a partir da dispersão de polímeros pré-formados ou através da polimerização direta de monômeros. Todavia, os métodos mais comumente aplicados são os que fazem uso dos polímeros pré-formados (Reis *et al*, 2006). Quando o material de partida é o polímero já formado, pode-se usar métodos clássicos de preparação como: evaporação do solvente (Wang *et al*, 2010; Tansik *et al*, 2014), nanoprecipitação (Liu *et al*, 2014; Chidambaram *et al*, 2014), *salting-out* (Wheatley *et al*, 2016), diálise (Vu *et al*, 2010) e tecnologia de fluido supercrítico (SCF) (Sekhon, 2010). Quando as nanopartículas poliméricas são sintetizadas por meio da formação direta dos polímeros a partir do seus monômeros, pode-se usar a polimerização por micro-emulsificação (Rao e Geckeler, 2011), mini-emulsão (Udagama *et al*, 2011), emulsão interfacial e radicalar (Gaudin *et al*, 2008).

Dos polímeros existentes, os polímeros naturais têm sido largamente utilizados na síntese de nanopartículas por apresentarem boa biocompatibilidade, não toxicidade e capacidade de serem facilmente modificados melhorando suas propriedades físico-químicas, mecânicas ou químico-biológicas, ampliando as possibilidades de utilização como novos materiais (Maia *et al*, 2004; Liu, *et al*, 2008). Os polímeros naturais também apresentam capacidade em formar géis, e de interagir com espécies dissolvidas, tais como: biomoléculas, fármacos e corantes (Yang *et al*, 2003).

Diante do que foi exposto, o presente trabalho utilizou dois polímeros naturais na construção do biossensor: a quitosana, e o mesocarpo babaçu

(*Orbignya phalerata* Mart), sendo este último na forma de nanopartículas poliméricas.

### 1.2 Mesocarpo de Babaçu (*Orbignya phalerata* Mart)

A palmeira *Orbignya phalerata* Mart, popularmente conhecida como babaçu, é uma planta da família Palmaceas e do gênero *Orbignya*. É nativa do Brasil e cresce em solos com ampla variação de pluviosidade anual, como o semi-árido tropical e tropical úmido (Teixeira, 2008).

O babaçu é uma palmeira brasileira monocaule de grande porte (até 20 m), de tronco cilíndrico medindo até 41 cm de diâmetro e copa em formato de taça, conforme ilustrado na Figura 1 (Henderson, 1995).

**Figura 1.** Palmeira babaçu (*Orbignya phalerata* Mart)

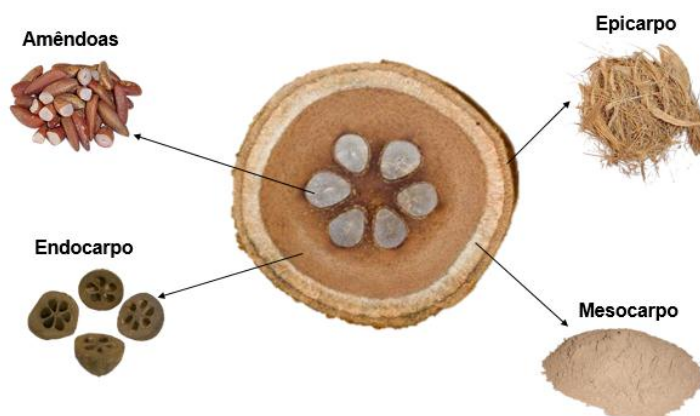


Fonte: O autor (2019)

A palmeira do babaçu é encontrada em países como Bolívia, Suriname e Brasil. No Brasil esta espécie é encontrada na mata dos cocais, que são regiões definidas por apresentar uma alta densidade dessa palmeira, tendo um destaque para os Estados do Maranhão, Tocantins e Piauí (Sousa, 2008; Lorenzi, 2010).

Os frutos do babaçu são conhecidos como cocos, apresentam formato oblongos-elipsóides lisos, com 11,3 x 6,3 cm de diâmetro, pesando de 90 a 280g, de coloração marrom na maturidade (Teixeira, 2008). Os frutos apresentam quatro partes principais conforme mostra a Figura 2: o epicarpo (camada exterior, dura e fibrosa) correspondente a 11% do fruto; o mesocarpo (camada intermediária, fibrosa, rica em amido e taninos localizado entre o epicarpo e o endocarpo) correspondendo a 23% do fruto; o endocarpo (camada interna, rija, altamente resistente, onde ficam as amêndoas) correspondendo a 59% do fruto; e as amêndoas (massa de nutrientes, interna, coberta com um filme marrom) corresponde a 7% do fruto (Albieiro *et al*, 2007; Barros, 2011).

**Figura 2.** Composição física do coco babaçu



Fonte: O autor (2019)

O Mesocarpo de Babaçu (MB) caracteriza-se por ser um polímero natural, não-tóxico, renovável, formado por materiais lignocelulósicos, que são constituídos de mistura de celulose, hemicelulose e lignina, apresentando grande potencial para uso na área industrial (Vieira *et al*, 2009).

É obtido a partir do fruto do babaçu seco e moído em pó, denominado farinha de mesocarpo de babaçu (Balick, 1987; Carrazza *et al*, 2012). Este produto é amplamente comercializado no nordeste do Brasil, como suplemento alimentar para adultos e crianças, e na alimentação animal (Souza *et al*, 2011; Rostagno *et al*, 2011).

O pó do mesocarpo do babaçu apresenta algumas propriedades anti-inflamatórias e analgésicas já comprovadas (Brito Filho *et al*, 2006; Azevedo *et*

*al*, 2007), além de propriedades antitumorais (Rennó *et al*, 2008; Fortes *et al*, 2009), antitrombóticas (Azevedo *et al*, 2007) e antimicrobianas (Caetano *et al*, 2002).

Assim como outros materiais lignocelulósicos, o mesocarpo de babaçu é capaz de reagir com uma variedade de substâncias devido à sua elevada reatividade em relação aos grupos hidroxilas disponíveis na superfície de polissacarídeos (celulose, lignina) (Liu *et al*, 2007).

### 1.3 Quitosana

A quitosana (QUIT) é um polissacarídeo natural que ocorre em alguns fungos como os da classe Zygomycetes, sendo geralmente obtida por meio da desacetilação parcial da quitina, o principal composto dos exoesqueletos de crustáceos (Pochanavanich *et al*, 2002; Pillai, *et al*, 2009).

Este polímero natural, possui uma estrutura molecular similar a da celulose, diferenciando-se somente nos grupos funcionais. A estrutura química da quitosana apresenta um grupo amino e dois grupos hidroxila potencialmente capazes de se reticularem com diferentes substâncias (Goosen, 1996; Azevedo *et al*, 2007). Estruturalmente, a quitosana é um heteropolímero catiônico que consiste em unidades de D-glucosamina e N-acetilglucosamina ligadas por ligações glicosídicas  $\beta$ - (1-4) (Ngo *et al*, 2015).

A quitosana é uma base fraca e insolúvel em água, mas solúvel em soluções ácidas aquosas diluídas abaixo do seu pKa (~ 6,3), em que se pode converter unidades de (-NH<sub>2</sub>) para a forma protonada solúvel (-NH<sup>3+</sup>). A solubilidade da quitosana depende da sua origem biológica, peso molecular e grau de acetilação (Assis, 2010; Shepherd *et al*, 1997).

Dentre as características da quitosana que a torna um dos polímeros naturais mais utilizados na atualidade, podemos destacar sua biocompatibilidade, biodegradabilidade, baixa toxicidade, além de uma variedade de atividades biológicas, incluindo atividade antimicrobiana (Elsabee *et al*, 2009; Kang, *et al*, 2009).

Atualmente, as maiores aplicações da quitosana estão centradas na purificação da água, no processamento de alimentos e na quelação de íons metálicos (Guibal, 2004; Badawi *et al*, 2017). A tendência atual para aplicações industriais concentra-se em produtos de alto valor agregado, como cosméticos



(Corinaldesi et al, 2017), agentes de liberação de fármacos no organismo (Shariatinia, 2019), aditivos alimentares (Mujtaba et al, 2019) e produtos farmacêuticos (Kumar, 2000; Gavhane et al, 2013). Estudos também apontam o grande potencial da quitosana na área de biotecnologia, podendo ser utilizada na forma de flocos, gel ou membrana na imobilização de células em meios de cultura (Tsigos et al, 2000; Peter, 2005).

A quitosana também tem se destacado pela sua capacidade filmogênica, principalmente no uso de filmes e revestimentos comestíveis (Elsabee & Abdou, 2013). As propriedades da quitosana, que fazem desta uma eficiente matriz filmogênica, são suas propriedades intrínsecas (biodegradabilidade, biocompatibilidade, bioadesividade, hidrofiliabilidade) e principalmente seu caráter policatiónico em meio ácido e sua capacidade de formar ligações de hidrogênios (Deng et al, 2007).

Ressalta-se ainda que a quitosana pode ser empregada na imobilização de enzimas para a construção de biossensores devido ao elevado número de grupos aminos e hidroxilas presentes em sua estrutura (Goosen, 1996). Como agente reticulante para a quitosana, pode-se utilizar o glutaraldeído, por meio de ligação dos grupamentos CHO dos aldeídos com os grupos NH<sub>2</sub> da quitosana, formando uma rede polimérica (Guo et al, 2009; Xie et al, 2008).

## **2. ENZIMA**

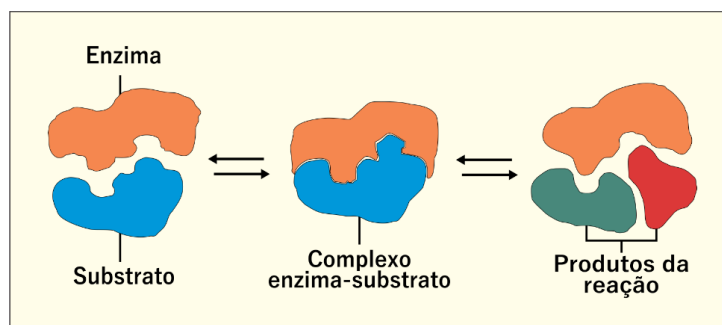
Enzimas são, em sua maioria, proteínas de elevado peso molecular, formadas por aminoácidos ligados covalentemente entre si por ligações peptídicas, sendo a sua conformação e estabilidade da estrutura molecular, mantidas por ligações fracas tais como: ligações de hidrogênio e forças de *Van der Waals* (Nelson et al, 2004).

Segundo Mariotti (2000), as enzimas são interessantes por serem produtos biológicos, catalisadores, apresentarem alto grau de especificidade, apresentarem mecanismo de “*turnover*” e serem altamente eficientes, econômicas e atóxicas.

Usadas como catalisadores, as enzimas aceleram as reações através da diminuição da energia de ativação (Nelson et al, 2004). As enzimas se aproximam dos substratos (S) com orientação espacial favorável dentro de uma cavidade denominada sítio ativo, formando um complexo enzima-substrato (ES).

A formação deste complexo conduz a uma diminuição da energia de ativação, aumentando a velocidade da reação. Ao final da reação, o substrato (S) é convertido a produto (P) e a enzima permanece inalterada conforme pode ser verificado na Figura 3 (Woolerton *et al*, 2012).

**Figura 3.** Esquema de reações de catálise envolvendo enzimas



Fonte: Miranda (2015)

Efetivamente, as enzimas aceleram uma reação reversível em ambos os sentidos, sendo seu potencial catalítico, em geral muito maior que os catalisadores sintéticos e inorgânicos (Cabral *et al*, 2003).

Além da sua função catalítica, as enzimas são caracterizadas por sua alta especificidade. A especificidade enzimática consiste na capacidade da enzima ser seletiva a ligações, substratos ou grupos de substratos. Se baseia nas interações entre a molécula do substrato/inibidor e o sítio ativo da enzima (Dixon e Webb, 1979).

Em virtude da sua alta seletividade e poder catalítico, as enzimas vêm sendo muito empregadas na química analítica, bem como na medicina, agricultura, tecnologia de alimentos e estudos ambientais (Fatibello e Vieira, 2002).

De acordo com o Comitê de Nomenclatura da União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular (*Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology – NC-IUBMB*), as enzimas são divididas em 6 classes conforme o tipo de reações que catalisam (Tabela 1).

**Tabela 1.** Classificação das enzimas segundo a IUBMB

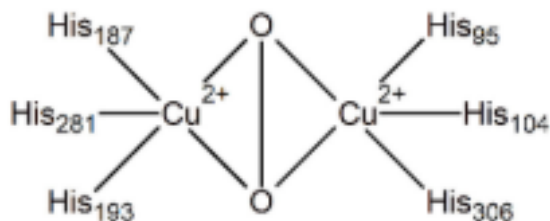
Classe da enzima	Tipo de reação catalisada
1. Oxidoreductase	Reações de oxido-redução
2. Transferases	Transferências de grupos funcionais
3. Hidrolases	Reações de hidrólise
4. Liases	Remoção de grupos para formar ligações duplas (sem ser por hidrólise)
5. Isomerases	Reações de isomerização
6. Ligases	Reações de síntese acopladas à hidrólise de uma molécula de ATP

Muitas são as enzimas que podem ser utilizadas em biossensores, no entanto, as oxidoreductases tem sido as mais utilizadas. Este grupo de enzimas catalisa reações de oxido-redução ou redox que envolvem processos de transferência de elétrons na conversão enzimática do reagente em produto (Cabral *et al*, 2003; Nelson *et al*, 2004). Dentre as enzimas do grupo das oxidoreductases utilizadas na construção de biossensores podemos destacar a enzima polifenol oxidase (PFO).

### 2.1 Polifenol Oxidase (PFO)

A polifenol oxidase (PFO) também conhecida como tirosinase, catecoloxidase, catecolase e creolase, é uma metaloenzima, contendo dois átomos de Cu (II) como sítios ativos, cada um coordenado com três moléculas de histidina, conforme ilustrado na Figura 4. (Duran *et al*, 2002; Mayer, 2006)

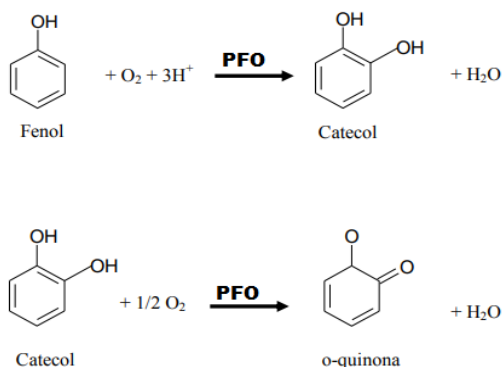
**Figura 4.** Modelo esquemático do sítio ativo da polifenol oxidase



Fonte: Sae-leaw & Benjakul (2019)

A PFO catalisa a oxidação de compostos fenólicos por meio de duas reações, a hidroxilação de monofenóis gerando *o*-difenóis, e a oxidação de difenóis gerando *o*-quinonas; onde ambas as reações acontecem na presença de oxigênio molecular (Rosatto *et al*, 2001; Cestari *et al*, 2002; Zamorano *et al*, 2009; Wu *et al*, 2013). As quinonas por sua vez sofrem polimerização e formam pigmentos escuros (marrons ou pretos) e insolúveis, as melaninas (Gawlik-Dziki *et al*, 2008; Rolff *et al*, 2011). A Figura 5 mostra o esquema das reações catalisadas pela enzima PFO.

**Figura 5.** Mecanismo de catalise enzimática do fenol para *o*-quinona pela PFO na presença de H<sub>2</sub>



Fonte: Adaptada Xiaohui *et al* (2019)

A PFO é amplamente encontrada na natureza em animais, plantas, fungos e bactérias, fazendo parte de um grande número de reações biológicas (Fenoll *et al*, 2001). Nas plantas, a PFO está localizada nos plastídeos, onde

após a ocorrência de danos mecânicos, cortes ou outros tipos de injúrias, as paredes e as membranas podem ser corrompidas, comprometendo a separação física entre a enzima (localizadas nos plastídeos) e os substratos fenólicos (presentes nos vacúolos) (Lee, 2000; Marshall *et al*, 2000; Mayer, 2006).

O contato da PFO com os substratos fenólicos leva a uma reação conhecida como escurecimento enzimático, afetando negativamente a cor, sabor, propriedades nutricionais e a vida útil de prateleira de produtos alimentares (Whitaker *et al*, 1995). Este problema é de importância considerável para a indústria alimentícia, visto que a medida em que a qualidade e a aparência nutricional do produto é afetada, observa-se uma redução na aceitação, causando um impacto econômico negativo significativo, tanto para os produtores de alimentos, quanto para a indústria de processamento de alimentos (Nuñez-Delicado *et al*, 2005).

O escurecimento enzimático da PFO pode ser inibido pelos agentes sulfitantes, que, por sua capacidade redutora, agem competitivamente com o oxigênio, por ação direta sobre a polifenol oxidase, ou por combinação irreversível com as *o*-quinonas, formando produtos incolores e prevenindo a polimerização a melaninas (Gould *et al*, 1991, Valero *et al*, 1991; Taylor, 1993).

Dessa forma os biossensores a base da enzima PFO podem ser embasados na inibição enzimática, detectando tanto o decréscimo da quantidade de oxigênio do meio reacional, quanto a formação da *o*-quinona em presença do agente inibidor (Marques e Yamanaka, 2008).

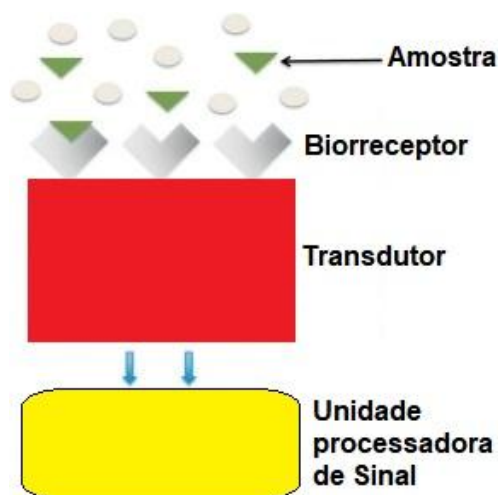
### **3. BIOSSENSORES**

Um biossensor é um dispositivo analítico que utiliza um material biológico (enzima, antígeno, anticorpo, organismo, tecido animal ou vegetal, célula micro-organismo, entre outros) conectado a um transdutor, o qual converte o sinal biológico em um sinal elétrico mensurável (Fatibello & Capelato, 1992; Farré *et al*, 2009; Hasan *et al*, 2014).

A IUPAC (*International Union of Pure and Applied Chemistry*) define biossensor como “instrumento integrado que é capaz de fornecer uma informação analítica específica, quantitativa ou semi-quantitativa através do uso de um componente biológico (bioreceptor) que está em contato direto com o elemento de transdução” (Thévenot *et al*, 2001).

De um modo geral, um biossensor é formado de três partes: o componente biológico, o transdutor e a unidade processadora de sinal. O componente biológico faz o reconhecimento da substância de interesse por meio de uma reação química gerando um sinal que pode resultar de uma variação na concentração de prótons, liberação de gases, emissão ou absorção de luz, emissão de calor, variação de massa, mudança de estado de oxidação, etc. O transdutor converte este sinal em uma resposta mensurável tal como: corrente, potencial, variação de temperatura, etc. (Pathak *et al*, 2007). A unidade processadora de sinal, funciona como um detector que filtra, amplifica e analisa o sinal transduzido, transferindo-o para um monitor ou armazenando-o em algum dispositivo (Raiteri *et al*, 2002). A Figura 6 representa o esquema de funcionamento de um biossensor.

**Figura 6.** Funcionamento de um biossensor



Fonte: O autor (2019)

Os biossensores podem ser classificados de acordo com o elemento transdutor, que pode ser eletroquímico (amperométrico, potenciométrico, condutimétrico), óptico (por medidas de luminescência, fluorescência, elipsometria, etc), e piezoelétrico (relacionado as variações de massa e microviscosidade) (Skladal, 2003). Ou ainda de acordo com o componente biológico: enzimas, organelas, tecido vegetal ou animal, microorganismos, antígeno ou anticorpo, ácidos nucleicos, lectina, dentre outros (Li *et al*, 2007).

Os biossensores eletroquímicos utilizam o eletrodo como elemento de transdução, e são os mais usados para análises por possuírem resposta rápida, serem econômicos e terem capacidade de automação, além de poderem avaliar um número elevado de amostras (Wang, 2000; Mello e Kubota, 2007).

Seu princípio baseia-se no fluxo de elétrons entre uma espécie eletroativa e a superfície do eletrodo. A corrente resultante é medida por diferentes técnicas eletroquímicas que variam de acordo com a natureza da transdução (Stradiotto *et al*, 2003). Durante este processo, ocorrem alterações químicas nos eletrodos e a carga é conduzida através da maior parte da fase da amostra. Ambas as reações no eletrodo e/ou o transporte de carga pode ser modulada quimicamente e servir como base no processo de detecção (Janata, 1989).

Uma das características mais importantes de um biossensor é sua seletividade, ou seja, sua capacidade de discriminar o analito na presença de diferentes espécies, função essa atribuída principalmente ao material biológico imobilizado (Eggins, 1996). Além da seletividade, o custo relativamente baixo de construção e estocagem, alta sensibilidade, potencial para miniaturização, facilidade de automação e possibilidade de construção de equipamentos simples e portáteis, tornam os biossensores úteis em uma variedade de campos, incluindo cuidados de saúde, monitoramento ambiental e análise biológica entre outros (Rosatto, 2000; Mehrvar e Abdi, 2004; Song *et al*, 2006).

O biossensor mais estudado e talvez o mais utilizado é aquele em que o componente biológico são as enzimas. Isto se deve ao fato das enzimas serem catalisadores biológicos altamente específicas e seletivas que permitem detectar analitos mesmo que em baixas concentrações (Du, *et al*, 2008; Skoog *et al*, 2009).

### **3.1 Biossensores Enzimáticos**

Nesses tipos de dispositivos, o componente biológico ligado ao transdutor é uma enzima. Neste caso, a amostra é colocada em contato com a enzima imobilizada, a qual reage com o analito produzindo espécies como amônia, dióxido de carbono, íons hidrogênio ou peróxido de hidrogênio dentre outros. A concentração dessas espécies, as quais são proporcionais à concentração dos analitos, é determinada pelo transdutor (Skoog *et al*, 2009).

Quando a enzima é o componente biológico, e o transdutor é eletroquímico, os biossensores são chamados de eletrodos enzimáticos (Melo *et al*, 2002). No biossensor enzimático eletroquímico, o analito na camada de reconhecimento pode ser oxidado ou reduzido, gerando uma corrente que é proporcional a sua concentração. O consumo de reagente ou o aparecimento de algum produto da reação entre o material biológico e o substrato de interesse (analito) é então monitorado pelo biossensor eletroquímico (Nikolelis *et al*, 2014).

O fato das reações enzimáticas serem altamente específicas, possuindo um grande potencial catalítico, superior a qualquer catalisador sintético, possibilita que biossensores baseados nestes biocatalisadores sejam utilizados mesmo na presença de outras substâncias na amostra (Fernandes, 2012).

Vários estudos apresentam o desenvolvimento de biossensores a partir do uso de vegetais como fonte enzimática (Vieira *et al*, 2003; Gil *et al*, 2009; Silva *et al*, 2018). A função do extrato enzimático é de gerar ou consumir espécies eletroativas em uma relação estequiométrica com seu substrato ou analito alvo. Muitos extratos de frutos, legumes e verduras foram empregados com sucesso como fonte de peroxidase ou polifenol oxidase (Oliveira e Vieira, 2006; Fatibello-Filho *et al*, 2007; Silva *et al*, 2011; Garcia *et al*, 2016; Muenchen *et al*, 2018).

A substituição de enzimas purificadas por extratos brutos e/ou tecidos vegetais no desenvolvimento de biossensores também foram relatados na literatura (Oliveira *et al*, 2012; Ribeiro *et al*, 2013; Sadeghi *et al*, 2014). O uso de extratos brutos pode apresentar, em alguns casos, certa desvantagem na seletividade do método analítico, mas por outro lado é extremamente econômico, simples e geralmente possui um tempo de vida superior àqueles métodos que utilizam enzimas purificadas, visto que essas enzimas naturalmente imobilizadas nas células desses materiais biológicos (seu “habitat” natural) são mais estáveis (Vieira *et al*, 2003).

Dentre os biossensores enzimáticos utilizados, podemos destacar os biossensores de inibição. A detecção de compostos com biossensores baseados na inibição enzimática é recente e vem tendo um crescente avanço na detecção de uma grande quantidade de compostos tóxicos (Wang *et al*, 2014; Amine *et al*, 2015).

### **3.2 Biossensores Baseados na Inibição Enzimática**



A capacidade de alguns analitos de inibir a velocidade das reações catalisadas por enzimas têm sido empregadas no desenvolvimento de biossensores (Amine *et al*, 2015). Os procedimentos baseados na inibição de uma enzima são de grande interesse, uma vez que geralmente podem oferecer alta sensibilidade e, em alguns casos, seletividade (Ciucu *et al*, 2002).

O princípio deste tipo de biossensores baseia-se na quantificação do inibidor, medindo a atividade enzimática na ausência e na presença do inibidor. O estudo da inibição é muitas vezes um ponto chave no campo clínico, porque alguns medicamentos são baseados na inibição das principais enzimas das vias biológicas, enquanto outros inibidores são considerados compostos tóxicos; assim, os biossensores baseados na inibição enzimática são ferramentas confiáveis para a detecção de muitos compostos tóxicos (Amine *et al*, 2016).

O inibidor enzimático pode ser definido como qualquer substância capaz de interferir, de maneira específica, na taxa de uma reação de catálise enzimática, retardando ou reduzindo o processo ou a especificidade biológica da reação (Marques e Yamanaka, 2008).

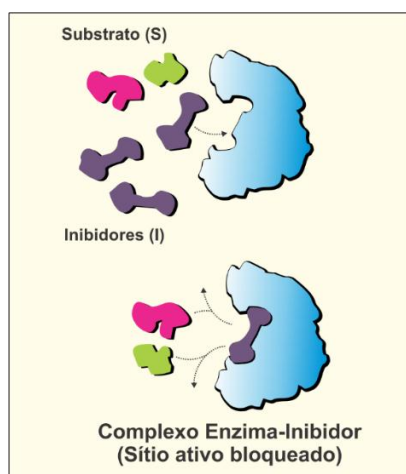
Na ausência do inibidor a enzima catalisa a reação de um substrato gerando um produto, e a reação do produto na superfície do eletrodo produz um sinal de corrente que é proporcional à concentração do substrato. A adição do inibidor ao sistema ocasiona uma diminuição da atividade catalítica da enzima e, conseqüentemente, uma diminuição no sinal de corrente detectado (sinal analítico), o qual é inversamente proporcional à concentração do inibidor (Dixon e Webb, 1979; Pundin e Chauhan, 2012).

Os processos de inibição enzimática estão divididos em dois tipos, inibição reversível e inibição irreversível, sendo que essa classificação baseia-se na natureza química da ligação do inibidor à enzima (Dixon e Webb, 1979; Palmer, 1991; Arduini e Amine, 2013).

### **3.2.1 Inibição Irreversível**

Na inibição irreversível o inibidor se liga ao sítio ativo da enzima por meio de ligações covalentes, resultando na perda permanente da atividade enzimática conforme visualizado na Figura 7 (Kitz e Wilson, 1962; Nelson *et al*, 2004; Amine *et al*, 2006).

**Figura 7.** Mecanismo de inibição irreversível entre o inibidor e o sítio ativo da enzima



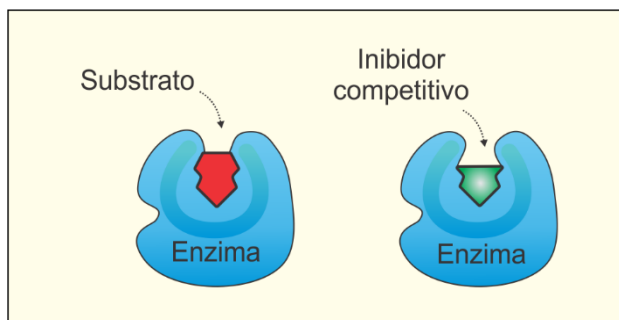
Fonte: O autor (2019)

### 3.2.2 Inibição Reversível

A inibição reversível leva à formação de um complexo em um sistema em equilíbrio, no qual a enzima apresenta um grau definido de inibição, que é dependente das concentrações dos reagentes no meio (enzima, inibidor e substrato), permanecendo constante a partir de um tempo determinado. O processo de inibição reversível pode ser dividido em três tipos básicos, competitivo, não competitivo e incompetitivo (Marques e Yamanaka, 2008).

A inibição reversível competitiva é aquela que o inibidor concorre com o substrato pelo sítio ativo da enzima, conforme Figura 8 (Nelson *et al*, 2004; Dzyadevych *et al*, 2004b). Altas concentrações de substrato podem deslocar o inibidor do centro ativo e, em consequência, a velocidade máxima da reação catalisada pela enzima não é afetada por esta inibição (Amine *et al*, 2014).

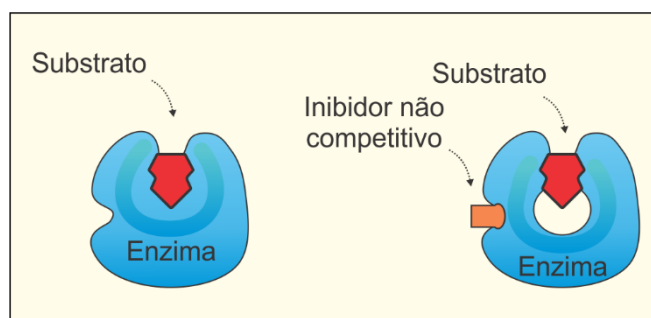
**Figura 8.** Mecanismo de inibição reversível competitiva entre o inibidor e o sítio ativo da enzima



Fonte: Adaptada de Harvey (2012)

A inibição não competitiva ocorre quando o inibidor se liga em um sítio ativo diferente daquele que se liga o substrato, podendo se ligar tanto na enzima livre como no complexo enzima-substrato, Figura 9 (Nelson *et al*, 2004). A formação do complexo inibidor-substrato diminui a formação dos produtos e a velocidade de reação (El-Metwally e El-Senosi, 2010).

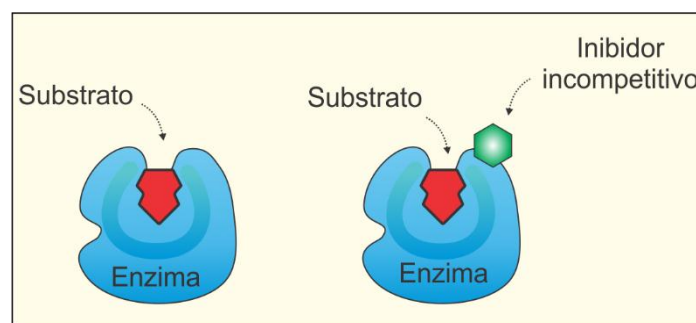
**Figura 9.** Mecanismo de inibição reversível não competitiva entre o inibidor e o sítio ativo da enzima



Fonte: Adaptada de Harvey (2012)

Já a inibição reversível incompetitiva, o inibidor também se liga em sítio ativo diferente daquele que o substrato vai se ligar contudo, o inibidor se ligará apenas no complexo enzima-substrato, Figura 10 (Nelson *et al*, 2004; Arduini *et al*, 2009).

**Figura 10.** Mecanismo de inibição reversível incompetitiva entre o inibidor e o sítio ativo da enzima



Fonte: Adaptada de Harvey (2012)

A eficiência dos biossensores enzimáticos de inibição depende em parte do modo de imobilização enzimática. A imobilização enzimática é realizada, no intuito de manter ou melhorar a estabilidade enzimática (Brito-Madurro *et al*, 2007).

### 3.3 Imobilização Enzimática

Uma das etapas fundamentais na construção de um biossensor é a deposição das enzimas sobre o transdutor ou matrizes suportes por métodos físicos e químicos, este processo é conhecido como imobilização (Oliveira *et al*, 2013). Os métodos de imobilização são baseados em diferentes mecanismos de interação entre o elemento biológico e a superfície do transdutor, onde a enzima imobilizada deve manter sua atividade biológica (Sotomayor *et al* 2002).

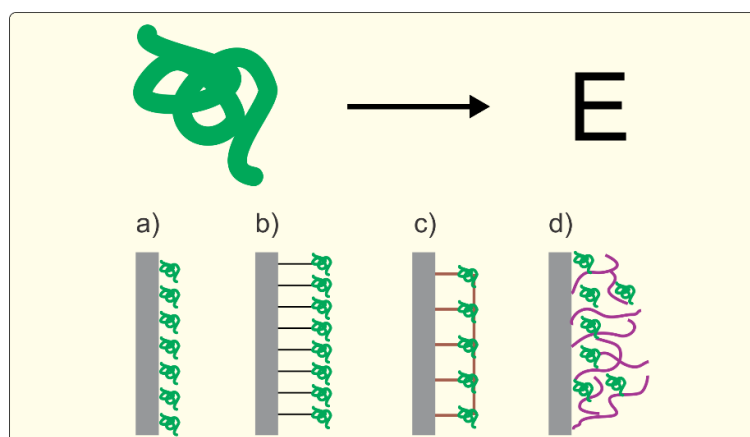
A imobilização enzimática tem por objetivo conseguir um contato íntimo entre a enzima e o eletrodo, mantendo sua atividade, além de livre difusão de substratos e produtos para dentro e para fora da camada biocatalítica (Tischer e Kasche, 1999). O processo de imobilização melhora a estabilidade enzimática e favorece os processos de reutilização da enzima, o que pode reduzir significativamente os custos, e assim tornar a aplicação industrial economicamente viável (Fernandez-Lafuente, 2009). Além disso, a imobilização também pode melhorar a seletividade de algumas enzimas devido à alteração da geometria do centro ativo e estabilização da conformação enzimática (Mateo *et al*, 2007; Cowan e Fernandez-Lafuente, 2011).

Não existe um método ou suporte de imobilização único aplicável a todas as enzimas. Este fato se deve às diferentes características físico-químicas de cada enzima, às diferentes propriedades dos substratos e produtos, e às

diversificadas aplicações dos produtos obtidos (Krajewska, 2004). O processo ideal de imobilização enzimática deve ser rápido e barato. Com relação à matriz utilizada para imobilização enzimática, o uso de matrizes biocompatíveis e inertes é um dos requisitos mais importantes; por exemplo, não deve interferir com a estrutura nativa da enzima e assim comprometer sua atividade biológica (Sassolas *et al*, 2012).

As enzimas podem ser imobilizadas por meio de várias técnicas, porém as mais comuns são: adsorção física, ligação covalente, ligação covalente cruzada e aprisionamento, conforme ilustrado na Figura 11 (Scouten *et al*, 1995; Sassolas *et al*, 2012; Datta *et al*, 2013).

**Figura 11.** Técnicas de imobilização enzimática: a) Adsorção Física, b) Ligação Covalente, c) Ligação Covalente Cruzada, d) Aprisionamento



Fonte: Chaveiro (2013)

### 3.3.1 Adsorção Física

A adsorção física é o método mais simples, mais rápido e o mais empregado para imobilização de enzimas. Nesse método, as enzimas são imobilizadas por interações fracas (ligações de *Van der Waals*, ligações de hidrogênio, ligações iônicas) com o suporte (Alfaya *et al*, 2002).

As principais vantagens deste processo de imobilização são a facilidade e a simplicidade do processo e, além disso, a estrutura conformacional da enzima é pouco alterada, causando uma mínima inativação da enzima, mantendo sua atividade próxima do natural. A grande desvantagem é a

dessorção da enzima devido às variações de temperatura, pH e força iônica (Hanefeld *et al*, 2009; Villeneuve *et al*, 2009).

### 3.3.2 Ligação Covalente

O método de ligação covalente é realizado entre os grupos funcionais da enzima com os grupos funcionais da superfície do eletrodo (Alfaya *et al*, 2002). A principal vantagem dessa técnica é a ligação forte entre a enzima e o substrato, e a fácil interação entre enzima e analito (Sharma *et al*, 2003). Quanto às desvantagens a este método, pode ocorrer perda de atividade catalítica da enzima devido a sua forte interação com o substrato, além de possíveis degradações devido à utilização de determinados reagentes no processo (Gerard *et al*, 2002).

### 3.3.3 Ligação Covalente Cruzada

O método de ligação covalente cruzada consiste na formação de partículas macroscópicas (ou rede poliméricas) em decorrência da formação de ligações covalentes cruzadas entre as moléculas de enzima com reagentes funcionais (Fatibello-Filho *et al*, 1992).

A interação intermolecular da enzima com a superfície do transdutor é feita por intermédio de compostos químicos bifuncionais ou multifuncionais chamados agentes de reticulação, tais como: o glutaraldeído, hexametileno diisocianato, 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzeno, bisdiazobenzidina que têm a capacidade de ligar essas biomoléculas nas superfícies sólidas dos suportes (Sharma *et al*, 2003).

A vantagem do uso desse método de imobilização é que ele cria uma interação enzima-enzima mais sólida evitando lixiviação da mesma, entretanto, por essa mesma razão barreiras de difusão podem ser criadas, aumentando o tempo de resposta do eletrodo (Mulchandani *et al*, 1998; Andreescu, *et al*, 2002; Mikkelsen *et al*, 2004; Nunes *et al*, 2004).

### 3.3.4 Aprisionamento

A imobilização por aprisionamento difere das demais pelo fato da enzima estar em solução, mas seu movimento é restrito pela estrutura em forma de rede de um gel ou polímero. Na maioria das vezes, o método é baseado na

imobilização da enzima durante a síntese do polímero por meio da oxidação eletroquímica do monômero em uma solução contendo a enzima (Bickerstaff, 1997). À medida que a polimerização prossegue, a matriz polimérica se forma em torno da enzima, confinando-a em sua estrutura (Kato *et al*, 2002).

A vantagem da utilização desse método é que o confinamento protege a enzima do contato direto com o meio reacional, minimizando, assim, os efeitos de inativação, por exemplo, por solventes orgânicos (Marconi, 1989). Além disso, esse é o método de imobilização mais fácil de proceder e pode ser empregado para imobilizar um ou mais tipos de proteína com qualquer grau de purificação, além de não promover alterações estruturais nestas biomoléculas (Mateo *et al*, 2007).

Uma das desvantagens deste método de imobilização é que são necessárias altas concentrações de enzima e um monômero em solução, sendo que este procedimento de imobilização diminui a acessibilidade do analito a molécula de enzima (Guimard *et al*, 2007).

Para a construção de biossensores enzimáticos, existe uma grande variedade de enzimas (acetilcolinesterase, lacase, polifenol oxidase, peroxidase, uricase, glucose oxidase, lactato oxidase, entre outras), sendo estas selecionadas de acordo com as características da molécula-alvo a ser detectada (Prakash *et al*, 2013; Durán *et al*, 2002). No caso do presente trabalho, utilizou-se a enzima polifenol oxidase para a construção de um biossensor para a detecção do sulfito em alimentos.

#### **4. ADITIVOS ALIMENTARES**

Segundo a Portaria nº 540/97 da Secretaria de Vigilância Sanitária, os aditivos alimentares podem ser definidos como: “qualquer ingrediente adicionado intencionalmente aos alimentos, sem propósito de nutrir, mas com o objetivo de modificar as características físicas, químicas, biológicas ou sensoriais, durante a fabricação, processamento, preparação, tratamento, embalagem, acondicionamento, armazenagem, transporte ou manipulação de um alimento” (Brasil, 1997).

De acordo com o *Codex Alimentarius*, a primeira coleção internacional de padrões e diretrizes alimentares, "aditivo alimentar", significa "qualquer substância que normalmente não é consumida como alimento por si só, e

normalmente não é usada como ingrediente típico da comida. O termo não inclui "contaminantes" ou substâncias adicionadas aos alimentos para manter ou melhorar as qualidades nutricionais " (Feketea & Tsabouri, 2017).

Os aditivos alimentares podem ser divididos em 6 grupos onde podemos destacar os: conservantes, aditivos nutricionais, agentes corantes, agentes aromatizantes, agentes texturizantes e agentes diversos (Saltmarsh *et al*, 2013).

Embora seja notória a importância dos aditivos sob o ponto de vista tecnológico na produção de alimentos, é necessário estar atento aos possíveis riscos toxicológicos que podem ser acarretados pela ingestão frequente dessas substâncias (Polônio, 2009). Estudos apontam reações adversas aos aditivos, quer seja aguda ou crônica (Pollock, 1981; Willett, 2003; Di Lorenzo *et al*, 2002; Moutinho *et al*, 2007).

Justamente por estas razões, o Joint FAO/WHO *Expert Committee on Food Additives* (JECFA) tem se reunido anualmente desde 1956 para avaliar a segurança dos aditivos alimentares, atualizar e estabelecer as normas de segurança dos aditivos (Wu *et al*, 2013). No Brasil, cabe ao MS, em particular à Comissão Permanente de Aditivos para Alimentos, estabelecer a legislação nacional para esse assunto, tomando como base o resultado de pesquisas internacionais e as recomendações do *Codex Committee on Food Additives and Contaminants* do JECFA, a Comissão que define e fiscaliza o emprego de aditivos pela indústria internacional (Faveiro *et al*, 2011).

#### 4.1 Sulfitos

Os "sulfitos" ou "agentes sulfiteantes" são aditivos alimentares que além do dióxido de enxofre ( $\text{SO}_2$ ), podem ser encontrados na forma de sais de cálcio, potássio ou sódio, tendo como principais representantes o sulfito de sódio ( $\text{Na}_2\text{SO}_3$ ), sulfito de potássio ( $\text{K}_2\text{SO}_3$ ), sulfito de cálcio ( $\text{CaSO}_3$ ) bissulfito sódico ( $\text{NaHSO}_3$ ), bissulfito de potássio ( $\text{KHSO}_3$ ), metabissulfito sódico ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ ), bissulfito de cálcio ( $\text{Ca}(\text{HSO}_3)_2$ ), metabissulfito de potássio ( $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_5$ ) e metabissulfito de sódio ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ ) (Scampicchio *et al*, 2008; Kencebay *et al*, 2013).

Esses compostos são amplamente utilizados na indústria alimentícia como conservantes antioxidantes, antimicrobianos e branqueadores, sendo usados para clarear e estabilizar os produtos alimentícios, prevenir o



crescimento bacteriano, retardar a oxidação dos alimentos que às vezes podem afetar o cheiro e o sabor dos alimentos (Sapers, 1993; Filik *et al*, 2012). O uso dos sulfitos na indústria alimentícia é realizado com o intuito de deixar os alimentos mais atrativos aos consumidores, com a finalidade de preservar a textura, o odor e a cor dos mesmos (Cardoso *et al*, 2007; Rahman & Perera, 1999).

Os sulfitos como agente antioxidantes impedem a oxidação de óleos essenciais e carotenóides, que gerariam distorção de sabores nos alimentos (Baloch *et al*, 1977; Roberts & McWeeny, 1972). Uma função importante dos sulfitos na cerveja e no vinho é a inibição de alterações oxidativas que são consideradas indesejáveis ao sabor do produto (Roberts & McWeeny, 1972; Schroeter, 1966).

A atividade antimicrobiana dos sulfitos é dependente de sua forma química, sendo mais pronunciada em valores de pH inferior a 3, devido à maior liberação de dióxido de enxofre molecular (Taylor *et al*, 1986). O dióxido de enxofre molecular existe como um gás ou molécula simples, com odor e sabor sulfuroso, sendo a única forma que pode atravessar as paredes celulares de leveduras e bactérias (Usseglio-Tomasset, 1992). O alto poder redutor dos agentes sulfitantes, principalmente em microrganismos aeróbios, causa uma diminuição no nível de oxigênio, sendo inviável o crescimento destes microrganismos (Luck & Jager, 1995).

Utilizados como agentes branqueadores, os agentes sulfitantes são responsáveis pela inibição de reações de escurecimento enzimático e não enzimático durante processamento e estocagem (Ribera *et al*, 2001; Mattison *et al*, 2014). No caso do escurecimento enzimático decorrente da enzima polifenol oxidase, os agentes sulfitantes previnem o escurecimento através da redução das o-quinonas para o-difenóis, que são compostos menos escuros; ou pela complexação com produtos da reação enzimática formando compostos de coloração mais clara e estável (Queiroz *et al*, 2006).

Os sulfitos podem ser encontrados em bebidas não alcoólicas (por exemplo, chá concentrado e sucos de frutas), bebidas alcoólicas (como vinho e cerveja), vinagre de vinho, frutas secas, peixes, camarões e alimentos processados, onde o ranço das gorduras precisa ser prevenido (Machado *et al*, 2006; Suh *et al*, 2007; Iammarino *et al*, 2012; Robbins *et al*, 2015).

Os dados nacionais sobre os sulfitos em alimentos, bem como seu consumo pela população, são escassos (Machado *et al*, 2006), no entanto a legislação brasileira vigente determinou uma lista dos alimentos em que os agentes sulfitantes podem ser adicionados, conforme ilustrado na Tabela 2.

**Tabela 2.** Alimentos em que os agentes sulfitantes podem ser adicionados com a função de conservadores e seus respectivos limites máximos, de acordo com a legislação brasileira vigente.

<b>Alimentos</b>	<b>Limite máximo (g/100g- g/100mL) expresso em SO<sub>2</sub> residual</b>
Açúcar refinado	0,002
Batata descascada cozida (somente metabissulfito de sódio)	0,01
Batatas fritas congeladas	0,01
Bebidas alcoólicas fermentadas	0,01
Bebidas alcoólicas mistas	0,01
Bebidas não alcoólicas a base de soja	0,004
Bebidas não alcoólicas gaseificadas e não gaseificadas subcategorias: prontas para o consumo e preparo de líquidos	0,004
Camarões e lagostas (exclusivamente na matéria prima após a captura)	0,003 (no produto cozido)
Camarões e lagostas (exclusivamente na matéria prima após a captura)	0,01 (no produto cru)
Cervejas (somente ditonito)	0,006
Coco ralado	0,02
Cogumelos	0,005
Cooler	0,035
Filtrado doce	0,035
Frutas dessecadas	0,01
Frutose	0,002

Geléias artificiais	0,02
Jeropiga	0,01
Legumes e verduras desidratadas	0,02
Leite de coco esterilizado	0,01
Leite de coco pasteurizado	0,03
Licores de frutas	0,01
Mistela composta	0,025
Néctares de frutas	0,02
Passas de frutas	0,15
Picles	0,01
Polpas de vegetais incluindo cogumelos, fungos, legumes, hortaliças, raízes, tubérculos, castanhas e algas marinhas)	0,03
Raiz forte (polpa de rábano ou wasabi) somente metabissulfito de sódio)	0,05 no p.s.c*
Sangria	0,035
Saquê	0,035
Sidras	0,035
Suco de caju	0,0333 no p.s.c
Suco de caju alto teor de polpa (diluição 1:9)	0,30
Suco de frutas	0,02
Vinagres	0,02
Vinhos	0,035
Vinhos compostos	0,025
Vinhos de frutas	0,035
Xarope de glicose	0,004

\*p.s.c- produto a ser consumido

Fonte: ABIA, 2001; Machado *et al*, 2006

Os primeiros relatos do uso dos sulfitos se reportam aos gregos antigos que utilizavam estes materiais para fumigar casas e aos antigos romanos que faziam o uso destes materiais para esterilizar vasos de vinho (Dipersio *et al*, 2004; Bush *et al*, 1986). Na literatura o uso de SO<sub>2</sub> como conservante de alimentos remonta a 1664, quando foi sugerido que os barris de sidra deveriam conter SO<sub>2</sub> para prevenir a deterioração (Krokida *et al*, 2000; Kelly *et al*, 2002).

Além do uso na indústria alimentícia, os sulfitos são largamente utilizados na indústria farmacêutica como antioxidante, no sentido de manter a estabilidade dos medicamentos (Knodel, 1997). Dentre os produtos farmacêuticos que utilizam os agentes sulfitantes podemos destacar os broncodilatadores, como sulfato de metaproterenol, isoetarina, isoproterenol, micronefrin e vaponefrin; adrenalina injetável; anestésicos locais, como novocain e xilocaina; corticosteróides injetáveis, incluindo celestone, decadron e hidrocortisona; antibióticos injetáveis, incluindo amicacina, gentamicina e tobramicina; antiarrítmicos injetáveis, incluindo pronestil; lidocaína injetável; analgésicos, como demerol; agentes anti-choque, incluindo aramine, intropin e levophed; colírios oftálmológicos, incluindo dexametasona, pred mild, pred fort, prednisolona e sulfacetamida; e soluções para nutrição parenteral total e diálise (Simon, 1984; Huang *et al*, 1984; Schwartz *et al*, 1985).

Embora a aparente segurança dos aditivos de sulfito tenham conduzido ao seu uso generalizado, os relatórios que associam exposição a sulfitos com reações adversas começaram a surgir durante a década de 1970. Em 1973 Kochen descreveu pela primeira vez uma possível correlação entre sulfitos e asma em uma criança que apresentava crises de asma após a ingestão de frutas secas, que segundo ele eram desencadeadas pela liberação do SO<sub>2</sub> na abertura da embalagem que estava hermeticamente fechada (Kochen, 1973).

Em 1976, Prenner e Stevens descreveram o primeiro caso de anafilaxia devido à ingestão de bissulfito sódico (Prenner & Stevens, 1976). E em 1985, Yang e Purchase relataram que nos Estados Unidos houve mais de 250 casos de reações adversas relacionadas ao sulfito, incluindo seis mortes, enquanto no Canadá, foram confirmados 10 casos de reações adversas relacionadas ao sulfito e uma morte (Yang & Purchase, 1985).

Desde então, inúmeras reações têm sido relatadas na literatura relacionadas aos sulfitos, tais como sintomas dermatológicos, pulmonares,

gastrointestinais e cardiovasculares. Os asmáticos que são dependentes de esteróides ou têm um grande grau de hiper-reatividade das vias aéreas, podem estar em maior risco de ter uma reação a um alimento contendo sulfito (Lester, 1995). Distúrbios variáveis de broncoespasmo, angiodema, urticária, dermatite, rubor, hipotensão, náuseas, cólicas abdominais e diarreia são comumente relatados na literatura associados a estes aditivos (Knodel, 1997; Vally & Thompson, 2001).

Edwards e colaboradores (1999) relataram distúrbios neurológicos associados aos agentes sulfitantes, em pessoas com atividade reduzida da enzima sulfito oxidase. O sulfito é convertido em sulfato por meio da enzima sulfito oxidase, evitando no organismo reações tóxicas, uma vez que o sulfato é inócuo e rapidamente excretado. Pessoas que apresentam atividade reduzida da enzima sulfito oxidase podem apresentar graves distúrbios neurológicos causados por reações tóxicas por meio do acúmulo de sulfito no organismo (Favero *et al*, 2011).

Meng e Zhang (1992) afirmaram que os derivados de SO<sub>2</sub> (bisulfito e metabisulfito) podem induzir aberrações cromossômicas, trocas de cromátides irmã e micronúcleos em linfócitos de sangue humano cultivados *in vitro*. Tais resultados sugerem que SO<sub>2</sub> e seus derivados são agentes clastogênicos e genotóxicos.

O emprego dos agentes sulfitantes como conservante também provocam uma redução da biodisponibilidade de algumas vitaminas como a tiamina (B1), ácido fólico (B9), piridoxina, nicotinamida, reduzindo a qualidade nutricional dos alimentos tratados (Pizzoferrato *et al*, 1998; Machado *et al*, 2006; Scampicchio *et al*, 2008).

Os sintomas de intolerância ao sulfito podem ocorrer dentro de 5 minutos após a exposição parenteral e dentro de 15-30 minutos após a exposição oral. Os indivíduos sensíveis variam em seu grau de intolerância em relação aos sulfitos, cada um com um limiar específico de exposição necessário para provocar uma reação (Knodel, 1997).

Embora os mecanismos das respostas de sensibilidade aos sulfitos não tenham sido completamente elucidados, acredita-se que estas acontecem de duas formas: a inalação de dióxido de enxofre (SO<sub>2</sub>), e a ingestão de alimentos ou bebidas contendo sulfito, que provocam a deficiência na produção de sulfito

oxidase que converte os sulfitos a sulfatos (Lester, 1995). A incidência exata da sensibilidade ao sulfito não é conhecida, mas estima-se que 1-4% das pessoas com asma podem ser sensíveis aos agentes sulfitantes (Vally *et al*, 2009). Há algumas indicações de que a sensibilidade respiratória aos sulfitos pode ser mais comum entre as mulheres (Vally & Misso, 2012).

Baseando-se nestes fatos, os órgãos técnicos regulamentadores como a *Food and Drug Administration* (FDA) e a ANVISA, visando minimizar os riscos à saúde humana, estabeleceram normas relacionadas ao uso destes aditivos (Papazian, 1996; Dinckaya *et al.*, 2007):

- A Ingestão Diária Aceitável (IDA) para o uso de sulfitos em alimentos é de (IDA = 0,7 mg/kg peso corpóreo/dia, expressa como SO<sub>2</sub>)
- Proibição do uso de sulfitos para a manutenção da cor e consistência de frutas e vegetais crus, e em alimentos reconhecidos como fonte de vitamina B1, pois os sulfitos inativam a tiamina;
- Inclusão dos agentes sulfitantes nos rótulos dos produtos quando as concentrações forem iguais ou superiores a 10 mg/Kg em alimento ou 10mg/L em bebidas
- Proibição do uso de sulfitos em carnes, visto que são capazes de restaurar e manter a cor vermelha, dando o falso aspecto de “carne fresca”.

Atualmente existem várias técnicas para análise quantitativa de sulfito, tais como: iodometria (Isaac *et al*, 2006), injeção de fluxo (Fatibello-Filho e Vieira, 1997), HPLC (Theinsen *et al*, 2010), eletroforese capilar (Jankovskiene, 2001; Carvalho *et al*, 2005). No entanto, algumas destas técnicas apresentam análises geralmente demoradas, enquanto outras, necessitam de pré-tratamento de amostras ou apresentam custo elevado.

Nessa perspectiva, acredita-se que os biossensores enzimáticos são uma alternativa viável para a detecção e quantificação rápida dos sulfitos, por serem dispositivos simples, que apresentam alta sensibilidade, seletividade e estabilidade, baixo custo e facilidade de construção, resposta rápida e potencial para miniaturização (Blum e Coulet, 1991; Fatibello-Filho e Capelato, 1992; Fatibello-Filho *et al*, 2007).

## REFERÊNCIAS

ABIA – Associação Brasileira das Indústrias da Alimentação. **Compêndio da Legislação Brasileira de Alimentos**, seção 3.31, 2001.

Albiero, D.; Maciel, A. J. S.; Lopes, A. C.; Mello, C. A.; Gamero, C. A. Proposal of harvest's babaçu machine (*Orbignya phalerata*) for the small farms. **Acta Amazonica**, n. 37, p. 337-346, 2007.

Alfaya, A.A.; Kubota, L.T. A utilização de matérias obtidos pelo processo de sol-gel na construção de biossensores. **Química Nova**, v.25, n. 5, p.835-841, 2002.

Amine, A.; Arduini, F.; Moscone, D.; Palleschi, G. Recent advances in biosensors based on enzyme inhibition. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 76, p. 180-194, 2016.

Amine, A.; Arduini, F.; Moscone, D.; Palleschi, G. Recent Advances in Biosensors Based on Enzyme Inhibition. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 76, p.180-194, 2015.

Amine, A.; El Harrad, L.; Arduini, F.; Moscone, D.; Palleschi, G. Analytical aspects of enzyme reversible inhibition. **Talanta**, v.118, p. 368–374, 2014.

Amine, A.; Mohammadi, H.; Bourais, I.; Palleschi, G. Enzyme inhibition-based biosensors for food safety and environmental monitoring. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 21, p.1405-1423, 2006.

Andreescu, S.; Nogueir, T.; Magearu, V.; Marty, J-L. Screen-Printed Electrode Based on AChe for the Detection of Pesticides in Presence of Organic Solvents. **Talanta**, v.57, n. 1, p. 169-173, 2002.

Ansari, S.A.; Husain, Q. Potential applications of enzymes immobilized on/in nano materials: A review. **Biotechnology Advances**, v. 30, p. 512-523, 2012.

Arduini, F.; Amine, A. **Biosensors based on enzyme inhibition**. In: Gu, M.B.; Kim, H. (Eds.), *Biosensors Based on Aptamers and Enzymes*, Springer Berlin, Heidelberg, p. 299-326, 2013.

Arduini, F.; Amine, A.; Moscone, D.; Palleschi, G. Reversible Enzyme Inhibition-Based Biosensors: Applications and Analytical Improvement through Diagnostic Inhibition. **Analytical Letters**, v. 42, n.9, p.1258-1293, 2009.

Assis, O. B. G. Alteração do caráter hidrofílico de filmes de quitosana por tratamento de plasma de hmDs. **Química Nova**, v. 33, n.3, p. 603–606, 2010.

Azevedo, A. P. S; Farias, J. C.; Costa, G. C.; Ferreira, S. C. P.; Aragão-Filho, W. C.; Sousa, P. R. A.; Pinheiro, M. Y.; Maciel, M. C. G.; Silva, L. A.; Lopes, A. S.; Barroqueiro, E. S. B.; Borges, M. O. R.; Guerra, R. N. M.; Nascimento, F. R. F, J. Anti-thrombotic effect of chronic oral treatment with *Orbignya phalerata* Mart. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 111, p. 111-155, 2007.

Azevedo, V. V. C.; Chaves, S. A.; Bezerra, D. C.; Lia Fook, M. V.; Costa, A. C. F. M. Quitina e Quitosana: aplicações como biomateriais. **Revista Eletrônica de Materiais e Processos**, v.23, p. 27-34, 2007.

Badawi, M.A.; Negm, N.A.; Abou Kana, M.T.H.; Hefni, H.H.; Abdel Moneem, M.M. Adsorption of aluminum and lead from wastewater by chitosan-tannic acid modified biopolymers: Isotherms, kinetics, thermodynamics and process mechanism. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 99, p. 465 – 476, 2017.

Balick M. J. The economic utilization of the babassu palm: a conservation strategy for sustaining tropical forest resources. **Journal of the Washington Academy of Sciences**, n. 77, p.215–222, 1987.

Baloch, A. K.; Buckle, K. A.; Edwards, R. A. Stability of  $\beta$ -carotene in model systems containing sulphite. **Journal Food Technology**, v.12, p.309-316, 1977.

Barros, I. C. **Avaliação biofarmacotécnica de potencial excipiente farmacêutico: Pó de mesocarpo de babaçu (*Orbignya phalerata* Mart)**. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) Universidade Federal do Piauí. Teresina, 2011, 93p.

Bedade, Y.B.; Sutar, R.S. Chitosan coated calcium alginate beads for covalent immobilization of acrylamidase: Process parameters and removal of acrylamide from coffee. **Food Chemistry**, v. 275, p. 95 – 104, 2019.

Bickerstaff, G.F. **Immobilization of Enzymes and Cells**. New Jersey: Humana Press Inc, 1997.

Blum, L.J.; Coulet, P. R.; **Biosensor Principles and Applications**, Marcel Dekker: New York, 1991.

Brasil. Ministério da Saúde (Brasil). Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Legislação. Portaria nº 540, de 27 de outubro de 1997. **Aprova o Regulamento Técnico: Aditivos Alimentares – definições, classificações e emprego**. [acesso em 14 de agosto de 2017 ];. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br>

Brito Filho, S. B.; Matías, J. E. F.; Stahke Júnior, H. J.; Torres, O. J. M.; Timi, J. R. R.; Tenório, S. B.; Tâmbara, E. M.; Carstens, A. G.; Campos, R. V.; Myamoto. Análise da cicatrização na linha alba com uso de extrato aquoso de *Orbignya phalerata* (babaçu). Estudo controlado em ratos. **Acta Cirurgica Brasileira**, v. 21, p. 76-88, 2006.

Brito-Madurro, A.G.; Ferreira, L.F.; Vieira, S.N.; Ariza, R.G.; Filho, L.R.G.; Madurro, J.M. Immobilization of purine bases on a poly-4-aminophenol matrix. **Journal of Materials Science**, v.42, p.3238-3243, 2007

Bush, R.K.; Taylor, S.L.; Busse, W. A critical evaluation of clinical trials in reactions to sulfites. **The Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v.78, p.191–202, 1986.



Cabral, J.M.S.; Barros, M.R.A.; Gama, M. **Engenharia enzimática**, Lidel Edições Técnicas-Ltda, Lisboa, 2003.

Caetano, N.; Saraiva, A.; Pereira, R.; Carvalho, D.; Pimentel M. C. B.; Maia M. B. S. Determinação de atividade antimicrobiana de extratos de plantas de uso popular como anti-inflamatório. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v.12, p.132–135, 2002.

Cardoso, W.S.; Pinheiro, F.A.; Patelli, T.; Perez, R.; Ramos, A.M. Determinação da concentração de sulfito para a manutenção da qualidade da cor em maça desidratada. **Revista Analytica**, n. 29, p.66-72, 2007.

Carrazza, L.R.; Ávila, J. C. C.; Silva, M.L **Aproveitamento integral do fruto e da folha do babaçu (*Attalea spp.*)**. 2<sup>a</sup> ed. Brasília, ISPN, 2012, 68p.

Carvalho, L.M.; Schwedt, G. Sulfur speciation by capillary zone electrophoresis Determination of dithionite and its decomposition products sulfite, sulfate and thiosulfate in commercial bleaching agents. **Journal of Chromatography A**, v.1099, p. 185–190, 2005.

Cestari, A. R.; Vieira, E. F. S.; Nascimento, A. J. P.; Filha, M. M. S.; Airoidi, C. Factorial design evaluation of some experimental factors for phenols oxidation using crude extracts from jackfruit (*Artocarpus integrifolia*). **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 13, n. 2, p. 260-265, 2002.

Chaveiro, L.N. **Desenvolvimento e Caracterização de Plataformas Nanoestruturas de Polipirrol para Biossensores Amperométricos Não Enzimáticos e Enzimáticos**. Tese (Doutorado em Física)- Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2013.

Chidambaram, M.; Krishnasamy, K. Modifications to the conventional nanoprecipitation technique: An approach to fabricate narrow sized polymeric nanoparticles. **Advanced Pharmaceutical Bulletin**, v.4, p. 205–208, 2014.

Ciucu, A.; Ciucu, C.; Baldwin, R.B. Organic phase potentiometric biosensor for detection of pesticides. **Romanian Biotechnological Letters**, v. 7, p. 625-630, 2002.

Corinaldesi, C.; Barone, G.; Marcellini, F.; Dell'Anno, A.; Danovaro, R. Marine microbial-derived molecules and their potential use in cosmeceutical and cosmetic products (review). **Marine Drugs**, v.15, p.118-139, 2017.

Cowan, D.A.; Fernandez-Lafuente, R. Enhancing the functional properties of thermophilic enzymes by chemical modification and immobilization. **Enzyme and Microbial Technology**, v.49, p. 326-346, 2011.

Datta, S.; Christena, L.R.; Rajaram, Y.R.S. Enzyme immobilization: an overview on techniques and support materials. **Biotechnology**, v. 3, p. 1-9, 2013.

Deng, C. M.; He, L.Z.; Zhao, M.; Yang, D.; Liu, Y. Biological properties of the chitosan-gelatin sponge wound dressing. **Carbohydrate polymers**, v.69, p.583-589, 2007.

Deng, F.; Dong, Y. Y.; Liu, S.; Wang, B.; Ma, M. G.; Du, X. Revealing the influences of cellulose on cellulose/SrF<sub>2</sub> nanocomposites synthesized by microwaveassisted method. **Industrial Crops and Products**, v. 85, p. 258-265, 2016.

Di Lorenzo, G.; Pacor, M.L.; Vignola, A.M.; Profita, M.; Esposito-Pellitteri, M.; Biasi, D.; Corrocher, R.; Caruso, C. Urinary metabolites of histamine and leukotrienes before and after placebo-controlled challenge with ASA and food additives in chronic urticarial patients. **Allergy**, v. 12, n. 57, p. 1180-1186, 2002.

Dinckaya, E.; Sezginiturk, M.K.; Akyilmaz, E.; Ertas, F.N. Sulfite determination using sulfite oxidase biosensor based glassy carbon electrode coated with thin mercury film. **Food Chemistry**. v. 101, p.1540–1544, 2007.

Dipersio, P.A.; Kendall, P.A.; Sofos, J.N.; Investigation of *Listeria Monocytogenes* during drying and storage of peach slices treated with acidic or sodium metabisulfite solution. **Food Microbiology**, v.21, n.6, p.641-648, 2004.

Dixon, M.; Webb, E.C.; Thorne, C.J.R.; Tipton, K.F. **Enzymes**. 3<sup>a</sup> ed, Longmans, Green & Co., London, and Academic Press, New York, 1979.

Du, P.; Zhou, B.; Cai, C. Development of an amperometric biosensor for glucose Duran, N.; Rosa, M.A.; D' Annibale, A.; Gianfreda, L. Applications of laccases and tyrosinases (polyphenol oxidases) immobilized on different supports: A Review. **Enzyme and Microbial Technology**, v.31, p.907-931, 2002.

Du, P.; Zhou, B.; Cai, C. Development of an amperometric biosensor for glucose based on electrocatalytic reduction of hydrogen peroxide at the single-walled carbon nanotube/nile blue A nanocomposite modified electrode. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 614, p.149–156, 2008.

Durán, N.; Rosa, M.A.; D'Annibale, A.; Gianfreda, L. Applications of laccases and tyrosinases (phenoloxidases) immobilized on different supports: a review. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 31, p. 907–931, 2002.

Dzyadevych, S. V.; Arkhypova, V.N.; Martelet, C.; Jaffrezic-Renault, N.; Chovelon, J.N.; El'skaya, A.V.; Soldatkin, A.P. Potentiometric biosensors based on ISFETs and immobilized cholinesterases. **Electroanalysis**, v. 16, p. 1873-1882, 2004.

Edwards, M.C.; Johnson, J.L.; Marriage, B.; Graf, T. N.; Coyne, K. E.; Rajagopalan, K. V.; Macdonald, I.M. Isolated sulfite oxidase deficiency-review of two cases in one Family. **Ophthalmology**, v.106, n.10, p.1957-1961, 1999.

Eggin, B.R. **Biosensors: An Introduction**. Wiley-Teubner. New York, 1996, p.212

El-Metwally, T.H.; El-Senosi, Y. **Enzyme Inhibition**. Medical Enzymology: simplified Approach, Nova Publisher, NY, p. 57-77,2010.

Elsabee, M. Z., & Abdou, E. S. Chitosan based edible films and coatings: A review. **Materials Science and Engineering C— Materials for Biological Applications**, v. 33, n. 4, p.1819–1841, 2013.

Elsabee, M.Z.; Abdou, E.S. Chitosan based edible films and coatings: A review. **Materials Science and Engineering: C**, v.33, p.1819-1841, 2013.

Elsabee, M.Z.; Morsi, R.E.; Al-Sabagh, A.M. Surface active properties of chitosan and its derivatives. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v.74, p. 1-16, 2009.

Farré, M.; Kantiani, L.; Pérez, S.; Barceló, D. Sensors and biosensors in support of EU Directives. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 28, n. 2, p.170-185, 2009.

Fathil, M.F.M.; Arshad, M.K.; Gopinath, S.C.B.; Hashim, U.; Adzhri, R.; Ayub, R.M.; Ruslinda, A.R.; Nuzaihan, M.N.; Azman, M.; Zaki, A.H.; Tang, T.H.M. Diagnostics on acute myocardial infarction: Cardiac troponin biomarkers. **Biosensors Bioelectronics**, v. 70, p. 209 – 220, 2015.

Fatibello-Filho, O.; Capelato, M.D. Biossensores. **Química Nova**, v.15, n.1, p.28-39, 1992.

Fatibello-Filho, O.; Lupetti, K.O.; Leite, O.D.; Vieria, I.C. Electrochemical biosensors based on vegetable tissues and crude extracts for environmental, food and pharmaceutical analysis. Part 1- Fundamentals and applications. In: Salvador Alegret & Arben Merkoçi. (Org.). **Electrochemical sensor analysis**, 1 ed. Amsterdam: Elsevier, v.49, p.355-375, 2007.

Fatibello-Filho, O.; Vieira, I.C. Flow injection spectrophotometric determination of sulfite using a crude extract of sweet potato root (*Ipomea batatas* (L.) Lam.) as a source of polyphenol oxidase. **Analytica Chimica Acta**, v.354, p.51-57, 1997.

Fatibello-Filho, O.; Vieira, I.C. Uso analítico de tecidos e de extratos brutos vegetais como fonte enzimática. **Química Nova**, v.25, n.3, p.455-464, 2002.

Fatibello-Filho, O.; Capelato, M.D. Biossensores. **Química Nova**, v.15, n. 1, p.28-39, 1992.

Favero, D.M.; Ribeiro, C.S.G.; Aquino, D.A.; Sulfitos: importância na indústria alimentícia e seus possíveis malefícios à população. **Segurança Alimentar e Nutricional**, v.18, n. 1, p.11-20, 2011.

Feketea, G.; Tsaouri, S. Common food colorants and allergic reactions in children: Myth or reality? **Food Chemistry**, v. 230, p.578-588, 2017.

Fenoll, L. G.; Rodriguez-Lopez, J. N.; Garca-Sevilla, F., Garca-Ruiz, P. A.; Varon, R.; Garca-Canovas, F., Tudela, J. Analysis and interpretation of the action

mechanism of mushroom tyrosinase on monophenols and diphenols generating highly unstable *o*-quinones. **Biochimica et Biophysica Acta/Protein Structure and Molecular Enzymology**, v. 1548, p.1-22, 2001.

Fernandes, E.G.R. **Imobilização de enzimas em plataformas sub(microestruturadas) para aplicações em sensores**. Tese (Doutorado em Interunidades Ciências e Engenharia dos Materiais) - Universidade Federal de São Carlos- São Carlos: UFSCar, 2012, 155p.

Fernandez-Lafuente, R. Stabilization of multimeric enzymes: Strategies to prevent subunit dissociation. **Enzyme Microbial Technology**, v.45, p. 405-418, 2009.

Filik, H.; Çetintaş, G. Determination of sulfite in water and dried fruit samples by dispersive liquid–liquid microextraction combined with UV–vis fiber optic linear array spectrophotometry. **Food Analytical Methods**, v. 5, p. 1362-1367, 2012.

Fortes T. S., Fialho E. M. S., Reis A. S., et al. Desenvolvimento do tumor de Ehrlich em camundongos após tratamento *in vitro* com mesocarpo de babaçu. **Revista de Ciências da Saúde**, v 11, p.101–105, 2009.

Franchetti, S. M. M.; Marconato, J. C. Polímeros biodegradáveis- Uma solução parcial para diminuir a quantidade dos resíduos plásticos. **Química Nova**, v. 29, n. 4, p. 811-816, 2006.

Garcia, L.F.; Benjamin, S.R.; Antunes, R.S.; Lopes, F.M.; Somerset, V.S.; Gil, E.S. *Solanum melongena* polyphenol oxidase biosensor for the electrochemical analysis of paracetamol. **Journal Preparative Biochemistry and Biotechnology**, v.46, p.850-855, 2016.

Gaudin, F.; Zydowicz, N.S. Core-shell biocompatible polyurethane nanocapsules obtained by interfacial step polymerization in miniemulsion. **Colloids and Surface A**, v.331, p.133–142, 2008.

Gavhane, Y. N.; Gaurav A. S.; Yadav, A.V. Chitosan and Its Applications: A Review of Literature. **International Journal of Research in Pharmaceutical and Biomedical Sciences**, v. 4, p. 312-331, 2013.

Gawlik-Dziki, U.; Zlotek, U.; Swieca, M. Characterization of polyphenol oxidase from butter lettuce (*Lactuca sativa var. capitata L.*) **Food Chemistry**, v.107, p.129-135, 2008.

Gerard, M.; Chaubey, A.; Malhotra, B.D. Application of conducting polymers to biosensors. **Biosensors and Bioelectronics**, v.17, n.5, p.345-369, 2002

Gil, E.S.; Muller, L.; Santiago, M.F.; Garcia, T.A. Biosensor Based on Brut Extract from Laccase (*Pycnoporus sanguineus*) for Environmental Analysis of Phenolic Compounds. **Portugaliae Electrochimica Acta**, v.27. n.3, p.215-225, 2009.

Goosen, M. E. A. **Applications of chitin and chitosan**. 1<sup>a</sup> ed. Lancaster: Technomic Publishing Company, 1996.

Goosen, M.E.A. **Applications of Chitin and Chitosan**. Lancaster: Technomic Publishing Company, 1996.

Gould, G.W.; Russell, N. J. **Food preservatives**. In: Russell NJ, Gould GW, editores. Sulphite. New York: AVI book published; 1991. p.72-88.

Guibal, E.; Interactions of metal ions with chitosan-based sorbents: a review. **Separation and Purification Technology**, v. 38, p.43-74, 2004.

Guimard, N.K.; Gomez, N.; Schmidt, C.E.; Conducting Polymers in Biomedical Engineering. **Progress in Polymer Science**, v.32, p.876-921, 2007.

Guo, D.Y.; Zheng, D.; Mo, G.Q.; Ye, J.S. Adsorptive stripping voltammetric detection of tea polyphenols at multiwalled carbon nanotubes-chitosan composite electrode. **Electroanalysis**, v.21, n.6, p.762-766, 2009.

Gupta, M.N.; Kaloti, M.; Kapoor, M.; Solanki, K. Nanomaterials as matrices for enzyme immobilization. **Artificial Cells, Blood Substitutes, and Immobilization Biotechnology**, v. 39, p. 98-109, 2011.

Hanefeld, U.; Gardossi, L.; Magner, E. Understanding Enzyme Immobilisation. **Chemical Society Reviews**, v. 38, p.453-468, 2009.

Harvey, R. A. **Bioquímica ilustrada**. 5<sup>a</sup> Ed. Porto Alegre: Artmed, 2012.

Hasan, A.; Nurunnabi, M.; Morshed, M.; Paul, A.; Polini, A.; Kuila, T.; Al Hariri, M.; Lee, Y.K.; Jaffa, A.A. Recent advances in application of biosensors in tissue engineering. **Biomed Research International**, p.1-18, 2014.

Henderson, A. **The plants of the Amazon**. New York: Oxford University Press, p. 323, 1995.

Huang, A.S.; Fraser, W.M. Are sulfite additives really safe? **The New England Journal of medicine**, v. 311, p. 542, 1984.

Iammarino, M.; Di Taranto, M.; Muscarella, M. Investigations on the presence of sulfites in fresh meat preparations: estimation of an allowable maximum limit. **Meat Science**, v.90, p. 304-308, 2012.

Isaac, A.; Livingston, E.C.; Wain, A.J.; Compton, R.G.; Davis, J. Electroanalytical methods for the determination of sulfite in food and beverages. **Trac-Trends in Analytical Chemistry**, v.25, p. 589-598, 2006.

Jain, J. P.; Kumar, N. Development of amphotericin B loaded polymersomes based on (PEG)3-PLA co-polymers: Factors affecting size and in vitro evaluation. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.40, p.456-465, 2010.

Janata, J. In: **Principios de sensores químicos**. Plenum Press; Nova Iorque: 1989. p. 81.

Jankovskiene, G.; Daunoravicius, Z.; Padaraukas, A. Capillary electrophoretic determination of sulfite using the zone-passing technique of in-capillary derivatization. **Jornal of Chromatography A**, v.934, p.67-73, 2001.

Kang, M.L.; Cho, C.S.; Yoo, H.S. Application of chitosan microspheres for nasal delivery of vaccines. **Biotechnology Advances**, v.27, p. 857-865, 2009.

Kaplan, D. L. Introduction to Biopolymers from renewable resources. In: **Biopolymers from renewable resources**. Springer-Verlag, p.1-29, 1998.

Kato, M.; Sakai-Kato, K.; Matsumoto, N.; Toyooka, T. A Protein Encapsulation Technique by the Sol-Gel Method for the Preparation of Monolithic Columns for Capillary Electrochromatography. **Analytical Chemistry**, v. 74, n. 8, p. 1915-1921, 2002.

Kelly, S.D.; Scotter, M.J.; Macarthur, R.; Castle, L; Dennis, M.J. Survey of stable sulfur isotope ratios ( $^{34}\text{S}/^{32}\text{S}$ ) of sulfite and sulfate in foods. **Food Additives Contaminants**, v.19, n.11, p.1003-1009, 2002.

Kencebay, C.; Derin, N.; Ozsoy, O.; Kipmen-Korgun, D.; Tanriover, G.; Ozturk, N.; Basaranlar, G.; Yargicoglu-Akkiraz, P.; Sozen, B.; Agar, A. Merit of quinacrine in the decrease of ingested sulfite-induced toxic action in rat brain. **Food Chemical Toxicology**, v. 52, p. 129-136, 2013.

Kiani, M.; Tekie, F. S. M.; Dinarvand, M.; Soleimani, M.; Dinarvand, R.; Atyabi, F. Thiolated carboxymethyl dextran as a nanocarrier for colon delivery of hSET1 antisense: In vitro stability and efficiency study. **Materials Science and Engineering: C**, v. 62, p. 771-778, 2016.

Kitz, R.; Wilson, P. Esters of methanesulfonic acid as irreversible inhibitors of acetylcholinesterase. **Journal Biological Chemistry**, v. 237, p. 3245-3249, 1962.

Knodel, L.C. Current Issues in Drug Toxicity Potential Health Hazards of Sulfites. **Toxic Substance Mechanisms**, v. 16, n. 3, p. 309-311, 1997.

Kochen, J. Sulfur dioxide, a respiratory tract irritant, even if ingested. **Pediatrics**, v.52, n. 1, p.145-6, 1973.

Krajewska B. Application of chitin and chitosan-based materials for enzyme immobilizations: a review. **Enzyme Microbial Technology**, v.35, p.126-139, 2004.

Kreuter, J. **Colloidal drug Delivery Systems**, v. 66. New York: Marcel Dekker; p. 219-342, 1994.

Krokida, M.K.; Kiranoudis, C.T.; Maroulis, Z.B.; Marinos-Kouris, D. Effect of pretreatment on color of dehydrated products. **Drying Technology**, v.18, n. 6, p.1239-1250, 2000.

Kumar, M.N.V.R.; A review of chitin and chitosan applications. **Reactive and Functional Polymers**, v. 46, p. 1-27, 2000.

Kumari, A.; Yadav, S.K.; Pakade, Y.B.; Kumar, V.; Singh, B.; Chaudhary, A.; Yadav, S.C. Nanoencapsulation and characterization of Albizia chinensis isolated antioxidant quercitrin on PLA nanoparticles. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 82, n. 1, p. 224–232, 2011.

Kumari, A.; Yadav, S.K.; Yadav, S.C. Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 75, n. 1, p.1-18, 2010.

Lee, C. Y. Enzymatic browning reaction. In: Francis, F. J. **Encyclopedia of Food Science and Technology**. 2.ed. New York: John Wiley & Sons, 2000. p. 208-218.

Lester, M.R. Sulfite sensitivity: significance in human health. **The Journal of the American College of Nutrition**, v. 14, n. 3, p. 229-232,1995.

Li, X.M.; Ju, H.Q.; Ding, C.F.; Zhang, S.S. Nucleic acid biosensor for detection of hepatitis B virus using 2,9- dimethyl-1,10-phenanthroline copper complex as electrochemical indicator. **Analytica Chimica Acta**, v.582, n.1, p.158-163, 2007.

Lima, J.S.; Cabrera, M.P.; Casazza, A.A.; Silva, M.F.; Perego, P.; Carvalho Jr., L.B.; Converti, A. Immobilization of *Aspergillus ficuum* tannase in calcium alginate beads and its application in the treatment of boldo (*Peumus boldus*) tea. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.118, p. 1989-1994, 2018.

Liu, C. F.; Sun, R. C.; Zhang, A. P.; Ren, J. L.; Wang, X. A.; Qin, M. H.; Chao, Z. N.; Luo, W. Homogeneous modification of sugarcane bagasse cellulose with succinic anhydride using a ionic liquid as reaction medium. **Carbohydrate Research**, v. 342, p.919–926, 2007.

Liu, Y.; Lu, Y.C.; Luo, G.S. Modified nanoprecipitation method for polysulfone nanoparticles preparation. **Soft Matter**, v. 10, p.3414–3420, 2014.

Liu, Z.; Jiao, Y.; Wang, W.; Zhou, C.; Zhang, Z. Polysaccharides Based Nanoparticles as Drug Delivery Systems. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 60, p.1650-1662, 2008.

Lorenzi, H. **Flora brasileira Lorenzi: Arecaceae (palmeiras)**. 1 ed. São Paulo: Nova Odessa, 367p. 2010.

Luck, E.; Jager, M. **Conservación química de los alimentos, características, usos, efectos**. 2º Edición. Zaragoza: Editora Acribia; 1995. **Luo, X.; Morrin, A.;**

Killard, A.J.; Smyth, M.R. Application of Nanoparticles in Electrochemical Sensors and Biosensors. **Electroanalytical**, v.18, p.319-326, 2006.

Ma, W.; Tang, C. H.; Yin, S. W.; Yang, X. Q.; Wang, Q.; Liu, F.; Wei, Z. H. Characterization of gelatin-based edible films incorporated with olive oil. **Food Research International**, v. 49, n 1, p. 572-579, 2012.

Machado, R.M.D.; Toledo, M.C.F. Sulfitos em Alimentos. **Brazilian Journal Food Technology**, v. 9, p. 265-275, 2006.

Maia, J. L.; Santana, M.H.A.; Ré, M.I. The Effect of Some Processing Conditions on the Characteristics of Biodegradable Microspheres Obtained by an Emulsion Solvent Evaporation Process. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 21, n. 1, p.1–12, 2004.

Mainardes, R. M.; Gremião, M. P. D.; Brunetti, I. L.; Da Fonseca, L. M.; Khalil, N. M. Zidovudine-loaded PLA and PLA-PEG blend nanoparticles: Influence of polymer type on phagocytic uptake by polymorphonuclear cells. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 98, p. 257- 267, 2009.

Marconi W. Immobilized enzymes: their catalytic behaviour and their industrial and analytical applications. **Reactive and Functional Polymes**, v.11, p.1-19, 1989.

Mariotti, M.P. **Hidrólise da lactose de soro de leite por meio de  $\beta$ -galactosidase imobilizada**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química), Instituto de Química, Universidade Estadual paulista, Araraquara, 2000, 136p.

Marques, P.R.B.O.; Yamanaka, H. Biossensores Baseados no Processo de Inibição Enzimática. **Química Nova**, v.31, n. 7, p.1791-1799, 2008.

Marshall, M. R.; Kim, J.; Wei, C. I. **Enzymatic browning in fruits, vegetables and sea foods**. Nutrition and Food Science Department, Alabama, 2000.

Mateo, C.; Palomo, J.M.; Fernandez-Lorente, G.; Guisan, J.M.; Fernandez-Lafuente, R. Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques. **Enzyme and Microbial Technology**, v.40, p. 1451-1463, 2007.

Mattison, C.P.; Desormeaux, W.A.; Wasserman, R.L.; Yoshioka-Tarver, M.; Condon, B.; Grimm, C.C. Decreased immunoglobulin E (IgE) binding to cashew allergens following sodium sulfite treatment and heating. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.62, p. 6746-6755, 2014.

Mayer, A.M. Polyphenol oxidases in plants and fungi: Going places? A review. **Phytochemistry**, v.67, p. 2318–2331, 2006.

Mehrvar, M.; Abdi, M. Recent Developments, Characteristics, and Potential Applications of Electrochemical Biosensors. **Analytical Sciences**, v.20, p.1113-1126, 2004.



Mello L.D.; Kubota, L.T. Biosensors as a tool for the antioxidant status evaluation. **Talanta**, v. 72, p. 335-348, 2007.

Mello, L.D.; Kubota, L.T. Review of the use biosensors as analytical tools in the food and drinks industries. **Food Chemistry**, v.77, n. 2, p.237-257, 2002.

Meng, Z.; Zhang, L.; Cytogenetic damage induced in human lymphocytes by sodium bisulfite. **Mutation Research**, v. 298, p. 63-69, 1992.

Mikkelsen,S.R.; Cort'on, E. **Bioanalytical Chemistry**, John Wiley and Sons, New Jersey, 2004.

Miranda,A.L. **Você sabe a função das enzimas nos alimentos?** Disponível em <http://quipibid.blogspot.com/2015/03/voce-sabe-funcao-das-enzimas-nos.html>. Acesso em: 28 de julho de 2019.

Mohanraj, V.J.; Chen, Y. Nanoparticles – A Review. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, v. 5, n.1, p. 561-573, 2007.

Mora-Huertas, C.E.; Fessi, H.; Elaissari, A. Pharmaceutical Nanotechnology Polymer-Basead Nanocapsules for Drug Delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 385, p.113-142, 2010.

Moutinho, I.L.S.; Bertges, L.C.; Assis, R.V.C. Prolonged use of Food Dye Tartrazine and its Effects on the Gastric Mucosa of Wistar Rats. **Brazilian Journal of Biology**, v. 67, n. 1, p. 141-145, 2007.

Muenchen, D.K.; Martinazzo, J.; Brezolin, A.N.; Cezaro, A.M.; Rigo, A.A.; Mezarroba, M.N.; Manzoli, A.; Leite, F.L.; Steffens, J.; Steffens, C. Cantilever Functionalization Using Peroxidase Extract of Low Cost for Glyphosate Detection. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v.186, p.1061-1073, 2018.

Mujtaba, M.; Morsi, R.E.; Kerch, G.; Elsabee, M.Z.; Khawar, K.M. Current advancements in chitosan-based film production for food technology; A review. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.121, p.889-904, 2019.

Mulchandani, A.; Rogers, K.R. **Enzyme and Microbial Biosensors: Techniques and Protocols**, Humana Press, Totowa, NJ,1998.

Nelson, D. L.; Cox, M. M.; **Lehninger: Principles of Biochemistry**, 4th Ed. USA, W. H. Freeman, 2004.

Ngo, D.H.; Vo, T.S.; Ngo, D.N.; Kang, K.H.; Je, J.Y.; Pham, H. N.D.; Byun, H.G.; Kim, S.K. Biological effects of chitosan and its derivatives. **Food Hydrocolloids**, v. 51, p. 200-216, 2015.

Nikolelis, D. P.; Varzakas, T.; Erdem, A.; Nikolell, G-P. **Portable Biosensing of Food Toxicants and Environmental Pollutants, Boca Raton (FL)**, CRC Press Taylor & Francis Group, 2014, 44p.

Noor, M.O.; Krull, U.J. Silicon nanowires as field-effect transducers for biosensor development: a review. **Analytica Chimica Acta**, v. 825, p. 1 – 25, 2014.

Nunes, S. N.; Jeanty, G.; Marty, J-L.; Enzyme immobilization procedures on screen-printed electrodes used for the detection of anticholinesterase pesticides: Comparative study. **Analytica Chimica Acta**, v. 523, p.107–115, 2004.

Núñez-Delicado, E.; Serrano-Megías, M.; Pérez-López, A.J.; López-Nicolás, J.M. Polyphenol oxidase from dominga table grape. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, v. 53, p.6087–6093, 2005.

Oliveira, G.C.; Moccelini S.K.; Castilho, M.; Ailton J.; Terezo, A.J.; Possavatz J.; Magalhães, M.R.L.; Dores, E.F.G.C. Biosensor based on atemoya peroxidase immobilised on modified nanoclay for glyphosate biomonitoring. **Talanta**, v.98, p.130-136, 2012.

Oliveira, I.R.W.Z.; Vieira, I.C. Construction and analytical applications of biosensors using different immobilization procedures of vegetable peroxidase on chitosan matrix. **Química Nova**, v.29, n.5, p.893-1153, 2006.

Oliveira, J.E.; Consolin-Filho, N.; Paterno, L.G.; Mattoso, L.H.C.; Medeiros, E.S. Uso de polímeros condutores em sensores. Parte 3: Biossensores. **Revista Eletrônica de Materiais e Processos**, v.8., n. 1, p.1–11, 2013.

Palmer, T. **Understanding enzymes**, 3<sup>a</sup> ed., Ellis Horwood: New York, 1991.

Papazian R. **Sulfites: safe for most, dangerous for some**. FDA Consumer Magazine, v.30, n. 10, 1996.

Pathak, P.; Katiyar, V. K.; Giri, S. Cancer Research - Nanoparticles, Nanobiosensors and Their Use in Cancer Research. **Azojono Journal of Nanotechnology Online**, v.3, p.1-4, 2007.

Peter, M.G. **Chitin and Chitosan from animal sources**. Biopolymers Online, 2005.

Pillai, C.S.; Paul, W.; Sharma, C.P. Chitin and chitosan polymers: chemistry, solubility and fiber formation. **Progress in Polymer Science**, v. 34, p. 641-678, 2009.

Pizzoferrato, L.; Di Lullo, G.; Quattrucci, E. Determination of free, bound and total sulphites in foods by indirect photometry-HPLC. **Food Chemistry**, v.63, n. 2, p.275-79, 1998.

Plank, J. **Applications of biopolymers in construction engineering**. In: Biopolymers on line, v. 10. Wiley-VCH, Weinheim, p. 29-95, 2003.

Plapied, L.; Duhem, N.; Des Rieux, A., Preat, V. Fate of polymeric nanocarriers for oral drug delivery. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v. 16, n. 3, p. 228–237, 2011.

Pochanavanich, P.; Suntornsuk, W. Fungal chitosan production and its characterization. **Letters in Applied Microbiology**, v.35, p.17-21, 2002.

Pollock I. Hyperactivity and food additives. **Bibliotheca Nutritio et Dieta Home**, n. 48, p.81-89, 1991.

Polônio, M.L.T.; Peres, F. Consumo de aditivos alimentares e efeitos à saúde: desafios para a saúde pública brasileira. **Caderno de Saúde Pública**, v. 25, n. 8, p.1653-1666, 2009.

Prakash, S.; Chakrabarty, T.; Singh, A.K.; Shahi, V.K. Polymer thin films embedded with metal nanoparticles for electrochemical biosensors applications. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 41, p. 43–53, 2013.

Prenner, B.M.; Stevens, J.J. Anaphylaxis after ingestion of sodium bisulfite. **Annals of Allergy, Asthma & Immunology**, v.37, n. 3, p.180-182, 1976.

Pundir, C.S.; Chauhan, N. Acetylcholinesterase inhibition-based biosensors for pesticide determination: A review. **Analytical Biochemistry**, v.429, n.1, p.19-31, 2012.

Queiroz, Y.S.; Bastos, D.H.; Sampaio, G.R.; Soares, R.A., Ishimoto, E.Y.; Torres, E.A. Influência dos aditivos alimentares na atividade antioxidante in vitro de produtos de alho. **Alimentos e Nutrição**, v.17, n. 3, p.287-93, 2006.

Rahman, M.S.; Perera, C.O. Drying and preservation. In: Rahman, M.S. **Handbook of preservation**. New York: Marcel Dekker, 1999. Cap 6, p.173-216.

Raiteri, R.; Grattarola, M.; Berger, R. Micromechanics Senses Biomolecules. **Materials Today**, v. 5, p.22-29, 2002.

Rao, J.P., Geckeler, K.E. Polymer nanoparticles: Preparation techniques and size-control Parameters. **Progress in Polymer Science**, v. 36, n. 7, p.887–913, 2011.

Reis, C.P.; Neufeld, R.J.; Ribeiro, A.J.; Veiga, F. Nanoencapsulation I. Methods for preparation of drug-loaded polymeric nanoparticles. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and medicine**, v. 2, n. 1, p. 8–21, 2006.

Rennó M. N., Barbosa G. M., Zancan P., et al. Crude ethanol extract from babassu (*Orbignya speciosa*): cytotoxicity on tumoral and non-tumoral cell lines. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v.80, p.467–476, 2008.

Ribeiro, F.A.S.; Tarley, C.R.T.; Borges, K.B.; Pereira, A.C. Development of a square wave voltammetric method for dopamine determination using a biosensor based on multiwall carbon nanotubes paste and crude extract of *Cucurbita pepo* L. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v.185, p.743-754, 2013.

Ribera, D.; Jonker, D.; Narbonne, J. F.; O'Brien, J.; Antignac, E. Absence of adverse effects of sodium metabisulphite in manufactured biscuits: results of subacute (28-days) and subchronic (85-days) feeding studies in rats. **Food Additives and Contaminants**, v. 18, n. 2, p.103-114, 2001.

Robbins, K.S.; Shah, R.; Macmahon, S.; Jager, L.S. Development of a liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for the determination of sulfite in food. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.63, p.5126-5132, 2015.

Roberts, A.C.; McWeeny, D.J. The uses of sulphur dioxide in the food industry: A review. **International Journal of Food Science + Technology**, v. 7, p. 221–238, 1972.

Rolff, M.; Schottenheim, J.; Decker, H.; Tuzcek, F. Copper-O<sub>2</sub> reactivity of tyrosinase models towards external monophenolic substrates: Molecular mechanism and comparison with the enzyme. **Chemical Society Reviews**, v.40, p. 4077–4098, 2011.

Rosatto, S. S.; Freire, R. S.; Durán, N.; Kubota, L.T. Biossensores amperométricos para determinação de compostos fenólicos em amostras de interesse ambiental. **Química Nova**, v. 24, n.1, p.77-86, 2001.

Rostagno, H. S.; Albino, L. F. T.; Donzele, J. L.; Gomes, P. C.; Oliveira, R. F.; Lopes, D. C.; Ferreira, A. S.; Barreto, S. L. T.; Euclides, F. R. **Tabelas brasileiras para aves e suínos: Composição de alimentos e exigências nutricionais**. 3<sup>a</sup> ed. Viçosa: UFV, DZO, 2011, 251p.

Sadeghi, S.; Fooladi, E.; Malekaneh, M. A nanocomposite/crude extract enzyme-based xanthine biosensor. **Analytical Biochemistry**, v.464, p.51-59, 2014.

Sae-leaw, T.; Benjakul, S. Prevention of melanosis in crustaceans by plant polyphenols: A review. **Trends in Food Science & Technology**, v.85, p.1-9, 2019.

Saltmarsh, M. **Essential guide to food additives** (4<sup>th</sup> ed.), RSC Publishing, Cambridge, UK, 2013.

Sapers, G. Browning of foods: control by sulfites, antioxidants, and other means. **Food Technol**, v. 47, p. 75-84, 1993.

Sassolas, A.; Blum, L.J.; Leca-Bouvier, B.D. Immobilization strategies to develop enzymatic biosensors. **Biotechnol Advances**, v.30, p. 489-511, 2012.

Scampicchio, M.; Lawrence, N.S.; Arecchi, A.; Mannino, S. Determination of Sulfite in Wine by Linear Sweep Voltammetry. **Electroanalysis**, v. 20, n. 4, p.444-447, 2008.

Schaffazick, S. R.; Guterres, S. S.; Freitas, L. L.; Pohlmann, A. R. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. **Química Nova**, v.26, n.5, p.726-737, 2003.

Schroeter, L. C. “**Sulfur Dioxide-Applications in Foods, Beverages, and Pharmaceuticals**” Pergamon, Oxford, 1966.

Schwartz, H.J.; Sher, T.H. Bisulfite sensitivity manifesting as allergy to local dental anesthesia. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v.75, p.525-527, 1985.

Scouten, W. H.; Luong, J. H. T.; Brown, R. S. Enzyme or protein immobilization techniques for applications in biosensor design. **Trends in Biotechnology**, v. 13, p. 178-185, 1995.

Sekhon, B.S. Supercritical fluid technology: An overview of pharmaceutical applications. **International Journal of Pharm Tech Research**, v. 2, p. 810–826, 2010.

Shariatnia, Z. Pharmaceutical applications of chitosan. **Advances in Colloid and Interface Science**, v.263, p.131-194,2019.

Sharma, S.K.; Sehgal, N.; Kumar, A. Biomolecules for development of biosensors and their applications. **Current Applied Physics**, v.3, p.307-316, 2003.

Shepherd, R.; Reader, S.; Falshaw, A. Chitosan functional properties. **Glycoconjugate Journal**, v.14, p. 535–542, 1997.

Silva, L.M.C.; Salgado, A.M.; Coelho, M.A.Z. Development of an amperometric biosensor for phenol detection. **Journal Environmental Technology**, v.32, p. 493-497, 2011.

Silva, T.M.; Santos, A.R.; Caramori, S.S. Peroxidase de abobrinha verde (*Cucurbita pepo L.*) imobilizada em polímeros naturais remove compostos fenólicos de amostras de água. **Revista Ambiente & Água**, v.13, n.6, p. 1-12, 2018.

Simon, R.A. Adverse reactions to drug additives. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v.74, p.623-630, 1984.

Skladal, P. Piezoelectric quartz crystal sensors applied for bioanalytical assays and characterization of affinity interactions. **Journal of the Brazilian Chemical Society**. v.14, n. 4, p.491-502, 2003.

Skoog, D. A., Holler, F. J., Crouch, S. R., **Princípios de Análise Instrumental**, Ed. Bookman, 6ª Edição, 2009.

Sondhi,S.; Kaur,R.; Kaur,S.; Kaur, P.S. Immobilization of laccase-ABTS system for the development of a continuous flow packed bed bioreactor for decolorization of textile effluent. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 117, p. 1093 – 1100, 2018.

Song, S.; Xu, H.; Fan, C. Potential Diagnostic Applications of Biosensors: Current and Future Directions. **International Journal of Nanomedicine**, v.1, n.4, p.433-440, 2006.

Sotomayor, M.D.; Kubota, L.T. Enzymeless biosensors: a novel área for the development of amperometric sensors. **Química Nova**, v. 25, n.1, p.123-128, 2002.

Sousa, A. I. P. **Efeitos do mesocarpo do babaçu (*Orbignya phalerata*, *Arecaceae*) sobre a bioquímica sanguínea em animais com tumor de Ehrlich**. Dissertação (Mestrado em Saúde e Meio Ambiente). Universidade Federal do Maranhão. São Luís, 2008, 98p.

Souza M. H. S. L., Monteiro C. A., Figueredo P. M. S., Nascimento F. R. F., Guerra R. N. M. Ethnopharmacological use of babassu (*Orbignya phalerata* Mart) in communities of babassu nut breakers in Maranhão, Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v.133, p.1–5, 2011.

Stradiotto, N.R; Yamanaka, H.; Zanoni, M. V.B. Electrochemical sensors: A powerful tool in analytical chemistry. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v.4, n. 2, 2003.

Suh, H.; Cho, Y.; Chung, M.; Kim, B. Preliminary data on sulphite intake from the Korean diet. **Journal of Food Composition and Analysis**, v.20, p. 212-219, 2007.

Takeuchi, I.; Yamaguchi, S.; Goto, S.; Makino, K. Drug release behavior of hydrophobic drug-loaded poly (lactide-co-glycolide) nanoparticles: Effects of glass transition temperature. **Colloids and Surfaces A-Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 529, p. 328-333, 2017.

Tansik, G.; Yakar, A.; Gunduz, U. Tailoring magnetic PLGA nanoparticles suitable for doxorubicin delivery. **Journal of Nanoparticle Research**, v. 16, p.1-13, 2014.

Taylor S.L. Why Sulfite Alternatives? **Food Technology**, v. 47, p.14-25, 1993.

Taylor, S. L.; Higley, N. A.; Bush, R. K. Sulfites in foods: uses, analytical methods, residues, fate, exposure, assessment, metabolism, toxicity, and hypersensitivity. **Advances in Food Research**, v. 30, p. 1-76, 1986.

Teixeira, M. A. Babassu – A new approach for an ancient Brazilian biomass. **Biomass and Bioenergy**, v. 32, p. 857-864, 2008.

Theisen, S.; R. Hansch, R.; Kothe, L.; Galensa, R. A fast and sensitive HPLC method for sulfite analysis in food based on a plant sulfite oxidase biosensor. **Biosensors and Bioelectronic**, v.26, p.175–181, 2010.

Thevenot, D.R.; Toth, K.; Durst, R.A.; Wilson, G.S. Electrochemical biosensors: recommended definitions and classification. **Biosensors Bioelectronics**, v.16, p.121-131, 2001.

Tischer, W.; Kasche, V. Immobilized enzymes: crystals or carriers? **Trends in Biotechnology**, v.17, n.8, p. 326-335, 1999.

Tsigos, I.; Martinou, A.; Kafetzopoulos, D.; Bouriotis, V. Chitin deacetylases: new, versatile tools in biotechnology. **Trends Biotechnology**, v. 18, p.305-316, 2000.

Udagama, R.; Degrandi-Contraires, E.; Creton, C.; Graillat, C.; McKenna, T.F.L.; Bourgeat-Lami, E. Synthesis of polymer-polymer hybrids by miniemulsion polymerization and characterization of hybrid latex. **Macromolecules**, v. 44, p.2632–2642, 2011.

Usseglio-Tomasset L. Properties and use of sulphur dioxide. **Food Additives and Contaminants** v. 9, p.399-404, 1992.

Valero, E.; Varón, R.; García-Carmona, F.A. kinetic study of irreversible enzyme inhibition by an inhibitor that is rendered unstable by enzymic catalysis. **Biochemistry**, v. 277, p. 869-74, 1991.

Vally, H.; Misso, N. L. A.; Madan, V. Clinical effects of sulphite additive. **Clinical & Experimental Allergy**, v.39, p. 1643-1651, 2009.

Vally, H.; Misso, N.L.A. Adverse reactions to the sulphite additives. **Gastroenterology Hepatology Bed to Bench**, v.5, n. 1, p.16-23, 2012.

Vally, H.; Thompson, P.J. Role of sulfite additives in wine induced asthma: Single dose and cumulative dose studies. **Thorax**, v. 56, p. 763-769, 2001.

Vandamme, T. F.; Lenourry, A.; Charrueau, C.; Chaumeil, J.C. The use of polysaccharides to target drugs to the colon. **Carbohydrate Polymer**, v. 48, p. 219-231, 2002.

Vauthier, C.; Bouchemal, K. Methods for the Preparation and Manufacture of Polymeric Nanoparticles. **Pharmaceutical Research**, v. 26, n. 5, p.1025-1058, 2009.

Vejdan, A.; Ojagh, S. M.; Adeli, A.; Abdollahi, M. Effect of TiO<sub>2</sub> nanoparticles on the physico-mechanical and ultraviolet light barrier properties of fish gelatin/agar bilayer film. **LWT-Food Science and Technology**, v. 71, p. 88-95, 2016.

Vieira, A. P.; Santana, S. A. A.; Bezerra, C. W. B.; Silva, H. A. S.; Chaves, J. A. P.; Melo J.C.P.; Silva Filho, E.C.; Airoidi, C. Kinetics and thermodynamics of

textile dye adsorption from aqueous solutions using babassu coconut mesocarp, **Journal Hazardous Materials**, v. 166, p.1272–1278, 2009.

Vieira, I.C.; Lupetti, K.O.; Fatibello-Filho, O. Determination of paracetamol in pharmaceutical products using a carbon paste biosensor modified with crude extract of zucchini (*Cucurbita pepo*). **Química Nova**, v.26, n.1, p.39-43, 2003.

Vieira, I.C.; Lupetti, K.O.; Fatibello-Filho, O. Determinação de paracetamol em produtos farmacêuticos utilizando um biossensor de massa de carbono modificado com extrato bruto de abobrinha (*Cucurbita pepo*). **Química Nova**, v.26, n.1, p.39-43, 2003.

Villeneuve, P.; Muderhwa, J. M.; Graille, J.; Haas, M. J.; J. Review: Customizing lipases for biocatalysis a survey of chemical, physical and molecular biological approaches. **Journal of Molecular Catalysis. B: Enzymatic**, v.9, p.113-148, 2000.

Vu, M.T.; Jeong, Y.I.; Choi, C.; Nam, J.P.; Son, D.H.; Park, J.K.; Kim, W.S.; Kim, M.Y.; Jang, M.K.; Nah, J.W.; Kim, K.J. Surfactant-free nanoparticles of doxorubicin-conjugated poly(DL-lactide-co-glycolide). **Macromolecular Research**, v. 18, p.1115–1120, 2010.

Wang, J.; **Analytical Electrochemistry**, 2nd ed., John Wiley & Sons, Inc.: New York, 2000.

Wang, J.; Liu, W.; Wang, J.; Song, N.; Zhang, Y.; Nie, N.; Wang, J. Folate-decorated hybrid polymeric nanoparticles for chemically and physically combined paclitaxel loading and targeted delivery. **Biomacromolecules**. v.10, n.12, p. 228-234, 2011.

Wang, L.; Jiang, X.; Yan, D.; Wu, J.; Bian, Y.; Wang, F. Behavior and fate of chlorpyrifos introduced into soil–crop systems by irrigation. **Chemosphere**, v.66, p. 391 – 396, 2007.

Wang, X.; Lu, X.; Chen, J. Development of biosensor technologies for analysis of environmental contaminants. **Trends in Environmental Analytical Chemistry**, v. 2, p. 25-32, 2014.

Wang, Y.; Zhou, J.; Liu, L.; Huang, C.; Zhou, D.; Fu, L. Characterization and toxicology evaluation of chitosan nanoparticles on the embryonic development of zebrafish, *Danio Rerio*. **Carbohydrate Polymers**, v. 141, p. 204-210, 2016.

Wheatley, M. A.; Lewandowski, J. Nano-sized ultrasound contrast agent: salting-out method. **Molecular Imaging**, v. 9, p. 96–107, 2016.

Whitaker, J.R. & Lee, C.Y. Recent advances in chemistry of enzymatic browning. Lee, C.Y.; Whitaker, J.R.; eds. In **Enzymatic Browning and Its Prevention**; American Chemical Society: Washington, DC, 1995; ACS Symposium Series; 2–7.



Willett, W.C. Dieta, nutrição e câncer. In: Shills ME, Olson JA, Moshi S, Rossi C, organizadores. **Tratado de nutrição moderna na saúde e na doença**. v. II. 9ªEd. Barueri: Editora Manole, p. 336-40, 2003.

Woolerton, T.W.; Sheard, S.; Chaudhary, Y.S.; Armstrong, F.A. Enzymes and bio-inspired electrocatalysts in solar fuel devices. **Energy & Environmental Science**. v.5, n.6, p.7470-7490, 2012.

Wu, J.; Gao, J.; Chen, H.; Liu, X.; Cheng, H.; Ma, X.; Tong, P. Purification and Characterization of Polyphenol Oxidase from *Agaricus bisporus*. **International Journal Food Properties**, v. 16, p.1483-1493, 2013.

Wu, L.; Zhang, Q.; Shan, L.; Chen, Z. Identifying critical factors influencing the use of additives by food enterprises in China. **Food Control**, v.31, n. 2, p.425-432, 2013.

Xiaohui, L.; Da-Wen, S. Research advances in browning of button mushroom (*Agaricus bisporus*): Affecting factors and controlling methods. **Trends in Food Science & Technology**, v.90, p.63-75, 2019.

Xie, Z.M.; Fei, J.J.; Huang, M.H. Differential pulse anodic stripping voltammetric determination of cadmium (II) at a glassy carbon electrode modified with a nanoTiO<sub>2</sub>/chitosan composite film. **Australian Journal of Chemistry**, v.61, n. 12, p.100-105, 2008.

Yang, J.; Du, Y. Chemical Modification, Characterization and Bioactivity of Chinese Lacquer Polysaccharides from Lac Tree *Rhus Vernicifera* Against Leukopenia Induced by Cyclophosphamide. **Carbohydrate Polymers**, v. 52, p. 405- 410, 2003.

Yang, W.H.; Purchase, E.C. Adverse reactions to sulfites. **Canadian Medical Association Journal**, v.133, p.865-867, 1985.

Zamorano, J.P.; Martínez-Álvarez, O.; Montero, P.; Gómez-Guillén, M.C. Caracterização e distribuição de tecidos de polifenol oxidase de camarão rosa de águas profundas (*Parapenaeus longirostris*). **Food Chemistry**, v.112, n. 1, p.104 –111, 2009.

Zhang, J.; Mungara, P.; Jane, J. Mechanical and thermal properties of extruded soy protein sheets. **Polymer**, v.42, p. 2569-2578, 2001.

Zhang, L.; Webster, T. J. Nanotechnology and nanomaterials: Promises for improved tissue regeneration. **Nanotoday**, v.4, n. 1, p. 66-80, 2009.

## **CAPÍTULO 2**

**Uso de Nanopartículas do Mesocarpo do Babaçu (*Orbignya Phalerata* Mart) como Plataforma para Ancoragem de Enzimas no Desenvolvimento de Biossensores: Um Mapeamento Tecnológico**

**Artigo publicado na revista**

**GEINTEC: Gestão, Inovação e Tecnologias**

## **Uso de Nanopartículas do Mesocarpo do Babaçu (*Orbignya Phalerata* Mart) como Plataforma para Ancoragem de Enzimas no Desenvolvimento de Biossensores: Um Mapeamento Tecnológico**

Ana Siqueira do Nascimento Marreiro Teixeira<sup>1</sup>; Paulo Ronaldo Sousa Teixeira<sup>2</sup>; Carla Eiras<sup>3</sup>

1 Instituto Federal do Piauí – IFPI – Campus Angical, Angical – PI-, Brasil.  
[anamarreiro@ifpi.edu.br](mailto:anamarreiro@ifpi.edu.br)

2 Instituto Federal do Piauí – IFPI – Campus Teresina Zona Sul, Teresina – PI, Brasil. [paulo\\_ronaldo@ifpi.edu.br](mailto:paulo_ronaldo@ifpi.edu.br)

3Universidade Federal do Piauí- UFPI- Campus Ministro Petrônio Portela, Teresina-PI, Brasil [carla.eiras.ufpi@gmail.com](mailto:carla.eiras.ufpi@gmail.com)

### **RESUMO**

A imobilização de enzimas na construção de biossensores torna-se atraente pela capacidade enzimática de catalisar com grande eficiência, reações biológicas com alta sensibilidade e seletividade. A utilização de materiais nanoestruturados, tais como nanopartículas poliméricas, surge como alternativa para aumentar a eficiência da imobilização de enzimas. Dessa forma, surge o interesse na síntese de nanopartículas do mesocarpo do babaçu (*Orbignya phalerata* Mart), por se tratar de um biopolímero natural, atóxico, facilmente encontrado na região nordeste do País. Diante do relatado, o presente trabalho propõe um estudo prospectivo a respeito do desenvolvimento de um biossensor contendo a enzima polifenol oxidase imobilizada sobre a superfície de nanopartículas poliméricas geradas a partir do mesocarpo de babaçu para detecção de sulfitos em produtos alimentícios, visto que tais compostos são causadores de reações alérgicas em indivíduos que apresentam sensibilidade a este conservante. Para o mapeamento científico e tecnológico, foram realizadas buscas nas bases de periódicos Web of Science, Scopus e Scielo, e nos bancos de patentes INPI, Espacenet e USPTO, para todas patentes depositadas, e artigos publicados no período de 2005 a agosto 2016. A partir dos artigos e patentes analisados, constatou-se que os estudos relacionados ao mesocarpo de babaçu são escassos, sendo que o desenvolvimento de um biossensor para detecção de sulfito a base de nanopartículas poliméricas deste biopolímero como plataforma para a imobilização da enzima polifenol oxidase pode ser bastante inovador, visto que não foram encontrados relatos na literatura com abordagem parecida.

Palavras Chave: Polifenol Oxidase, Nanopartículas Poliméricas, Mesocarpo de Babaçu, Biossensor, Sulfito

## 1. INTRODUÇÃO

As alergias alimentares, que afetam até 10% da população geral (Chafen *et al*, 2010), tem aumentado com o processo industrial, visto que indústria de alimentos com o intuito de elevar o tempo de vida útil desses produtos, tem aumentado o emprego de alguns aditivos alimentares, como é o caso dos sulfitos (Polônio *et al*, 2009), gerando uma preocupação com a saúde alimentar e um problema de saúde pública.

Os dados de alergia a aditivos alimentares no Brasil são escassos e carecem de metodologia rigorosa. No entanto, apesar de não ser conhecida a prevalência de reações alérgicas a aditivos alimentares no Brasil, estima-se que sua prevalência em países desenvolvidos, comprovada por testes de provocação, varie de 0,01 a 0,23% (Pereira *et al*, 2008).

Em geral, as reações alérgicas alimentares são originadas por uma hipersensibilidade imunológica, geralmente contra certos ingredientes dispostos nos produtos alimentícios. São responsáveis por sintomas que frequentemente envolvem o trato gastrointestinal (diarreia, vômito), o sistema respiratório (asma, rinite), e a pele (dermatite atópica, urticária) (Berin *et al*, 2011; Leung *et al*, 2008).

A alergia alimentar geralmente é controlada com o tratamento dos sintomas ou evitando o alérgeno (Chruszcz, 2011). No entanto, a contaminação com ingredientes alérgenos "escondidos", ou seja, não identificados nos rótulos, pode causar danos a saúde humana. Diante disso, existe uma preocupação crescente com a necessidade de proteger os consumidores alérgicos de reações alérgicas graves e potencialmente fatais, através da detecção de contaminação e rastreamento dos ingredientes alérgenos, contribuindo para uma rotulagem de alimentos precisa (Ng *et al*, 2016). Nesta perspectiva, são necessários métodos confiáveis, precisos e altamente sensíveis e seletivos para avaliar, com segurança, se um determinado alérgeno está (ou não) presente em um determinado produto alimentício.

Os sulfitos, que incluem o dióxido de enxofre (SO<sub>2</sub>) e seus sais de sódio, potássio e cálcio (Na, K e Ca), são amplamente utilizados como conservantes

em alimentos, cosméticos e medicamentos (Scampicchio *et al*,2008). Devido seu efeito inibitório sobre bactérias, bolores e leveduras e na inibição de reações de escurecimento enzimático e não enzimático são bastante utilizados como conservantes durante processamento e estocagem de alimentos (Pizzoferato *et al*, 1998).

Apesar de sua eficácia na conservação de alimentos, inúmeras reações adversas têm sido relatadas à saúde de algumas pessoas sensíveis aos sulfitos. Na espécie humana os sulfitos podem provocar anafilaxia, urticária, angioedema, hipotensão, náusea, irritação gástrica local, dores de cabeça, distúrbio do comportamento, erupções cutâneas, diarreia e crise asmática em indivíduos asmáticos sensíveis a sulfitos (Luck *et al*, 1995; Machado *et al*, 2006; Dinckaya *et al*, 2007), dessa forma torna-se necessário a detecção e o controle dos agentes sulfitantes adicionados aos alimentos.

Diante do que foi exposto, percebe-se que existe uma real necessidade de métodos eficientes, capazes de detectar quantidades muito baixas de sulfitos em produtos alimentícios, com o intuito de melhorar a segurança alimentar, respondendo às necessidades dos consumidores alérgicos, contribuindo para uma rotulagem mais precisa de produtos alimentícios pela indústria de alimentos.

Nessa perspectiva, acredita-se que os biossensores podem ser uma alternativa para a detecção e quantificação rápida dos sulfitos em produtos alimentares. Segundo a IUPAC, um biossensor é um dispositivo capaz de fornecer informações analíticas “específicas” quantitativas ou semi-quantitativas por meio de um elemento de reconhecimento biológico (receptor bioquímico), que pode estar em contato espacial direto com o elemento de transdução (Rosatto *et al*, 2001). Os biossensores podem ser classificados de acordo com o transdutor, que pode ser eletroquímico, óptico e detector de massa. Ou ainda de acordo com o componente biológico: enzimas, organelas, tecido vegetal ou animal, micro-organismos, antígeno e anticorpo e ácidos nucleicos dentre outros (Li *et al*, 2007).

Dentre as características mais importantes dos biossensores podemos citar sua simplicidade, tempo de análise curto, baixo custo, elevada sensibilidade e estabilidade (Chen *et al*, 2012; Rawal *et al*, 2013; Molinero-Abad *et al*, 2014). A modificação de superfícies ou mesmo a imobilização do transdutor nos

biossensores pode ocorrer por diferentes processos, dentre os quais destaca-se a formação de filmes pelo método de automontagem (Paterno, 2001), gerando os chamados eletrodos quimicamente modificados (EQMs).

O uso de enzimas na construção dos EQMs, são realizados através de métodos de imobilização, no sentido de melhorar a estabilidade da mesma, e, desta forma, reduzir a quantidade de material requerido em muitos processos (Guisan, 2006; Hanefeld *et al*, 2009). Além disso, os métodos de imobilização prolongam o tempo de vida das enzimas, e aumentam o potencial para reutilização das moléculas proteicas, visto que na sua forma livre, as enzimas possuem um curto tempo de vida, o que limita a sua utilização biotecnológica. O interesse no uso de enzimas na construção de biossensores, refere-se ao aumento de sua sensibilidade e estabilidade do dispositivo (Lopez-Gallego *et al*, 2005; Kim *et al*, 2006).

A enzima conhecida como “polifenol oxidase” (PFO), relacionada à oxidação de compostos fenólicos (Mayer, 2006; Wu *et al*, 2013), participa do grupo das oxirredutases e contém dois  $\text{Cu}^{2+}$  como sítios ativos, cada um coordenado com três moléculas de histidina, sendo duas ligações equatoriais fortes e uma axial fraca (Mayer, 2006). As PFO's são encontradas, de forma geral, em tecidos vegetais, principalmente em frutas e hortaliças, em microrganismos (principalmente em fungos) e em alguns animais (Taiz *et al*, 2009). Em química analítica, por exemplo, a polifenol oxidase pode ser usada na construção de biossensores e/ou outros procedimentos enzimáticos para a detecção de compostos dos mais variados tipos tais como polifenóis e paracetamol (Perone *et al*, 2009).

O uso de materiais nanoestruturados pode melhorar a eficiência no processo de imobilização de enzimas, visto que partículas pequenas fornecem uma área superficial maior, levando a uma maior concentração de enzima imobilizada por unidade de massa de partículas (Kim *et al*, 2006). Portanto, nanopartículas poliméricas são uma alternativa ideal dentro da classe de materiais nanoestruturados para a imobilização de enzimas, podendo oferecer também uma limitação difusional mínima e uma eficiência no transporte de elétrons, no caso da aplicação em biossensores (Wang, 2005)

A palmeira *Orbignya phalerata* Mart popularmente conhecida como babaçu, é uma planta da família das Palmáceas e do gênero *Orbignya*

(Cantanhede *et al*, 2005; Teixeira, 2008), cuja área de ocorrência predomina em zonas de várzeas e, eventualmente, em pequenas colinas e elevações (MIC, 1982). Os “babaçuais” estão presentes no sudeste da Amazônia e nos estados do Maranhão, Piauí e Tocantins, onde ocupam cerca de 18 milhões de hectares no país, sendo 502,8 mil hectares no Piauí (Cantanhede *et al*, 2005).

O mesocarpo de babaçu é a substância colhida entre o epicarpo e o endocarpo do coco de babaçu, é biopolímero natural, rentável, sem toxicidade e amplamente utilizado como aglutinante (Aulton, 2005), características que possibilitam diferentes aplicações na área industrial e da saúde. (Almeida *et al*, 2011)

Dentro deste contexto, o presente trabalho propõe uma nova aplicabilidade ao biopolímero mesocarpo do babaçu (*Orbignya phalerata* Mart), o qual será nanoparticulado e, empregado na modificação do substrato com objetivo de gerar um maior número de sítios de ancoragem para a imobilização da enzima polifenol oxidase. O biossensor gerado será empregado em testes de detecção e quantificação de sulfitos presentes em produtos alimentícios.

## 2. METODOLOGIA

Para este mapeamento tecnológico, foi realizado um estudo prospectivo tecnológico e científico buscando as patentes e artigos científicos relacionados com as palavras chaves da pesquisa. Para a busca de patentes, foram utilizadas as bases gratuitas INPI, Espacenet e USPTO. Para a busca de artigos, foram utilizadas as bases de periódicos *Web of Science*, *Scopus* e *Scielo*.

Primeiramente, realizou-se a pesquisa com as palavras-chave em inglês: “*Polyphenol Oxidase*” (polifenol oxidase), “*Polymeric Nanoparticles*” (nanopartículas poliméricas), “*Babassu Mesocarp*” (Mesocarpo de Babaçu), “*Biosensor*” (Biossensor) e “*Sulfite*” (Sulfito). Em seguida, foram analisados as patentes e artigos obtidos com diferentes combinações destas palavras tais como: “*Polyphenol Oxidase*” AND “*Polymeric Nanoparticles*”, “*Polyphenol Oxidase*” AND “*Babassu Mesocarp*”, “*Polyphenol Oxidase*” AND “*Biosensor*”, “*Polyphenol Oxidase*” AND “*Sulfite*”, “*Babassu Mesocarp*” AND “*Polymeric Nanoparticles*”, “*Babassu Mesocarp*” AND “*Biosensor*”, “*Babassu Mesocarp*” AND “*Sulfite*”, “*Polymeric Nanoparticles*” AND “*Biosensor*”, “*Polymeric Nanoparticles*” AND “*Sulfite*”, “*Biosensor*” AND “*Sulfite*”, “*Polyphenol Oxidase*” AND “*Polymeric*

*Nanoparticles*” AND “*Babassu Mesocarp*”, “*Polyphenol Oxidase*” AND “*Babassu Mesocarp*” AND “*Biosensor*”, “*Polyphenol Oxidase*” AND “*Babassu Mesocarp*” AND “*Sulfite*” e “*Babassu Mesocarp*” AND “*Biosensor*” AND “*Sulfite*” para que as buscas fossem refinadas de acordo com o objetivo do trabalho. Em todos os casos as pesquisas foram delimitadas aos campos “título, resumo e palavras-chave”.

Na base de periódicos *Scopus*, a com maior número de publicações com a palavra-chave “*Babassu Mesocarp*”, foram analisadas a quantidade de documentos por ano, os países com maiores números de publicações e as principais áreas de aplicações com esse biopolímero. Na base de dados *Web of Science*, também foram feitas as mesmas buscas para as combinações com as palavras chaves “*Biosensor*” AND “*Sulfite*”.

Na prospecção tecnológica não foi delimitado tempo específico, sendo realizado o levantamento total do número de patentes, já na prospecção científica foi realizado um levantamento do número de artigos científicos publicados nos últimos dez anos, de 2005 até o presente momento, sendo que as buscas nos bancos e patentes e bases científicas foi realizada no mês de agosto de 2016.

### **3. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

#### **3.1 Análise das Patentes Publicadas**

Fazendo uma análise do número de patentes encontradas nas bases europeia (Espacenet) e americana (USPTO) relacionadas às palavras chaves do trabalho (Tabela 1), constatou-se que no geral foram encontrados um número considerável de patentes, sendo que as bases internacionais apresentaram maior número de patentes em relação a base nacional.



**Tabela 1** – Número patentes encontradas com as palavras chave nos bancos *Espacenet*, *USPTO* e *INPI*.

Palavras chave	Espacenet	USPTO	INPI
Polyphenol Oxidase	491	20	5
Babassu Mesocarp	0	0	2
Polymeric Nanoparticles	658	111	32
Biosensor	>10.000	1.243	55
Sulfite	>10.000	1.204	98

Fonte: O autor (2016)

Este dado demonstra a realidade do Brasil com relação a inovação, onde apesar do país encontrar-se em ascensão com relação ao número de patentes depositadas, este número ainda é bastante inferior as outras bases internacionais, o que demonstra que os países desenvolvidos investem bastante na área de pesquisa e inovação. Segundo Arbix (2005), o Brasil não tem conseguido acompanhar o ritmo de produção tecnológica mundial quando considerado o indicador patente. E que embora tenha havido um aumento do número de patenteamento no mundo, o Brasil não acompanhou quantitativamente o crescimento de países como a China e os EUA.

Constatou-se também, que nas buscas foram localizadas duas patentes relacionadas a palavra “mesocarpo de babaçu” no banco nacional de patentes INPI, e que não foram encontradas nenhuma patente com essa palavra chave, nos bancos internacionais EPO e USPTO, o que demonstra que o Brasil tem sido pioneiro em pesquisas com esta planta, por ser uma espécie característica do país, sendo encontrada em abundância nas regiões norte e nordeste.

Das duas patentes encontradas com a palavra-chave “mesocarpo de babaçu”, a primeira, a PI 1004478-7 A2, descreve o processo de preparação do mesocarpo do coco de babaçu para remoção de íons metálicos em soluções hidroetanólicas. E a segunda, BR 10 2012 004990-2 A2, descreve o processo de produção de barra nutritiva utilizando mandioca, mel, mesocarpo de babaçu e pedúnculo de castanha de caju para o consumo humano.

No sentido de fazer um refinamento maior na pesquisa realizada, foram utilizadas combinações com duas e três palavras chave relacionadas a pesquisa, conforme verificado nas Tabela 2 e 3.

**Tabela 2** – Número patentes encontradas combinando duas palavras chave relativas ao trabalho nos bancos *Espacenet*, *USPTO* e *INPI*.

Palavras chave	Espacenet	USPTO	INPI
“Polyphenol Oxidase” AND “Babassu Mesocarp”	0	0	0
“Polyphenol Oxidase” AND “Polymeric Nanoparticles”	0	0	0
“Polyphenol Oxidase” AND “Biosensor”	1	0	0
“Polyphenol Oxidase” AND “Sulfite”	1	0	0
“Babassu Mesocarp” AND “Polymeric Nanoparticles”	0	0	0
“Babassu Mesocarp” AND “Biosensor”	0	0	0
“Babassu Mesocarp” AND “Sulfite”	0	0	0
“Polymeric Nanoparticles” AND “Biosensor”	0	0	0
“Polymeric Nanoparticles” AND “Sulfite”	0	0	0
“Biosensor” AND “Sulfite”	0	0	0

Fonte: O autor (2016)

Quando realizada a combinação das palavras chave “Polyphenol Oxidase” e “Biosensor”, foi encontrada a patente CN103421878 no banco europeu Espacenet, que trata de um biossensor utilizando a enzima polifenol oxidase com nanoesferas de carbono para o uso na detecção de pesticidas.

Na combinação das palavras chave “Polyphenol Oxidase” e “Sulfite”, foi encontrada a patente JPH07289163 no banco europeu Espacenet, que trata de uma película comestível para frutas e verduras, contendo um inibidor da enzima polifenol oxidase, capaz de prevenir a descoloração das frutas e verduras quando cortadas ou descascadas.

Cabe ressaltar que não foi encontrado nenhum resultado nos três bancos pesquisados com as combinações “Biosensor” e “Sulfite”, o objetivo do desenvolvimento desta pesquisa.

**Tabela 3** – Número patentes encontradas combinando três palavras chave relativas ao trabalho nos bancos *Espacenet*, *USPTO* e *INPI*.

Palavras-chave	Espacenet	USPTO	INPI
“Polyphenol Oxidase” AND “Polymeric Nanoparticles” AND “Babassu Mesocarp”	0	0	0
“Polyphenol Oxidase” AND “Babassu Mesocarp” AND “Biosensor”	0	0	0
“Polyphenol Oxidase” AND “Babassu Mesocarp” AND “Sulfite”	0	0	0
”Babassu Mesocarp” AND “Biosensor” AND “Sulfite”	0	0	0

Fonte: O autor (2016)

Observa-se que tanto na Tabela 2 quanto na Tabela 3, que quando utilizada a palavra chave “Babassu Mesocarp” nas combinações, não foi encontrada nenhuma patente nos três bancos pesquisados, o que comprova o relatado por Bandeira e seus colaboradores já no ano de 1986, os quais afirmaram que estudos de caracterização do mesocarpo do babaçu são escassos, o que evidencia a necessidade e importância de novos estudos dessa natureza para um melhor aproveitamento da planta.

### 3.2 Análise dos Artigos Publicados

O número de artigos científicos publicados com as palavras chave nas bases científicas *Web of Science*, *Scopus* e *Scielo* estão ilustrados na Tabela 4. Comparando com o número de patentes depositadas nos bancos nacionais e internacionais, percebe-se que o número de artigos científicos publicados com as palavras chave “*Polyphenol Oxidase*”, “*Polymeric Nanoparticles*”, “*Biosensor*”, “*Sulfite*” e “*Babassu Mesocarp*” foi relativamente superior. No entanto, o número de publicações com o mesocarpo de babaçu ainda é pequeno quando comparado às demais palavras chave pesquisadas.

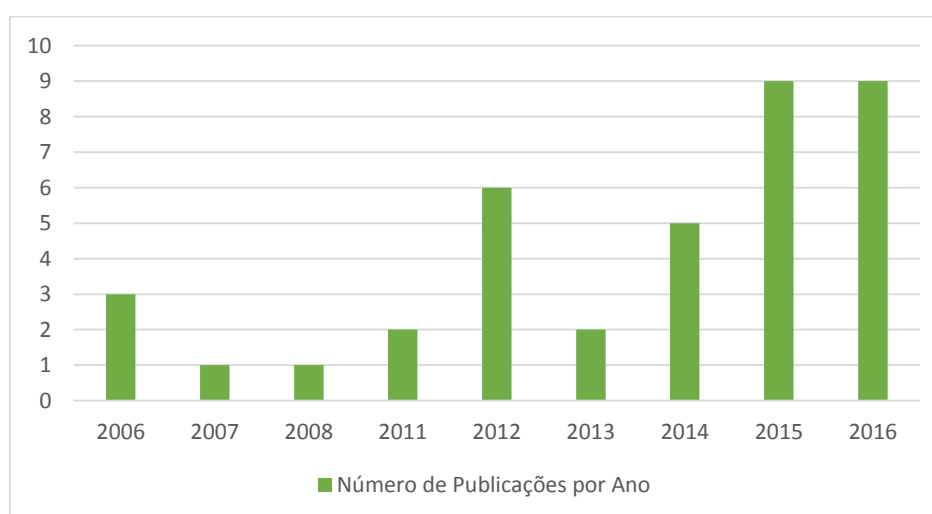
**Tabela 4** – Número de artigos encontrados com as palavras chave nas bases científicas *Web of Science*, *Scopus* e *SciELO*.

Palavras chave	Web of Science	Scopus	SciELO
Polyphenol Oxidase	3.568	3.477	79
Babassu Mesocarp	30	38	30
Polymeric Nanoparticles	2.869	2.680	11
Biosensor	29.070	29.552	76
Sulfite	4.870	5.100	75

Fonte: O autor (2016)

A análise dos 38 artigos encontrados na base científica *Scopus* a partir da busca com a palavra chave “Babassu Mesocarp”, nos últimos 10 anos, mostra que os anos de 2014, 2015 e 2016 tiveram os maiores números de publicações e que os anos de 2007 e 2008 foram os de menores publicações conforme ilustrado na Figura 1. Percebe-se ainda que de 2014 a 2016 houve uma nova ascensão no número de publicações, o que demonstra que pesquisas com este biopolímero voltaram a estar em evidência.

**Figura 1** - Artigos publicados nos últimos 10 anos para a palavra “Babassu Mesocarp”

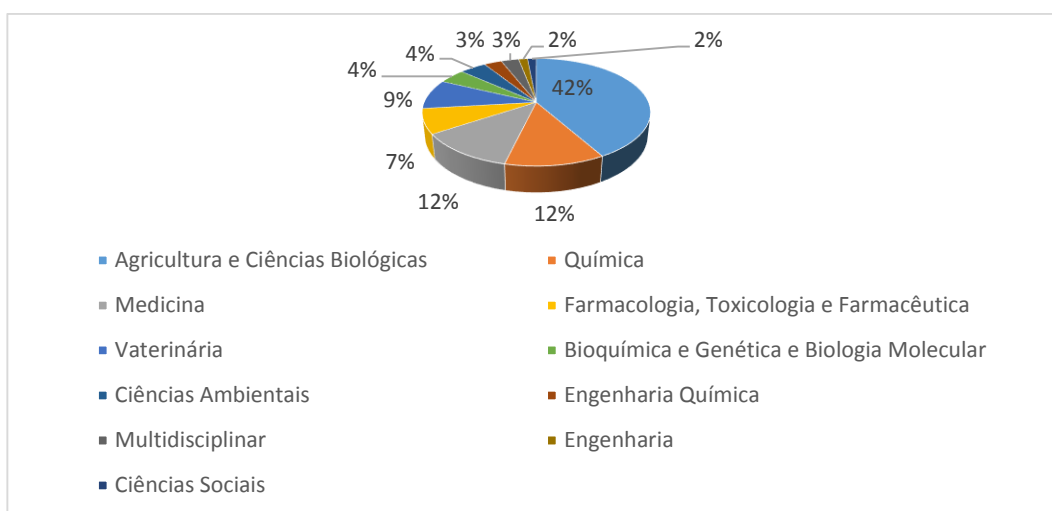


Fonte: O autor (2016)

Desses 38 artigos publicados com a palavra-chave “Babassu Mesocarp”, 35 tiveram origem no Brasil, 1 na França, 1 na Irlanda e 1 nos Estados Unidos, o que também confirma os dados levantados na pesquisa das patentes, indicando que o Brasil tem se destacado e tem sido pioneiro em pesquisas nesta área, embora se tenha observado que outros países como a França tenham realizado pesquisas recentes (ano de 2014) com esse biopolímero.

Fazendo um diagnóstico das principais áreas de publicações com essas palavras-chave, constatou-se que as maiores áreas de interesse para publicação são Agricultura e Ciências Biológicas, Química, Medicina, Farmacologia, Toxicologia e Farmacêutica, e Veterinária conforme ilustrado na Figura 2.

**Figura 2** - Principais áreas de publicações com a palavra chave “Mesocarpo de Babaçu”.



Fonte: O autor (2016)

Fazendo uma varredura a respeito das combinações com as palavras chaves nas bases *Web of Science*, *Scopus* e *Scielo* conforme representado na Tabela 5, constatou-se que não foram encontrados nenhum artigo com as combinações utilizando a palavra “Babassu Mesocarp”, o que demonstra que estudos com a utilização desse biopolímero na forma de nanopartículas, em conjunto com a polifenol oxidase, para uso em biossensores para detecção de sulfitos, são inovadores.

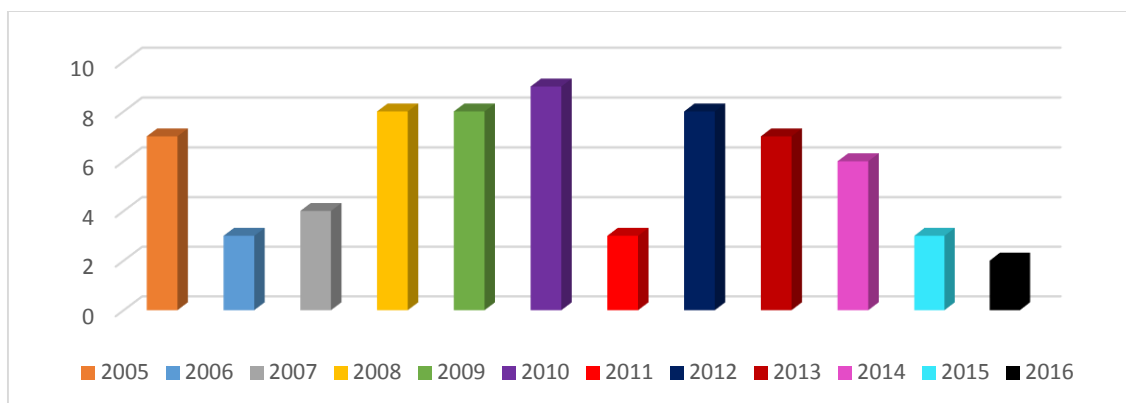
**Tabela 5** – Número de artigos publicados com as combinações das palavras chaves nas bases de dados *Web of Science*, *Scopus* e *SciELO*.

<b>Palavras chave</b>	<b>Web of Science</b>	<b>Scopus</b>	<b>SciELO</b>
Polyphenol Oxidase AND Babassu Mesocarp	0	0	0
Polyphenol Oxidase AND Polymeric Nanoparticles	0	0	0
Polyphenol Oxidase AND Biosensor	157	86	1
Polyphenol Oxidase AND Sulfite	39	28	0
Babassu Mesocarp AND Polymeric Nanoparticles	0	0	0
Babassu Mesocarp AND Biosensor	0	0	0
Babassu Mesocarp AND Sulfite	0	0	0
Polymeric Nanoparticles AND Biosensor	8	13	0
Polymeric Nanoparticles AND Sulfite	0	1	0
Biosensor AND Sulfite	68	44	0
Polyphenol Oxidase AND Polymeric Nanoparticles AND Babassu Mesocarp	0	0	0
Polyphenol Oxidase AND Babassu Mesocarp AND Biosensor	0	0	0
Polyphenol Oxidase AND Babassu Mesocarp AND Sulfite	0	0	0
Babassu Mesocarp AND Biosensor AND Sulfite	0	0	0

Fonte: O autor (2016)

Analisando mais profundamente os artigos encontrados na base científica *Web of Science* por ser a que apresenta o maior número de publicações (68 artigos) com a combinação das palavras-chave “Biosensor” e “Sulfite” nos últimos dez anos, percebeu-se que os maiores números de publicações foram registrados para os anos 2008, 2009, 2010 e 2012, conforme ilustrado na Figura 3.

**Figura 3** - Artigos publicados nos últimos 10 anos para a combinação “Biosensor” e “Sulfite”.



Fonte: O autor (2016)

Fazendo um diagnóstico das principais áreas de publicações com a combinação dessas palavras chave, constatou-se que as áreas que abrangem um maior número de artigos são: Química, Eletroquímica e Biologia Molecular conforme ilustrado na Figura 4.

**Figura 4** – Principais áreas de publicações relacionadas a combinação das palavras chaves “Biosensor” e “Sulfite”





Bandeira, M. A. M.; Matos, M.E.O.; Matos, F.J.A.; Maia, M.B.S. Contribuição ao estudo químico do coco babaçu. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, p. 27-28, 1986.

Berin, M.C.; Sicherer, S. Food allergy: mechanisms and therapeutics. **Current Opinion in Immunology**, v. 23, p. 794-800, 2011.

Cantanhede, L.B. **Avaliação da capacidade de adsorção do epicarpo de babaçu (*Orbygnia phalerata*) in natura frente a diferentes adsortivos**. Universidade Federal do Maranhão, São Luis, 115f, 2005.

Chafen, J.J.S; Newberry, S.J.; Riedl, M. A.; Bravata, D.M.; Maglione, M.; Suttorp, M.J.; Sundaram, V.; Paige, N.M.; Towfigh, A.; Hulley, B.J.; Shekelle, P.G. Diagnosing and Managing Common Food Allergies. A Systematic Review. *The Journal. American Medical Association*, v. 303, p. 1848-1856, 2010.

Chen, P.Y.; Chi, Y.M.; Yang, H.H.; Y. Shih, Y. Oil Spills Detection and Monitoring Using Airborn Thermal Infrared Remote Sensing in Dalian Xingang Oil Pipeline Explosion, **Journal Electroanalytical Chemistry**, v. 675, p.1-4, 2012.

Chruszcz, M.; Maleki, S.J.; Majorek, K.A.; Demas, M.; Bublin, M.; Solberg, R.; Hurlburt, B.K.; Ruan, S.; Mattison, C.P.; Breiteneder, H.; Minor, W. J. Structural and immunologic characterization of Ara h1, a major peanut allergen. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 286, p. 39318-39327, 2011

Dinckaya, E., Sezginurk, M.K., Akyilmaz, E., Ertas, F.N. Sulfite determination using sulfite oxidase biosensor based glassy carbon electrode coated with thin mercury film. **Food Chemistry**, v.101, p.1540–1544, 2007.

Guisan, J. M. Em **Immobilization of Enzymes and Cells**; Guisan J. M., ed.; Humana Press: Totowa, 2006, cap. 1.

Hanefeld, U.; Gardossi, L.; Magner, E.; Understanding enzyme immobilisation. **Chemical Society Reviews**, v.38, p.453-468, 2009

Kim, J.; Grate, J. W.; Wang, P. Nanostructures for enzyme stabilization. **Chemical Engineering Science**, v. 61, p. 1017–1026, 2006.

Leung, A.; Kamat, D. CM Chesterton, *Alergias alimentares* (Ed.): New Research, **Nova Science Publishers Inc.**, p. 91-120, 2008.

Li, X.; Ju, H.; Ding, C.; Zhang, S. Nucleic acid biosensor for detection of hepatitis B virus using 2,9-dimethyl-1,10-phenanthroline copper complex as electrochemical indicator. **Analytica Chimica Acta**, v. 582, p.158-163, 2007.

Lopez-Gallego, F.; Montes, T.; Fuentes, M.; Alonso, N.; Grazu, V.; Betancor, L.; Guisan, J. M.; Fernandez-Lafuente, R. Improved stabilization of chemically

aminated enzymes via multipoint covalent attachment on glyoxyl supports. **Journal Biotechnology**, v. 116, p. 1-10, 2005.

Lück, E.; Jager, M. **Conservación química de los alimentos, características, usos, efectos**. 2<sup>o</sup> Edición. Zaragoza: Editora Acribia; 1995.

Machado, R.M, Toledo, M.C. Sulfitos em Alimentos. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 9, n. 4, p. 265-75, 2006.

Mayer, A.M. Polyphenol oxidase in plants and fungi: A Review. **Phytochemistry**, v. 67. p. 2318-2331, 2006

MIC – Ministério de Indústria e Comércio. Secretaria de Tecnologia Industrial. **Mapeamento e levantamento do potencial das ocorrências de babaçuais: estados do Maranhão, Piauí, Mato Grosso e Goiás**. Brasília, 1982.

Molinero-Abad, B.; Alonso-Lomillo, M.A.; Dominguez-Renedo, O.; Arcos-Martinez, M.J. Sulfite oxidase biosensors based on tetrathiafulvalene modified screen-printed carbon electrodes for sulfite determination in wine. **Analytica Chimica Acta**, v. 812, p.41–44, 2014.

Ng, E.; Nadeau, K.C.; Wang, S.X. Giant magnetoresistive sensor array for sensitive and specific multiplexed food allergen detection. **Biosensors and Bioelectronics**. v. 80, p.359–365, 2016.

Paterno, L.G.; Mattoso, L.H.C.; JR, O. Filmes poliméricos ultrafinos produzidos pela técnica de automontagem: preparação, propriedades e aplicações. **Química Nova**, v. 24, n. 2, p.228-235, 2001.

Pereira, A.C.; Moura, S.M.; Constant, P.B; Alergia alimentar: sistema imunológico e principais alimentos envolvidos. **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 29, n. 2, p.189-200, 2008.

Perone, C. A. S.; Capobianco, M. P.; Junior, S. P. Determinação de polifenóis (taninos) em produtos alimentícios (chás) usando biossensor de Polifenol oxidase, obtida de extrato bruto da casca de banana nanica (*Musa acuminata*) e caracterização desse biossensor. **Revista do Instituto de Ciências da Saúde**, v. 27, n. 1, p.28-34, 2009.

Pizzoferrato. L.; Di Lullo, G.; Quattrucci, E. Determination of free, bound and total sulphites in foods by indirect photometry-HPLC. **Food Chemistry**, v. 63, n. 2, p.275-79, 1998.

Polônio, M.L.T.; Peres, F. Consumo de aditivos alimentares e efeitos à saúde: desafios para a saúde pública brasileira. **Caderno Saúde Pública**, v. 25, n. 8, p.1653-166, 2009.

Rawal, R.; Chawla, S.; Pundir, C.S. An electrochemical sulfite biosensor based on gold coated magnetic nanoparticles modified gold electrode. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 31, p.144– 150, 2012

Rosatto, S.S.; Freire, R.S.; Dúran, N.; Kubota, L.T. Biossensores amperométricos para determinação de compostos fenólicos em amostras de interesse ambiental. **Química Nova**, v. 24, n.1, p. 77-86, 2001

Scampicchio, M.; Lawrence, N.S.; Arecchi, A.; Mannino, S. Determination of Sulfite in Wine by Linear Sweep Voltammetry. **Electroanalysis**, v. 20, n. 4, p.444-47, 2008.

Taiz, L.; Zeiger, E. **Fisiologia vegetal**. 4.ed. Porto Alegre: Artmed, 2009.

Teixeira, M.A., Babassu: A new approach for an ancient Brazilian biomass. **Biomass & Bioenergy**, v. 32, p. 857-86, 2008.

Wang, J. Nanomaterial-based electrochemical biosensors. **Analyst**, v. 130, p.421-426, 2005.

Wu, J.; Gao, J.; Chen, H.; Liu, X.; Cheng, W.; Ma, X. Purification and characterization of polyphenol oxidase from *Agarius bisporus*. **International Journal Food Properties**, v. 16, p.1483-1493, 2013.

## **CAPÍTULO 3**

**Biossensor a Base de Nanopartículas de Mesocarpo de Babaçu  
(*Orbignya phalerata* Mart) para Detecção Indireta de Sulfito  
em Sucos Industrializados**

**Biossensor a Base de Nanopartículas de Mesocarpo de Babaçu (*Orbignya phalerata* Mart) para Detecção Indireta de Sulfito em Sucos Industrializados**

Ana Siqueira do Nascimento Marreiro Teixeira<sup>1,2</sup>, Paulo Ronaldo Sousa Teixeira<sup>2</sup>, Emanuel Airton de Oliveira Farias<sup>3</sup>, Brandon Ferraz e Sousa<sup>4</sup>, Kátia Bonfim Leite de Moura Sérvulo<sup>4</sup>, Durcilene Alves da Silva<sup>3</sup> e Carla Eiras<sup>1\*</sup>

1-Laboratório de Pesquisa e Desenvolvimento de Novos Materiais e Sensores MatSens, CT, UFPI, Campus Ministro Petrônio Portela, Teresina-PI, 64049-550, Brasil.

2-Instituto Federal de Educação Ciência e Tecnologia do Piauí - IFPI, Teresina – PI, 64018-900, Brasil.

3-Núcleo de Pesquisa em Biodiversidade e Biotecnologia, BIOTEC, Universidade Federal do Delta do Parnaíba (UFDPAR), Parnaíba, PI, 64202-020, Brasil.

4- Departamento de Bioquímica e Farmacologia, Universidade Federal do Piauí, Teresina, PI, 64049-550, Brasil.

\*carla.eiras.ufpi@gmail.com

## RESUMO

O presente trabalho propõe um novo biossensor eletroquímico de sulfito à base de nanopartículas de mesocarpo de babaçu (MBNPs) imobilizadas na superfície de um eletrodo de grafite pirolítico (ECP). As nanopartículas sintetizadas apresentaram tamanho de 121,5 nm, potencial zeta de -28,1 mV e foram utilizadas como suporte para imobilização da quitosana (QUIT) e da enzima polifenol oxidase (PPO) obtida de batata-doce (*Ipomea potato* (L.)). A atividade eletroquímica do biossensor ECP/MBNPs/QUI/GA/PFO foi avaliada pelas técnicas de voltametria cíclica (VC) e voltametria de onda quadrada (VOQ), onde o biossensor apresentou sensibilidade de  $2,18 \mu\text{A}/\mu\text{mol L}^{-1}$ , limite de detecção  $0,151 \mu\text{mol L}^{-1}$  e limite quantificação de  $0,452 \mu\text{mol L}^{-1}$  ao aditivo sulfito. O princípio da análise do biossensor desenvolvido baseia-se no efeito inibidor do sulfito na atividade da enzima PFO. O biossensor desenvolvido foi empregado com sucesso na análise de suco industrial, sem a necessidade de pré-tratamento da amostra.

palavras-chave: biossensor enzimático, polifenol oxidase, detecção de sulfito, nanopartículas poliméricas, biossensor eletroquímico

## ABSTRACT

The present work proposes a new electrochemical sulfite biosensor based on babassu mesocarp nanoparticles (BMNPs) immobilized on the surface of a pyrolytic graphite electrode (PGE). The synthesized nanoparticles had a size of 121.5 nm and a zeta potential of -28.1 mV and were used as a support for the immobilization of chitosan (CHIT) and polyphenol oxidase (PPO) obtained from sweet potatoes (*Ipomea batatas* (L.)). The electrochemical activity of the PGE/BMNPs/CHIT/GA/PPO biosensor was evaluated by the cyclic voltammetry (CV) and square wave voltammetry (SWV), and the biosensor was shown to have a sensitivity of  $2.18 \mu\text{A}/\mu\text{mol L}^{-1}$ , a detection limit of  $0.151 \mu\text{mol L}^{-1}$  and a quantitation limit of  $0.452 \mu\text{mol L}^{-1}$  for sulfite. The principle of analysis for the developed biosensor is based on the inhibitory effect of sulfite on the activity of the PPO enzyme. This biosensor was successfully employed for the analysis of industrial juice, without the need to pre-treat the sample.

**keywords:** enzymatic biosensor; polyphenol oxidase; sulfite detection; polymeric nanoparticles; electrochemical biosensor

## 1. INTRODUÇÃO

Os aditivos alimentares são substâncias de origem natural ou sintética, que são adicionados aos alimentos para atribuir uma determinada função tecnológica ou sensorial, por exemplo, combater o perecível e a degradação bacteriana, dar ou restaurar a cor e conferir sabor aos alimentos (Emerton & Choi, 2008).

Os aditivos alimentares podem ser divididos em 6 grupos: conservantes, aditivos nutricionais, corantes, agentes aromatizantes, agentes texturizantes e os agentes diversos. Além disso, os conservantes são subdivididos em antimicrobianos, antioxidantes e agentes anti-branqueamento (Saltmarsh *et al*, 2013).

Dentre os aditivos alimentares conservantes, podemos destacar os sulfitos ou agentes sulfitantes, tais como: dióxido sulfúrico ( $\text{SO}_2$ ), sulfito de sódio ( $\text{Na}_2\text{SO}_3$ ), sulfito de potássio ( $\text{K}_2\text{SO}_3$ ), bissulfito sódico ( $\text{NaHSO}_3$ ), bissulfito de potássio ( $\text{KHSO}_3$ ), metabissulfito sódico ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ ) e metabissulfito de potássio ( $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_5$ ) (Scampicchio *et al*, 2008; Bahmani *et al*, 2010). Estes aditivos são utilizados para melhorar o aroma dos alimentos, clarear e estabilizar os produtos alimentícios, evitar a fermentação, além de apresentarem ação antimicrobiana (Filik & Çetintas, 2012; Mattison *et al*, 2014). São largamente empregados em alimentos como vinhos, sucos industrializados, frutas secas, biscoitos desidratados e peixes (Suh *et al*, 2007; Iammarino *et al*, 2012).

Apesar de sua eficácia na conservação de alimentos, inúmeras reações adversas têm sido relatadas à saúde de algumas pessoas sensíveis aos sulfitos. Estudos demonstram que a ingestão extensiva deste aditivo induz efeitos nocivos para células e tecidos, causando ataques asmáticos com risco de vida e reações alérgicas em indivíduos (Vally *et al*, 2009; Iwasawa *et al*, 2009). Também foram relatados na literatura sintomas como dermatites, urticária, rubor, hipotensão, dor abdominal e diarreia (Machado *et al*, 2006; Stohs & Miller, 2014).

Devido a estes efeitos nocivos, percebe-se que existe uma necessidade de monitoração dos níveis de sulfito no processamento de alimentos e bebidas, no sentido de manter o cumprimento das diretrizes reguladoras propostas pelas legislações vigentes. A *Food and Drug Administration*, USA, recomenda etiquetas de advertência em qualquer produto



alimentício contendo mais de 10 mg/kg de sulfito, ou bebida contendo mais de 10 mg/L de sulfito (Dinckaya *et al*, 2007).

Existem várias técnicas para análise quantitativa de sulfito, tais como: titulação (Lowinsohn *et al*, 2001), cromatografia (Koch *et al*, 2010), eletroforese capilar (Daunoravicius *et al*, 2002; Carvalho *et al*, 2005), análise de injeção de fluxo (Satieperakul *et al*, 2010; Amatatongchai *et al*, 2015) e espectroscopia de fluorescência (Yang *et al*, 2002; Wang *et al*, 2014). No entanto, algumas destas técnicas apresentam análises geralmente demoradas, enquanto outras, necessitam de pré-tratamento de amostras ou apresentam custo elevado.

Nessa perspectiva, acredita-se que os biossensores são uma alternativa viável para a detecção e quantificação rápida dos sulfitos em produtos alimentícios, por serem dispositivos simples, de baixo custo, que apresentam elevada sensibilidade e estabilidade, e tempo de análise curto (Chen *et al*, 2012; Rawal *et al*, 2012; Molinero-Abad *et al*, 2014).

Os biossensores enzimáticos, são construídos por meio da imobilização de enzimas na superfície do eletrodo. O uso das enzimas na construção de biossensores tem despertado interesse devido ao aumento da seletividade e estabilidade do dispositivo (Lopez-Gallego *et al*, 2005; Kim *et al*, 2006).

Das enzimas utilizadas na construção de biossensores, podemos destacar a enzima polifenol oxidase (PFO), também conhecida como tirosinase ou catecol oxidase. Esta enzima é uma oxidoreductase natural, tem dois átomos de cobre no seu centro ativo, e catalisa as reações de oxidação, incluindo a hidroxilação de monofenóis em o-difenóis e subsequentemente, a oxidação de difenóis para o-quinonas na presença de oxigênio molecular (Fiorentino *et al*, 2010; Falguera *et al*, 2012; Janegitz, *et al* 2012).

Outro material bastante utilizado na construção dos biossensores são as nanopartículas, que tem ganhado destaque devido suas propriedades tais como elevada área superficial e baixa limitação difusional, que proporcionam um ambiente adequado para a imobilização das enzimas, mantendo a sua bioatividade e, ao mesmo tempo, facilitando a transferência de elétrons entre o centro redox e a superfície do eletrodo (Katz & Willner, 2004; Guo & Wang, 2007; Zang *et al*, 2009).

As nanopartículas poliméricas utilizadas no presente trabalho foram desenvolvidas a partir do polímero natural mesocarpo de babaçu (*Orbignya*

*phalerata* Mart). O mesocarpo de babaçu (MB) é a substância colhida entre o epicarpo e o endocarpo do coco de babaçu (Teixeira *et al*,2018), sem toxicidade e amplamente utilizado como aglutinante, características que possibilitam diferentes aplicações na área industrial e da saúde (Aulton, 2005, Almeida *et al*, 2011).

Diante do que foi exposto, o presente trabalho objetivou a construção de um biossensor eletroquímico para determinação indireta de sulfito em sucos industrializados, usando um eletrodo de carbono grafite pirolítico modificado com as nanopartículas poliméricas do mesocarpo de babaçu (MBNPs), a enzima polifenol oxidase, além da quitosana e do glutaraldeído para construção da camada ativa.

## 2. EXPERIMENTAL

### 2.1 Materiais e Reagentes

Os reagentes utilizados no decorrer do trabalho foram: Dimetilsulfóxido (DMSO) (Sigma-Aldrich), polivinilpirrolidona (PVP) (Sigma-Aldrich), catecol ( $C_6H_6O_2$ ) (Sigma-Aldrich), quitosana- GD=85 % (QUIT) (Sigma-Aldrich), sulfito de sódio ( $Na_2SO_3$ ) (Sigma-Aldrich), glutaraldeído (GA) (Vetec) 50% (v/v), fosfato de sódio monobásico ( $NaH_2PO_4$ ) (Sigma-Aldrich), e fosfato de sódio bibásico  $Na_2H_2PO_4$  (Sigma-Aldrich), todos apresentando padrão analítico, não necessitando de purificação prévia. Nos estudos de interferentes foram utilizados o ácido ascórbico (Dinâmica), o sorbato de potássio (Dinâmica) e a sacarose (Dinâmica) todos apresentando padrão analítico.

A solução do mesocarpo de babaçu (*Orbignya phalerata* Mart) 0,5g  $L^{-1}$  foi preparada em DMSO, enquanto que as soluções de catecol (0,05 mol  $L^{-1}$  e 0,001 mol  $L^{-1}$ ), e as de sulfito de sódio 0,1 mol  $L^{-1}$  foram preparadas diariamente em solução tampão fosfato 0,1 mol  $L^{-1}$  (pH 7,2), que foi obtida utilizando os sais  $NaH_2PO_4$  e  $Na_2H_2PO_4$ . O tampão fosfato 0,1 mol  $L^{-1}$  (pH 7,2) também foi empregado como eletrólito suporte em todas as medidas eletroquímicas com o biossensor. A solução de quitosana 1,0 g  $L^{-1}$  foi preparada em ácido acético diluído em água ultrapura do sistema MilliQ 1% (v/v), e a solução de gluraldeído 2,5% (v/v) foi preparada em tampão fosfato 0,1 mol  $L^{-1}$  (pH 7,2).

O mesocarpo do coco de babaçu *in natura* foi adquirido no Departamento de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Piauí (Brasil) na

forma de pó, e em seguida foi realizada a granulometria por peneiramento para a seleção do tamanho do grão, que foi de aproximadamente 0,074 mm. As batatas doces (*Ipomoea batatas* (L.) (Lam.)), e as amostras de suco industrializadas foram adquiridas no comércio local da cidade de Teresina-Pi.

## **2.2 Síntese das MBNPs**

As MBNPs foram preparadas pelo método de diálise. Neste método o polímero é dissolvido em um solvente orgânico e armazenado em uma membrana de diálise, onde a formação de nanopartículas baseia-se na troca lenta do solvente orgânico com a água (Rao e Geckeler, 2011). O MB foi dissolvido em DMSO, obtendo concentração final de 0,50 g L<sup>-1</sup>. Para diluição total do MB, a solução foi mantida em agitação (500 rpm), e aquecimento (50 °C), por 1 hora, e posteriormente, em banho de ultrassom pelo mesmo período de tempo.

Em seguida, a solução de MB preparada em DMSO foi colocada em membrana de diálise com 76 mm de espessura e 12 kDa de limite de exclusão, para diálise em água ultrapura (sistema milliQ) por 72 horas. Durante este período a água de diálise foi trocada duas vezes ao dia a cada 12h. Utilizou-se a Espectroscopia na Região do Ultravioleta-Visível para monitorar a presença do DMSO durante a diálise.

Ao final do processo, a dispersão de MBNPs foi filtrada usando um filtro com abertura de 0,45 µm para remover os precipitantes, e o filtrado foi reservado em tubo falcon para análises posteriores. O pH da solução das MBNPs foi medido em um pHmetro de bancada HI 2221 Hanna instrumens, apresentando valores de pH igual a 8,5.

### **2.2.1 Espalhamento Dinâmico da Luz (DLS) e Potencial Zeta**

As análises de DLS e potencial zeta, obtidas por meio do equipamento Zetasizer Nano-ZS90-Malvern, foram realizadas no sentido de verificar o tamanho médio e a carga das MBNPs. O diâmetro hidrodinâmico foi medido por DLS, usando um laser de 633 nm com um ângulo de dispersão fixo de 173°. Para as análises de DLS, cada amostra foi medida em triplicata a uma temperatura de 25°C.

### 2.2.2 Microscopia Eletrônica de Varredura

A morfologia das MBNPs foi registrada pelo microscópio eletrônico de varredura FEI Quanta FEG 250. Para preparar a amostra de MEV, 50 $\mu$ L da suspensão das MBNPs foi depositada em um substrato revestido de papel alumínio, sendo em seguida a amostra seca e revestida de ouro.

### 2.3 Preparação do Extrato Bruto Enzimático

A polifenol oxidase (PFO) foi obtida a partir de batatas doces (*Ipomoea batatas* (L.) (Lam.)), usando o extrato bruto como fonte enzimática. As batatas doces foram lavadas em água corrente, descascadas e cortadas em pequenos pedaços para facilitar a homogeneização. Posteriormente, uma massa de 25 g desse tubérculo foi homogeneizada em um liquidificador com 100 mL de solução tampão fosfato 0,1 mol L<sup>-1</sup> (pH 7,2) gelado, contendo 2,5g de PVP por 2 minutos. Em seguida o homogenato foi filtrado em quatro camadas de gaze e centrifugada em uma centrífuga de bancada Sigma 2K15, a 15.000 rpm durante 30 minutos a 4°C. A solução sobrenadante foi então armazenada em um refrigerador a 4 °C e utilizada como fonte enzimática da PFO para determinação da atividade enzimática e concentração de proteínas solúveis totais.

#### 2.3.1 Determinação da Atividade da PFO no Extrato Bruto

A atividade da PFO presente neste extrato enzimático bruto foi determinada utilizando-se o catecol como substrato. Utilizou-se 0,2 mL da solução do extrato enzimático e 2,8 mL da solução de 0,05 molL<sup>-1</sup> de catecol em solução tampão fosfato 0,1 mol L<sup>-1</sup>, pH 7,2 a 25 °C. A absorvância da  $\sigma$ -quinona (produto resultante da reação) foi medida em um Espectrofotômetro UV-Visível Cary 60 - Agilent Technologies, utilizando uma cubeta de quartzo com um caminho óptico de 1,0 cm, em um  $\lambda$  igual a 410nm, durante 2 minuto de reação. Unidade de atividade é definida como a quantidade de enzima que causa o aumento de 0,001 unidades de absorvância por minuto (Lupetti *et al*, 2003; Harper, 1973).

$$a = \frac{\Delta A \times 60 \times 1000}{\Delta t \times d \times V_{amostra}}$$

Sendo:  $a$  = unidade da atividade da PFO por mL;  $\Delta A$  = variação de absorvância;  $\Delta t$  = variação do tempo da reação (min.);  $d$  = diâmetro da cubeta;  $V_{\text{amostra}}$  = Volume da amostra (mL).

### 2.3.2 Determinação de Proteínas Solúveis Totais no Extrato Bruto

A concentração de proteínas totais foi determinada em triplicata empregando-se a metodologia descrita por Bradford (Bradford, 1976), usando a albumina de soro bovino como reagente padrão.

### 2.4 Preparação do Biossensor ECP/MBNPs/QUIT/GA/PFO

O eletrodo de carbono grafite pirolítico (ECP) ( $A=2,0 \text{ cm}^2$ ) foi usado como eletrodo de trabalho. Antes da modificação, com intuito de obter uma superfície limpa e capaz de proporcionar uma boa adsorção dos ligantes, o ECP foi polido, primeiramente, com um papel abrasivo metalográfico mais grosso (lixa 200), e depois papel abrasivo metalográfico mais fino (lixa 1200). Logo após esses procedimentos o eletrodo foi lavado com água ultrapura do sistema MilliQ, e foi sonificado durante 5 min em álcool isopropílico, e em seguida com água ultrapura pelo mesmo intervalo de tempo. Para finalizar o processo de limpeza, o ECP foi seco à temperatura ambiente.

A eficiência da limpeza foi avaliada por voltametria cíclica, isto é, o ECP limpo foi introduzido na célula eletroquímica realizando-se sucessivas varreduras na faixa de potencial compreendida entre  $-0,1$  a  $+1,5 \text{ V}$  vs Eletrodo de Calomelano Saturado (ECS) em  $\text{H}_2\text{SO}_4$   $1 \text{ mol L}^{-1}$  a  $100 \text{ mV/s}$ . A superfície foi considerada limpa quando o voltamograma obtido não apresentou nenhum processo eletroquímico na faixa de potencial verificada.

Depois do processo de limpeza, a modificação do eletrodo ECP foi realizada através da deposição de filmes *casting* multicamadas, iniciando com a deposição de  $50 \mu\text{L}$  da solução de MBNPs na superfície limpa do eletrodo, sendo esta seca a temperatura ambiente por 2 horas.

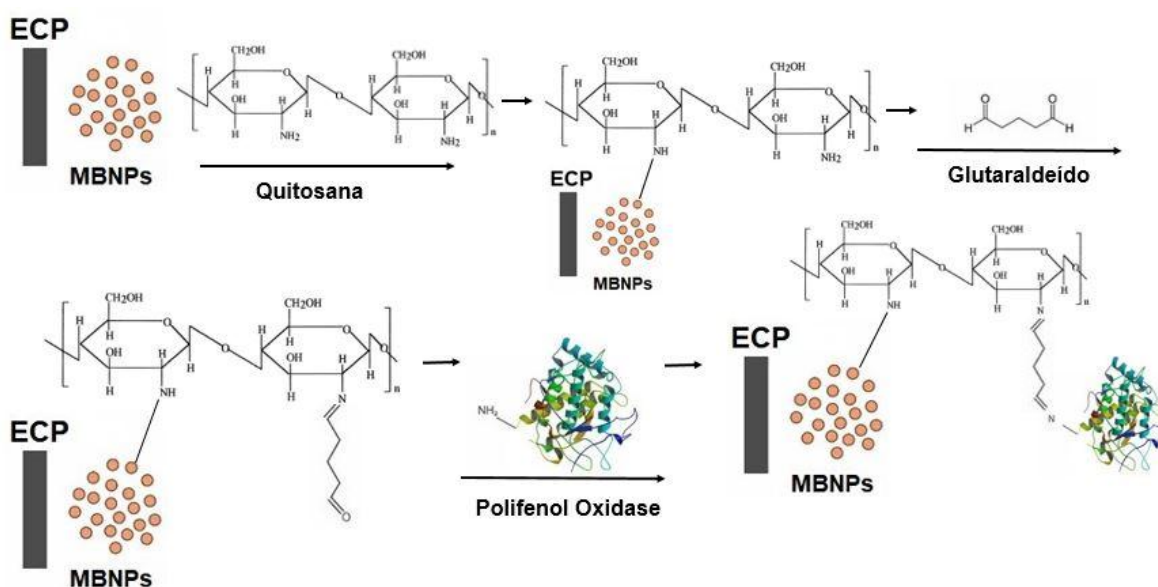
Posteriormente,  $50 \mu\text{L}$  de uma solução de QUIT  $1,0 \text{ g L}^{-1}$  foram depositadas sobre o eletrodo já modificado com as MBNPs, deixando-se secar a temperatura ambiente por 2 horas. Em seguida,  $50 \mu\text{L}$  da solução de GA 2,5% (v/v) foi pipetada sobre a superfície do eletrodo já modificado com as MBNPs e a QUIT, deixando-se secar por 2 horas a temperatura ambiente. Logo após o

processo de secagem, o eletrodo foi cuidadosamente enxaguado com solução de tampão fosfato  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  (pH 7,2) para a retirada do excesso desse agente reticulante.

E para finalizar a modificação do eletrodo,  $50 \mu\text{L}$  de PFO foram colocadas na parte superior do eletrodo já modificado com as MBNPs, QUIT e GA, e em seguida o eletrodo foi seco sob refrigeração por 6 horas. O biossensor ECP/MBNPs/QUIT/GA/PFO foi armazenado em um balão volumétrico contendo uma solução de tampão fosfato  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  em um refrigerador quando não utilizado.

Para a construção do biossensor ECP/MBNPs/QUIT/GA/PFO (Figura 1), acredita-se que no processo de deposição dos filmes casting, as MBNPs se ligam a superfície da QUIT através de interações eletrostáticas de cargas opostas entre os grupamentos hidroxilas das MBNPs e os grupamentos aminos da QUIT, uma vez que os MBNPs possuem caráter aniônico e a quitosana possui caráter catiônico. E os grupos amino da QUIT, bem como os da enzima PFO, se ligam aos grupamentos aldeídos terminais do agente reticulante GA, através de ligações covalentes cruzadas. Essas ligações covalentes cruzadas entre os grupos aminos, através de agentes reticulantes, conferem boa estabilidade a variações de pH, força iônica e temperatura (Monteiro Júnior, 1999).

**Figura 1.** Ilustração esquemática das diferentes etapas de preparação do biossensor ECP/MBNPs/QUIT/GA/PFO.



Fonte: O autor (2019)

## **2.5 Espectroscopia na Região do infravermelho com Transformada de Fourier – FTIR das Camadas do Biossensor**

Para identificar as interações entre as camadas do biossensor, foram realizadas análises de FTIR em pastilhas de KBr. Os espectros foram obtidos no equipamento Paragon 1000, Perkin-Elmer, EUA, na faixa de comprimento de onda entre 4000 e 400  $\text{cm}^{-1}$  durante 64 varreduras, com resolução de 2  $\text{cm}^{-1}$ .

## **2.6 Medidas Eletroquímicas do Sistema ECP/MBNPs/QUIT/GA/PFO**

As medidas eletroquímicas de Voltametria Cíclica (VC) e Voltametria de Onda Quadrada (VOQ) do biossensor foram realizadas empregando-se o equipamento Dropsens  $\mu$ Stat 400 BiPotentiostat/Galvanostat da METROHM, e uma célula eletroquímica com encaixe para três eletrodos. O Eletrodo de Calomelano Saturado (ECS) foi empregado como eletrodo de referência, como contra-eletrodo utilizou-se a platina ( $A = 2,0 \text{ cm}^2$ ), e como eletrodo de trabalho o carbono grafite pirolítico (ECP) modificado com o sistema ECP/MBNPs/QUIT/GA/PFO.

## **2.7 Determinação Indireta de Sulfito em Amostras de Suco Industrializado**

As amostras de suco foram utilizadas sem tratamento prévio, sendo que uma alíquota (4 mL) de cada amostra foi adicionada diretamente à célula eletroquímica contendo 16 mL solução de catecol 1,0  $\text{mmol L}^{-1}$  em tampão fosfato 0,1  $\text{mol L}^{-1}$  (pH 7,2), e em seguida os voltamogramas de onda quadrada foram obtidos em triplicata. A concentração de sulfito em cada amostra foi determinada pelo método de adição de padrão, após cada adição de sulfito na célula, a solução foi agitada durante 1 minuto, a fim de homogeneizar, e em seguida a medida de potencial foi obtida. Para cada amostra três determinações foram realizadas, e os desvios padrão foram calculados

## **2.8 Teste de Interferentes**

O estudo de potenciais interferentes como o ácido ascórbico, sorbato de potássio e sacarose na determinação do sulfito foi avaliada por voltametria de onda quadrada, em solução de catecol 1,0  $\text{mmol L}^{-1}$  em tampão fosfato 0,1  $\text{mol L}^{-1}$  (pH 7,2) contendo amostras de suco industrializado, e solução padrão de sulfito de 60  $\mu\text{mol L}^{-1}$ . A célula eletroquímica foi enriquecida utilizando 40  $\mu\text{mol}$

L<sup>-1</sup>, 60 μmol L<sup>-1</sup> e 80 μmol L<sup>-1</sup> de cada interferente separadamente, sendo os sinais de correntes comparados com aqueles obtidos na ausência de cada interferente.

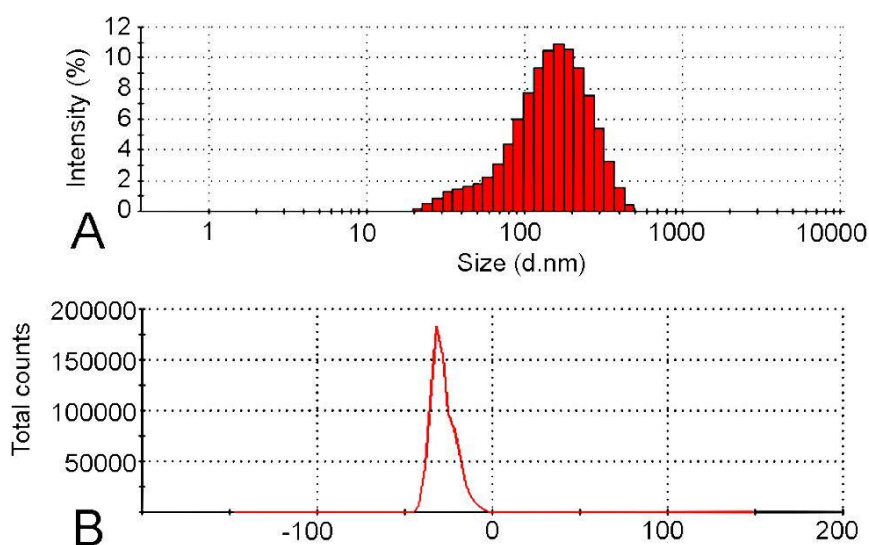
### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 Caracterização das Nanopartículas MBNPs

A distribuição de tamanho e a carga das MBNPs obtidas pelo método de diálise estão representadas na Figura 2.

Na Figura 2A, observa-se que o tamanho médio das partículas foi de 121,5 nm. Este resultado corrobora com que foi relatado por Quintanar-Guerrero e colaboradores (1998), que afirma que as nanopartículas poliméricas frequentemente possuem tamanho entre 100-500 nm.

**Figura 2.** A) Distribuição do tamanho das MBNPs sintetizadas pela técnica de diálise e B) Potencial Zeta das Nanopartículas



Fonte: O autor (2019)

O índice de polidispersão (PDI) fornece informações sobre o grau de homogeneidade de uma amostra. Quanto menor o seu valor, maior será a homogeneidade do diâmetro de partículas no sistema e vice-versa (Liu e Wu, 2010). O PDI para as MBNPs foi de 0,254, o que indica que o sistema apresenta baixa polidispersividade, ou seja, boa distribuição de tamanho de partícula.

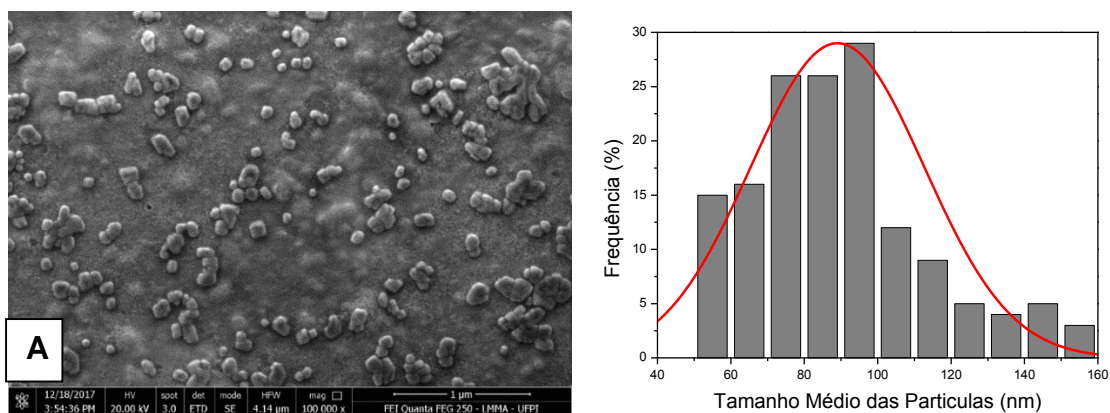


A análise de Potencial Zeta das MBNPs apresentou valor de  $-28,1$  mV (Figura 2 B). Segundo Patel e Agrawal (2011), amostras que apresentam valores de potencial zeta de  $\pm 20$ -30 mV são moderadamente estáveis, apresentando pouca tendência a floculação. O valor negativo do potencial zeta das MBNPs se deve as características aniônicas do mesocarpo de babaçu, relacionadas os grupamentos hidroxilas presentes nos álcoois (Teixeira *et al*, 2018).

A estabilidade coloidal das MBNPs foi monitorada ao longo de um período de seis meses, demonstrando que a dispersão coloidal das MBNPs permaneceu estável, sem grandes alterações no tamanho da partícula, o que pode estar associado ao valor do potencial zeta observado para esta amostra.

A morfologia das MBNPs foi avaliada por MEV (Figuras 3A). As imagens de MEV para as MBNPs mostram partículas de formato irregular, com tamanho médio de 89,3 nm. A distribuição das partículas pelo tamanho médio é apresentada na Figura 3B.

**Figura 3.** A) Imagens de MEV obtidas por 100 000 x. B) Frequência das Partículas pelo Tamanho Médio.



Fonte: O autor (2019)

Os valores médios de tamanho das MBNPs obtidos por MEV em relação a técnica de DLS foram menores, o que já era de se esperar, uma vez que as amostras para análise de DLS são solvatadas, e as amostra para análise de MEV são secas e sob condições UHV (ultra-vácuo) (Zhou e Yang, 2004). O DLS mede o raio hidrodinâmico das partículas dispersas, enquanto o MEV fornece a área de superfície projetada com base na quantidade de elétrons incidentes transmitidos através da amostra (Bhattacharjee, 2016).

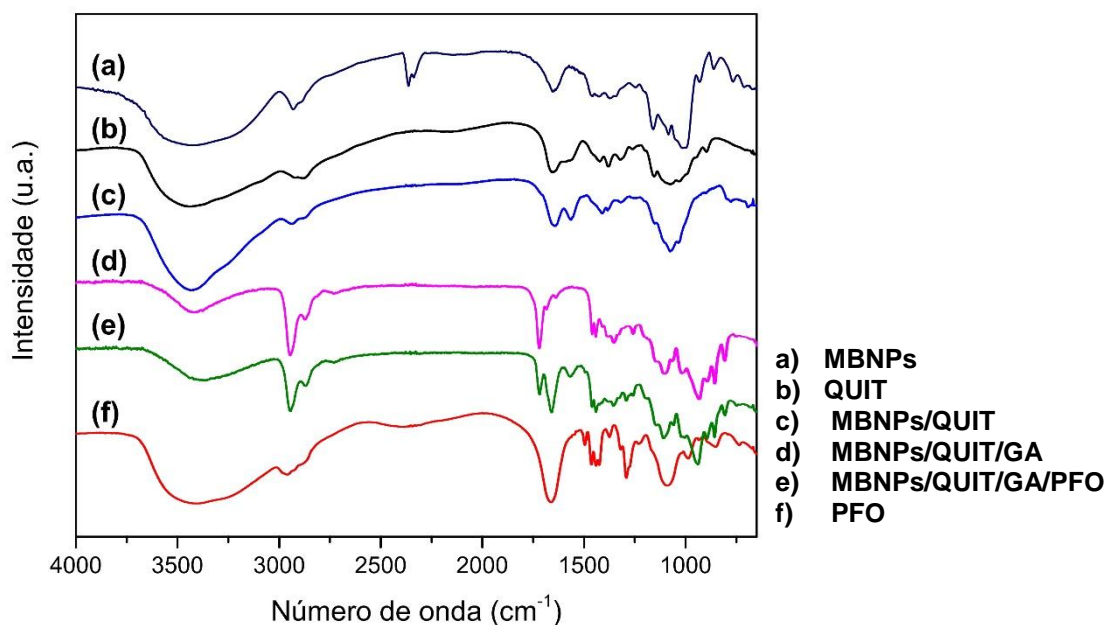
### 3.2 Determinação da Atividade Enzimática e a Concentração de Proteínas Totais da PFO

Tanto a determinação da atividade específica quanto a concentração de proteínas totais foram avaliadas por meio do extrato bruto obtido da batata doce (*Ipomoea batatas* (L.) (Lam.)). Os valores de atividade da PFO e a concentração total de proteína foram, respectivamente,  $2300 \text{ U mL}^{-1}$  e  $0,46 \text{ mg mL}^{-1}$ . Sartori e colaboradores (2011) utilizando a mesma quantidade de tecido vegetal da batata doce (*Ipomoea batatas* (L.) (Lam.)), e o agente protetor PVP encontraram valores de atividade enzimática e concentração total de proteína de  $1305 \text{ U mL}^{-1}$  e  $0,442 \text{ mg mL}^{-1}$ .

### 3.3 Espectroscopia na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier – FTIR das Camadas do Biossensor

As bandas características dos grupos que apresentam as etapas de construção do biossensor estão representadas na Figura 4.

**Figura 4.** Espectroscopia na Região do Infravermelho com Transformada de Fourier – FTIR das Camadas do Biossensor



Fonte: O autor (2019)

A banda observada em  $3425\text{ cm}^{-1}$  nas BMNPs (a), na CHIT (b) e na PPO (f) está relacionada ao estiramento (OH) presente nos álcoois (Vieira et al, 2011). Esta banda aparece sobreposta a banda de estiramento ( $-\text{NH}_2$ ) na CHIT (b) e PPO (f) (Fráguas *et al*, 2015). Percebe-se que quando as BMNPs são imobilizadas na superfície da CHIT (c), acontece um aumento na intensidade desta banda, o que sugere a interação entre os grupamentos (OH) das BMNPs com os grupos ( $-\text{NH}_2$ ) da CHIT.

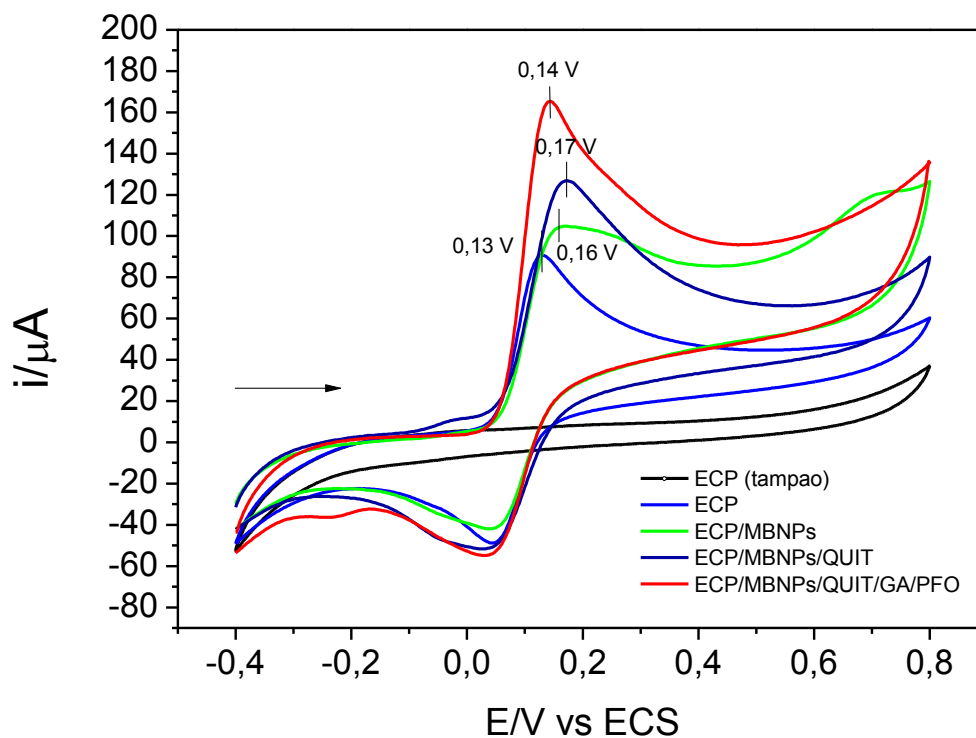
A banda em  $1729\text{ cm}^{-1}$  nas etapas (d) e (e) está relacionada aos grupos aldeídos livres ( $-\text{COH}$ ) do GA (Wang *et al*, 2004; Narang et al, 2011). Percebe-se que quando a enzima PFO é adicionada ao sistema BMNPs/CHIT/GA, ocorre uma diminuição considerável desta banda, o que sugere que houve um processo de reticulação, onde os grupamentos ( $-\text{COH}$ ) do GA se ligam aos grupamentos ( $-\text{NH}_2$ ) da CHIT quanto da PPO.

A banda observada em  $1100\text{ cm}^{-1}$  nas etapas de (b) a (f) corresponde as aminas alifáticas (Souza et al, 2010). Percebe-se que nas amostras reticuladas com GA, (d) e (e), a intensidade dessa banda é diminuída, denotando que estes grupos foram ligados aos grupos do GA, formando uma ligação imina ( $\text{N}=\text{C}$ ).

### 3.4 Comportamento Eletroquímico do Catecol no Biossensor ECP/MBNPs/QUIT/GA/PFO.

O comportamento eletroquímico do catecol foi investigado para o biossensor proposto por meio da técnica de VC. Na Figura 5 são apresentados os voltamogramas cíclicos obtidos para ECP (tampão) (—), ECP (catecol) (—), ECP/MBNPs (—), ECP/MBNPs/QUIT (—) e ECP/MBNPs/QUIT/GA/PFO (—). Para esses testes iniciais os parâmetros selecionados foram faixa de potencial no intervalo de  $-0,4$  a  $+0,8\text{ V}$ , em solução de catecol  $1,0\text{ mmol L}^{-1}$  em tampão fosfato  $0,1\text{ mol L}^{-1}$ , pH 7,2, com taxa de varredura de  $10\text{ mV s}^{-1}$ .

**Figura 5.** Voltamogramas cíclicos obtidos para o ECP (tampão) (—), ECP (catecol) (—) e os sistemas: ECP/MBNPs (—), ECP/MBNPs/QUIT, (—), ECP/MBNPs/QUIT/GA/PFO (—), em solução de catecol  $1,0\text{ mmol L}^{-1}$  em tampão fosfato  $0,1\text{ mol L}^{-1}$ , pH 7,2,  $v = 10\text{ mV s}^{-1}$ .



Fonte: O autor (2019)

Na Figura 5, observa-se que o ECP não modificado na presença do catecol (—) apresenta um processo de oxidação em 0,13 V vs ECS, e o produto de oxidação, a o-quinona, um processo de redução em 0,05 V vs ECS

Quando as MBNPs foram imobilizadas sobre o ECP (—), observou-se um alargamento do pico de oxidação do catecol, bem como um incremento nos valores de corrente. Estas mudanças no comportamento eletroquímico do catecol na superfície do sistema ECP/MBNPs confirmaram a imobilização das MBNPs.

A imobilização da camada de QUIT originando o sistema ECP/MBNPs/QUIT(—) restaurou o formato do pico dos processos redox do catecol, incrementando ainda os seus valores de corrente de 104  $\mu\text{A}$  to 127  $\mu\text{A}$ . Este comportamento provavelmente ocorre devido às cargas positivas da quitosana, as quais facilitam as reações do catecol na superfície eletródica.

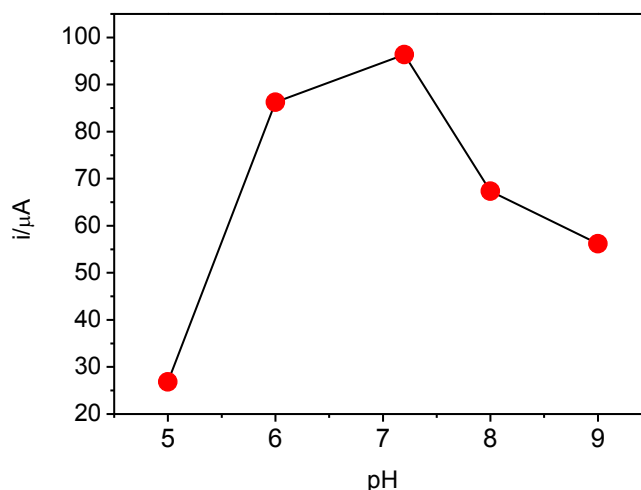
Por fim, após a imobilização da enzima PFO, formando o biosensor ECP/MBNPs/QUIT/GA/PFO, a corrente dos processos redox do catecol aumentou novamente (—), somando um percentual de 181.91 % (quase duas vezes mais) em comparação a quando utilizou-se apenas o ECP (—). O aumento de corrente após a imobilização da PFO, indica o efeito catalítico

promovido pela enzima durante as reações redox do catecol na superfície deste biossensor.

### 3.5 Efeito do pH

O pH é um parâmetro importante na determinação da atividade enzimática, influenciando diretamente na resposta analítica do biossensor. Utilizando o biossensor ECP/MBNPs/QUIT/GA/PFO, investigou-se a influência do pH eletrolítico na faixa entre pH 5,0 e 9,0 em solução de catecol  $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$  em tampão fosfato  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  usando a técnica de VC (Figura 6).

**Figura 6.** Efeito do pH sobre a resposta analítica do biossensor ECP/MBNPs/QUIT/GA/PFO em solução de catecol  $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$  em tampão fosfato  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ , a uma velocidade de varredura de  $10 \text{ mV s}^{-1}$



Fonte: O autor (2019)

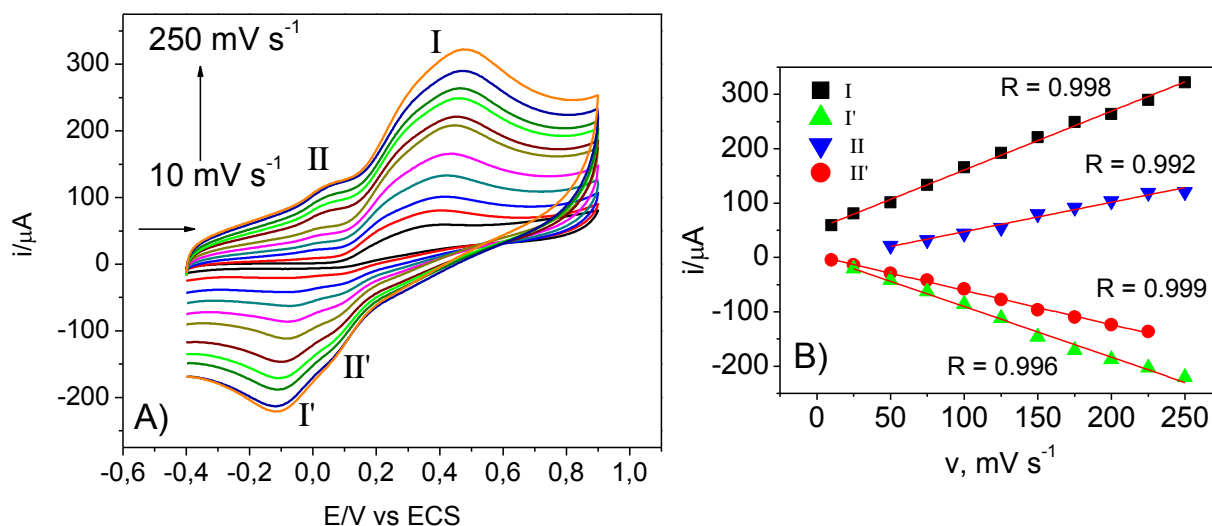
Percebe-se por meio do gráfico da corrente de pico anódico *versus* pH que a atividade da PFO é efetivamente inibida em meio ácido (Tan *et al*, 2011), onde em pH 5 o biossensor apresentou corrente de  $26,81 \text{ I}/\mu\text{A}$ . A partir do pH 6,0 nota-se um aumento na reatividade da superfície eletródica, com um aumento de corrente para  $86,25 \text{ I}/\mu\text{A}$ , que acontece devido à diminuição na concentração de íons  $\text{H}^+$  (Mayer, 2006). O pH ótimo do biossensor foi de 7,2, com corrente de  $96,37 \text{ I}/\mu\text{A}$ , portanto este pH foi selecionado para os outros testes. Em pHs alcalinos (8 e 9) verificou-se uma diminuição da atividade biossensora, com uma diminuição da corrente para  $67,34$  e  $56,16 \text{ I}/\mu\text{A}$  respectivamente. Este resultado

pode está relacionado a possível inativação da enzima em valores de pH mais altos (Kertesz e Zito, 1965).

### 3.6 Efeito da Velocidade de Varredura

O efeito da velocidade de varredura na resposta analítica do biossensor ECP/MBNP/QUIT/GA/PFO foi avaliado por meio da variação das velocidades de varreduras durante a oxidação eletrocatalítica da solução de catecol 1,0 mmol L em tampão de fosfato 0,1 mol L (pH 7,2). Os voltamogramas cíclicos foram obtidos em diferentes velocidades de varredura de 10 a 250  $\text{mV s}^{-1}$  (Figura 7 A).

**Figura 7.** (A) Variação da velocidade de varredura de 10, 25, 50, 75, 100, 125, 150, 175, 200, 225 e 250  $\text{mV s}^{-1}$ . (B) Influência da velocidade de varredura nos valores de corrente de pico para os processos de oxidação I e II e, para os processos de redução, I' e II' para o biossensor ECP/MBNPs/QUIT/GA/PFO. Todos os voltamogramas foram registrados em solução de catecol 1,0 mmol L<sup>-1</sup> em tampão fosfato 0,1 mol L<sup>-1</sup>, pH 7,2.



Fonte: O autor (2019)

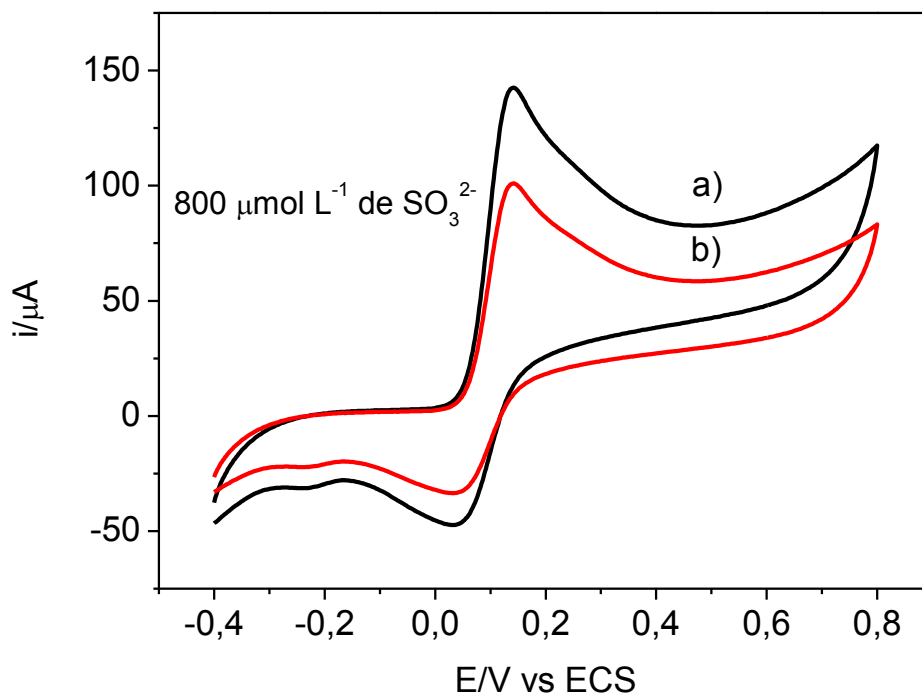
Observa-se na Figura 7A que houve um deslocamento nos potenciais dos processos de oxidação e redução com o aumento da velocidade de varredura, onde foram observados um processo oxidação na região I e redução na região I', relativos a oxidação do catecol para o-quinona e a redução deste composto a

catecol, característicos do sistema. A partir da velocidade de varredura de  $25 \text{ mV s}^{-1}$ , observa-se o surgimento de um novo processo de oxidação II e redução na região II', o que pode estar relacionado ao processo de início da degradação do catecol. Com base nos voltamogramas mostrados na Figura 7A, pode-se construir o gráfico apresentado na Figura 7B onde é observada uma dependência linear para os valores de corrente registrados tanto na varredura anódica quanto catódica, obtendo-se os índices de correlação linear (R) de  $R=0,998$  para I,  $R=0,996$  para I',  $R=0,992$  para II e  $R=0,999$  para II'. Os valores de R confirmam que o mecanismo eletroquímico que governa a resposta do biossensor ECP/MBNPs/QUIT/GA/PFO não é limitado por difusão (Xie *et al*, 2008) e indicam ainda que o biossensor ECP/MBNPs/QUIT/GA/PFO está fortemente aderido à superfície do ECP (Bard & Faulkner, 2001).

### **3.7 Desempenho Analítico do Biossensor ECP/MBNPs/QUIT/GA/PFO na Presença de Sulfito**

Para compreender o efeito da presença de sulfito no ambiente eletroanalítico, a resposta do biossensor ECP/MBNPs/QUIT/GA/PFO foi inicialmente avaliada na ausência e subsequente na presença de sulfito. Os voltamogramas cíclicos apresentados na Figura 8 mostram que após a adição de  $800 \mu\text{mol L}^{-1}$  de  $\text{SO}_3^{2-}$  os valores de corrente decaem em 70,7% para os processos anódico e catódico.

**Figura 8.** Voltamogramas cíclicos obtidos para o sistema: ECP/MBNPs/QUIT/GA/PFO (a) sem a presença de sulfito e (b) na presença de  $800 \mu\text{mol L}^{-1}$  de sulfito em solução de catecol  $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$  em tampão fosfato  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 7,, a uma velocidade de varredura de  $10 \text{ mV s}^{-1}$ .



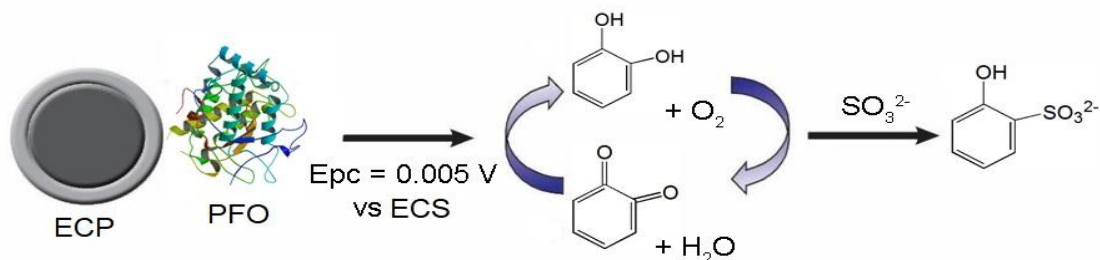
Fonte: O autor (2019)

O sulfito de sódio, bem como outros compostos que possuem átomos de enxofre, têm grande afinidade pelos átomos de cobre do centro ativo da PFO e ao se ligarem com este levam a uma forte inibição (Sartori *et al*, 2011). O sulfito pode atuar na inibição da enzima PFO na reação de redução da *o*-quinona a catecol e/ou pode reagir com o catecol formando um composto catecol-sulfito (Nematollahi *et al*, 2007).

A Figura 9 mostra uma representação esquemática da possível reação entre o sulfito e o catecol. Quando o sulfito é adicionado a solução de catecol, observa-se a formação do composto catecol-sulfito, inibindo a formação da *o*-quinona (Goto *et al*, 1999).

**Figura 9.** Representação esquemática da reação de inibição da oxidação do catecol a *o*-quinona na presença de sulfito.



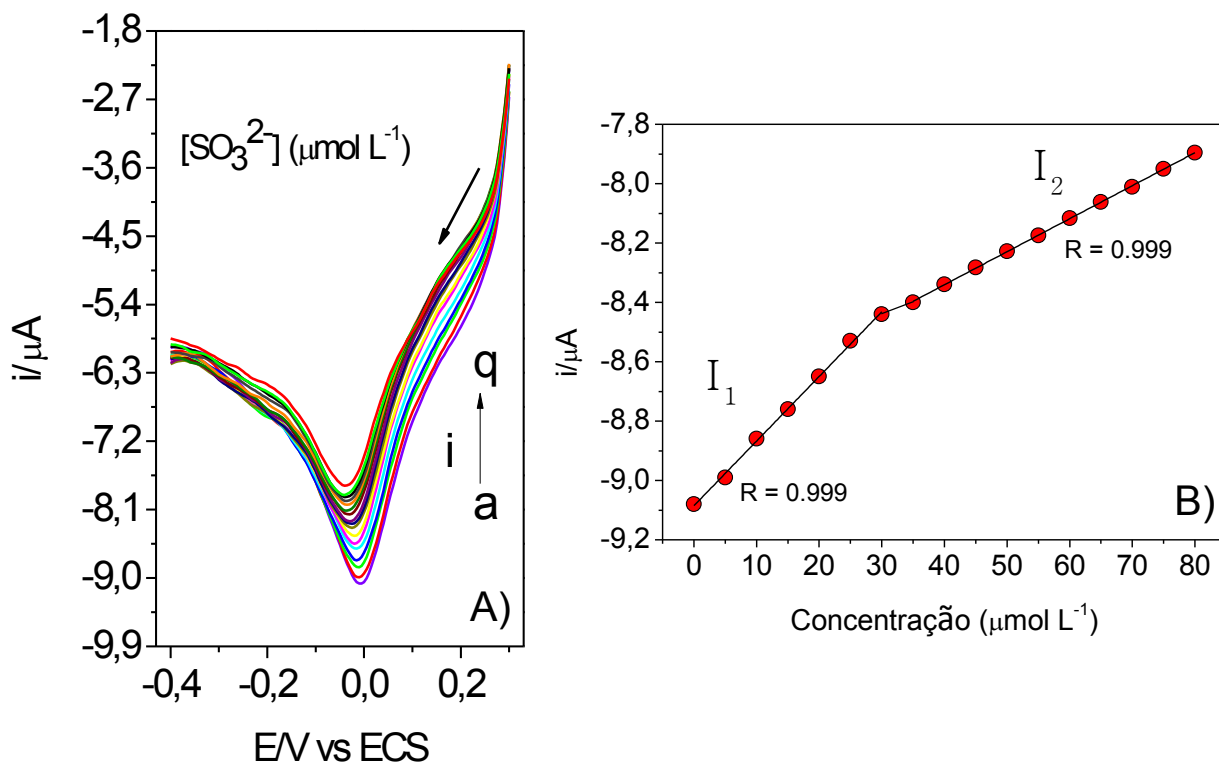


Fonte: O autor (2019)

### 3.8 Determinação Indireta de Sulfito por Voltmetria de Onda Quadrada

O desempenho analítico do biossensor foi avaliado pela variação da concentração de sulfito no eletrólito de suporte. Estes estudos foram realizados utilizando uma técnica voltamétrica mais sensível, como o caso da voltmetria de onda quadrada. Na Figura 10 A observou-se que, após a adição de alíquotas de sulfito no meio eletroanalítico ( $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$  de solução de catecol em tampão fosfato  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ ), houve diminuição da corrente de pico anódico proporcionalmente ao aumento da concentração de sulfito, demonstrando que o sulfito tem um efeito inibidor sobre esta reação, como mostrado na Figura 10.

**Figura 10.** A) Voltamogramas de onda quadrada (VOQ) obtidos utilizando o biossensor ECP/MBNPs/QUIT/GA/PFO em solução de catecol  $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$  em tampão fosfato  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ , (pH 7,2). Parâmetros: (amplitude 10 mV, frequência 20 Hz e tempo de equilíbrio de 10s). (a); 5 (b); 10 (c); 15 (d); 20 (e); 25 (f); 30 (g); 35 (h); 40 (i); 45 (j); 50 (k); 55 (l); 60 (m); 65 (n); 70 (o); 75 (p) e  $80 \mu\text{mol L}^{-1}$  de sulfito (q). B) Curva analítica para o sulfito.



Fonte: O autor (2019)

A Figura 10B representa a curva analítica obtida para a faixa de concentração de 0 a 80  $\mu\text{mol L}^{-1}$  sulfito, onde os intervalos  $I_1$  e  $I_2$  apresentam correlações de  $r = 0,999$ .

Observa-se que a inclinação obtida para o intervalo  $I_1$  foi superior quando comparada com  $I_2$ , evidenciando assim uma maior sensibilidade e desempenho analítico do biossensor ECP/MBNPs/QUIT/GA/PFO para detecção de sulfito em concentrações inferiores a 30  $\mu\text{mol L}^{-1}$  do sulfito. Mais detalhes sobre as características analíticas do biossensor ECP/MBNPs/QUIT/GA/PFO estão apresentados na Tabela 1. O limite de detecção (LD) e o limite de quantificação (LQ) foram obtidos nas Equações 01 e 02, respectivamente. (Anvisa, 2003):

$$\text{LD} = 3,3 \times \text{DP}/b \quad (\text{Eq. 01})$$

$$\text{LQ} = 10 \times \text{DP}/b \quad (\text{Eq. 02})$$

Onde:

DP - Desvio Padrão

*b* - Inclinação da curva analítica

**Tabela 1.** Características da curva de calibração do sulfito frente ao biossensor ECP/MBNPs/QUIT/GA/PFO

	<b>LD</b>	<b>LQ</b>	<b>Coefficiente angular da reta</b>	<b>Sensibilidade analítica</b>
<i>I</i> <sub>1</sub>	0,151 $\mu\text{mol L}^{-1}$	0,452 $\mu\text{mol L}^{-1}$	0,218	2,18 ( $\mu\text{A}/\mu\text{mol L}^{-1}$ )
<i>I</i> <sub>2</sub>			0,112	1,12 ( $\mu\text{A}/\mu\text{mol L}^{-1}$ )

Fonte: O autor (2019)

Com a finalidade de mostrar a eficiência do biossensor desenvolvido para detecção de sulfito, a Tabela 2 faz um comparativo dos limites de detecção relatados em diferentes trabalhos.

**Tabela 2.** Comparação dos parâmetros analíticos obtidos usando diferentes biossensores para determinação de sulfito.

<b>Técnica Eletroquímica Utilizada *</b>	<b>Eletrodo **</b>	<b>Faixa de Concentração (<math>\mu\text{Mol L}^{-1}</math>)</b>	<b>LD <math>\mu\text{Mol L}^{-1}</math></b>	<b>Referências</b>
VC	E Au/ PPY/ PBNPs/SOx <sup>I</sup>	0,5-1000	0,1	Rawal e Pundir, 2013
VPD	ECV/AuNPs-MWCNTs-PAH/PFO <sup>II</sup>	0,5-22	0,4	Sartori <i>et al</i> , 2011

VC	EPt/ PPY/SOx <sup>III</sup>	0,9-400	0,9	Ameer e Adelojou, 2008
VC	E Au/Cyt C/ SDH <sup>IV</sup>	0,5-5,5	0,0000 44	Kalimuthu <i>et al</i> , 2010
VC	EIT/Cyt C/SOx <sup>V</sup>	40-5900	40	Abass <i>et al</i> , 2000
VOQ	GPE/ IL/BF <sup>VI</sup>	0,05-250	0,02	Beitollahi <i>et al</i> , 2014
VC	E Au/GNPs@ Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> /SOx <sup>VII</sup>	0,50-1000	0,15	Rawal <i>et al</i> , 2012
VC	E Au/PANI/cMWCNT/CHIT/ AuNPs/ SOx <sup>VIII</sup>	0,75-400	0,5	Rawal <i>et al</i> , 2011
<b>VOQ</b>	<b>ECP/MBNPs/QUIT/GA/PF O<sup>IX</sup></b>	5-80	<b>0,1</b>	<b>Este trabalho</b>

(\*) VC: voltametria cíclica; VOQ: voltametria de onda quadrada; VPD: voltametria de pulso diferencial.

(\*\*) I- E Au/PPY/PBNPs/SOx: Eletrodo de ouro modificado com polipirrol, nanopartículas de azul da prússia e a enzima sulfito oxidase; II- ECV/AuNPs-MWCNT s-PAH/PFO: Eletrodo de carbono vítreo modificado com nanopartículas de ouro, nanotubos de carbono, polialilamina hidrocloreada e a enzima polifenol oxidase; III- EPt/ PPY/SOx: Eletrodo de platina modificado com polipirrol e a enzima sulfito oxidase; IV- E Au/Cyt C/SDH: Eletrodo de ouro modificado com citocromo C e a enzima sulfito desidrogenase; V- EIT/Cyt C/SOx : Eletrodo impresso em tela modificado com citocromo C e a enzima sulfito oxidase; VI- GPE/ IL/BF: Eletrodo de pasta de nano-folhas de grafeno modificado com líquido iônico e benzoilferroceno; VII- E Au/GNPs@Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/SOx: Eletrodo de ouro modificado com folhas carboxiladas, nanopartículas magnéticas e a enzima sulfito oxidase; VIII- E Au/PANI/cMWCNT/CHIT/AuNPs/SOx: Eletrodo de ouro modificado com polianilina, nanotubo de carbono revisto com múltiplas camadas, quitosana, nanopartícula de ouro e a enzima sulfito oxidase; IX- ECP/MBNPs/QUIT/GA/PFO: Eletrodo de carbono pirolítico modificado com nanopartículas do mesocarpo de babaçu, quitosana, glutaraldeído e a enzima polifenol oxidase.

Percebe-se de acordo com a Tabela 2 que o biossensor ECP/MBNPs/QUIT/GA/PFO para detecção de sulfito apresenta limite de detecção superior apenas aos biossensores EAu/Cyt C/SDH e GPE/IL/BF, que empregam ouro, grafeno, entre outros materiais de alto custo. Cabe ressaltar que o biossensores que apresentam limites de detecção inferior apresentam como elementos de modificação materiais de custo elevado, enquanto que o biossensor ECP/MBNPs/QUIT/GA/PFO apresenta como elementos de modificação do eletrodo biopolímeros naturais de baixo custo, apresentando simplicidade de preparo, e sensibilidade a baixas concentrações do aditivo estudado, sendo uma alternativa economicamente viável para determinação do sulfito.

### 3.9 Determinação Indireta de Sulfito em Amostras de Suco Industrializado.

A determinação de sulfito foi realizada em três amostras de sucos comerciais, e foi realizada (em triplicata) usando o método de adição do padrão analítico. Na Tabela 3 estão os valores de sulfito obtidos para 3 amostras de sucos comerciais, que foram expressos em  $\mu\text{M}$  e  $\text{mg L}^{-1}$ .

**Tabela 3.** Concentração de sulfito em 3 amostras de sucos industrializados usando o biossensor ECP/MBNPs/QUIT/GA/PFO

Amostras de sucos industrializados	Concentração de Sulfito ( $\mu\text{M}$ )	Concentração de sulfito ( $\text{mg/L}$ )
A	$8,031 \pm 0,02$	$0,643 \pm 0,02$
B	$9,102 \pm 0,01$	$0,729 \pm 0,01$
C	$3,391 \pm 0,01$	$0,271 \pm 0,01$

Fonte: O autor (2019)

Todas as amostras de suco avaliadas (Tabela 3) possuíam concentração de sulfito abaixo de  $10,0 \mu\text{M}$ , estando dentro do limite estabelecido pelas legislações nacionais e internacionais.

O Brasil, assim como outros países, segue as recomendações do *Joint Expert Committee on Food Additives* (JECFA) na utilização segura dos aditivos em alimentos e bebidas, onde a legislação permite que sejam utilizados como limite máximo até  $0,02 \text{ g/100mL}$  em sucos de fruta (Brasil, 1997; ABIA, 2001;

Machado et al, 2006). A Ingestão Diária Aceitável (IDA) para o uso dos agentes sulfitantes em alimentos é de 0,7 mg/kg peso corpóreo/dia, expressa como SO<sub>2</sub>, (FAO/WHO, 2007). Assim como A *Food and Drug Administration*- USA, a União Europeia através do Regulamento (CE) nº 1169/2011 (Comissão Europeia, 2011) estabeleceu que o dióxido de enxofre e sulfitos em alimentos e bebidas em concentrações superiores a 10 mg kg<sup>-1</sup> ou 10 mg L<sup>-1</sup> são sujeitos a rotulagem obrigatória.

A recuperação de diferentes concentrações de sulfito após o enriquecimento de amostras de sucos comerciais também foi testada (Tabela 04). Obteve-se uma boa porcentagem de recuperação e, nos casos em que a porcentagem recuperada foi superior a 100%, deve-se, provavelmente, à presença prévia de sulfito nas amostras.

**Tabela 4.** Recuperação de sulfito em amostras comerciais de suco previamente enriquecidas

Adicionado (µM)	Recuperação (µM)	Recuperação (%)
5,0	5,47	109,40 %
10,0	10,12	101,20 %
20,0	19,22	96,10 %
40,0	37,88	94,70 %

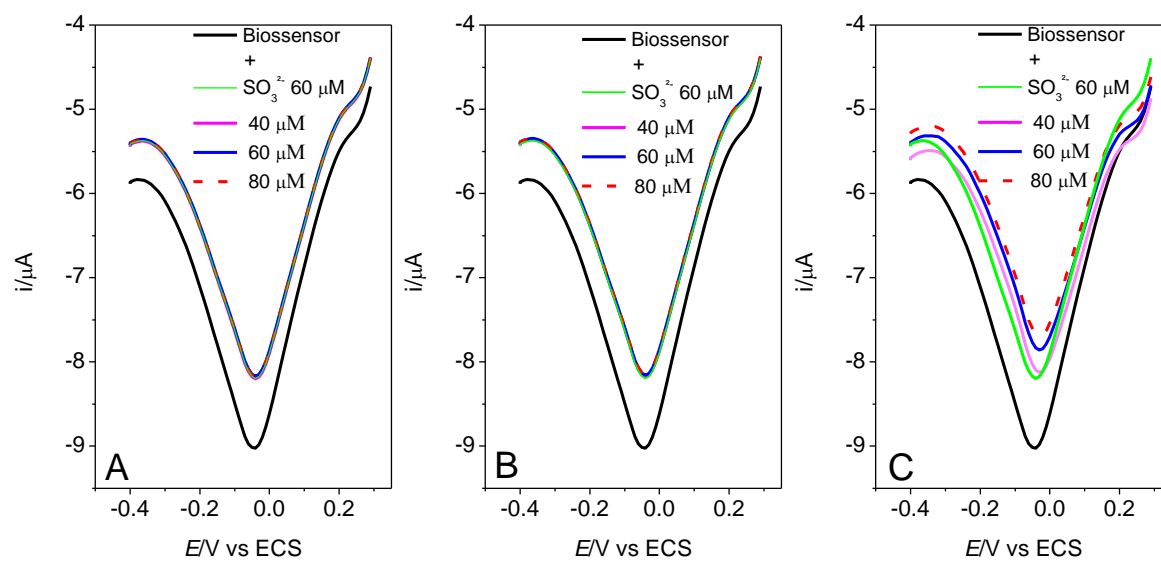
Fonte: O autor (2019)

O estudo de adição e recuperação de sulfito nas amostras de suco demonstra que não houve interferência significativa da matriz das amostras na determinação de sulfito pelo procedimento analítico proposto, demonstrando que o biossensor ECP/MBNPs/QUIT/GA/PFO é apropriado para determinação de sulfito em amostras de sucos industrializados.

### 3.10 Teste de Interferentes

Entre as interferências que podem ser encontradas durante a análise de sucos industrializados, destacam-se o sorbato de potássio, a sacarose e o ácido ascórbico. A resposta do biossensor ECP/MBNPs/QUIT/GA/PFO foi investigada em relação à presença desses interferentes, como mostra a Figura 11.

**Figura 11.** Voltamogramas de onda quadrada obtidos na presença de diferentes concentrações de A) sorbato de potássio, B) sacarose e C) ácido ascórbico. Todos os voltamogramas foram obtidos utilizando o biossensor ECP/MBNPs/QUIT/GA/PFO em solução de catecol 1,0 mM solubilizada em tampão fosfato 0,1 M, pH 7,2. Parâmetros: ( amplitude 10 mV, frequência 20 Hz e tempo de equilíbrio de 10s).



Fonte: O autor (2019)

O sorbato de potássio (Figura 11A) e a sacarose (Figura 11B) não apresentaram potencial para interferir na análise eletroquímica do sulfito. Através dos resultados percebe-se uma variação mínima na resposta do sinal analítico, indicando assim ausência de interferência significativa na determinação de sulfito pelo biossensor proposto nas concentrações avaliadas.

Por outro lado, após uma adição sucessiva de ácido ascórbico (Figura 11C), um decréscimo da corrente proporcional à concentração de ácido ascórbico adicionado. Isso ocorre porque o ácido ascórbico é também um agente redutor e compete com o sulfito na reação enzimática entre a enzima e o catecol (Sartori *et al*, 2011). Como todas as amostras de suco industrializados testadas apresentam ácido áscorbico, sugere-se remover este interferente passando-se a amostra através de uma coluna empacotadora com pepino, como relatado por FatibelloFilho e Vieira (1997). O ácido áscorbico é oxidado a ácido dehidroascórbico pela enzima ascorbato oxidase, presente em grande quantidade no pepino.

#### 4. CONCLUSÃO

As nanopartículas do Mesocarpo de Babaçu (MBNPs), sintetizadas pelo método de diálise, apresentaram um formato irregular, tamanho médio em torno de 121,5 nm, PDI 0,254 e potencial zeta -28,1mV. As MBNPs foram empregadas na construção do biossensor ECP/MBNPs/QUIT/GA/PFO a partir com a adsorção do filme multicamadas sobre o eletrodo de carbono grafite pirolítico. A caracterização eletroquímica do biossensor nos leva a considerá-lo eficiente para detecção do sulfito em sucos industrializados, sendo obtido um limite de detecção de 0,151  $\mu\text{mol L}^{-1}$  e um limite de quantificação de 0,452  $\mu\text{mol L}^{-1}$ . Posteriormente, testes em amostras de sucos comerciais apresentaram concentração de sulfito abaixo de 10,0 $\mu\text{M}$ , estando dentro que do que preconiza a legislação Internacional sobre a orientação da *Joint Expert Committee on Food Additives* que estabelece o limite máximo de 0,002 g/100 mL

#### REFERENCIAS

Abass, A.K.; Hart, J.P.; Cowell, D. Development of an amperometric sulfite biosensor based on sulfite oxidase with cytochrome c, as electron acceptor, and a screen-printed transducer. **Sensors and Actuators B**, v. 62, p.148–153, 2000  
ABIA – Associação Brasileira das Indústrias da Alimentação. **Compêndio da Legislação Brasileira de Alimentos**, seção 3.31, 2001.

Almeida, R. R.; Lacerda, L. G.; Murakami, F. S. C.; Bannach, G.; Demiate, I.M.; Soccol, C. R.; Carvalho Filho, M.A.S.; Schnitzler, E. Thermal analysis as a screening technique for the characterization of babassu flour and its solid fractions after acid and enzymatic hydrolysis: **Thermochimica Acta**, v. 519, p. 50-54, 2011.

Amatatongchai, M.; Sroysee, W.; Chairam, S.; Nacapricha, D. Simple flow injection for determination of sulfite by amperometric detection using glassy carbon electrode modified with carbon nanotubes–PDDA–gold nanoparticles. **Talanta**, v. 133, p.134-141, 2015.

Ameer, Q.; Adeloju, S.B. Galvanostatic entrapment of sulfite oxidase into ultrathin polypyrrole films for improved amperometric biosensing of sulfite. **Electroanalysis**, v.20, p. 2549-2556, 2008.

Anvisa. **Resolução RDC nº 899, de 29 de maio de 2003**. Ministério da Saúde - MS. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – Anvisa.



Aulton, M. E. **Delineamento de formas farmacêuticas**. Porto Alegre: Artmed, 2005.

Bahmani, B.; Moztarzadeh, F.; Rabiou, M.; Tahriri, M. Development of an electrochemical sulfite biosensor by immobilization of sulfite oxidase on conducting polyaniline film. **Synthetic Metals**, v. 160, p.2653-2657, 2010.

Bard, A. J.; Faulkner, L. R. **Electrochemical methods fundamentals and applications**. New York: John Wiley & Sons, 2001.

Beitollahi, H.; Tajik, S.; Biparva, P. Electrochemical determination of sulfite and phenol using a carbon paste electrode modified with ionic liquids and graphene nanosheets: Application to determination of sulfite and phenol in real samples. **Measurement**, v.56, p. 170–177, 2014.

Bhattacharjee, S. DLS and zeta potential – What they are and what they are not? **Journal of Controlled Release**, v.235, p.337-351, 2016.

Bradford, M.M. Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. **Analytical Biochemistry**, v.72, p.248-254, 1976.

Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Portaria nº 540 – SVS/MS de 27 de outubro de 1997. Aprova o Regulamento Técnico: Aditivos Alimentares - definições, classificação e emprego** [acesso em 3 maio 2019]. Disponível em: [http://www.anvisa.gov.br/legis/portarias/540\\_97.htm](http://www.anvisa.gov.br/legis/portarias/540_97.htm)

Carvalho, L.M.; Schwedt, G. Sulfur speciation by capillary zone electrophoresis Determination of dithionite and its decomposition products sulfite, sulfate and thiosulfate in commercial bleaching agents. **Journal of Chromatography A**, v.1099, p. 185–190, 2005.

Chen, P.Y.; Chi, Y. M.; Yang, H. H.; Shih, Y. Oil Spills Detection and Monitoring Using Airborne Thermal Infrared Remote Sensing in Dalian Xingang Oil Pipeline Explosion. **Journal Electroanalytical Chemistry**, v.675, p.1-4, 2012.

Daunoravicius, Z.; Padarauskas, A. Capillary electrophoretic determination of thiosulfate, sulfide and sulfite using in-capillary derivatization with iodine. **Electrophoresis**, v. 23, p. 2439–2444, 2002.

Dinckaya, E.; Sezginiturk, M.K.; Akyilmaz, E.; Ertas, F.N. Sulfite determination using sulfite oxidase biosensor based glassy carbon electrode coated with thin mercury film. **Food Chemistry**. v. 101, p.1540–1544, 2007.

Emerton, V.; Choi, E. **Food additives and why they are used**. In Essential Guide to Food Additives, (3rd edn), Surrey: Leatherhead Publishing, Canada, 2008 p. 1-21.

European Commission, 2011. Council Regulation of 25 October 2011 on the provision of food information to consumers, amending Regulations (EC) No 1924/2006 and (EC) No 1925/2006 of the European Parliament and of the

Council, and repealing Commission Directive 87/250/EEC, Council Directive 90/496/EEC, Commission Directive 1999/10/EC, Directive 2000/13/EC of the European Parliament and of the Council, Commission Directives 2002/67/EC and 2008/5/EC and Commission Regulation (EC) N. 608/2004, 1169/2011/EC. In: Official Journal, L 304/18, 22.11.2011.

Falguera, V.; Sánchez-Riaño, A.; Quintero-Cerón, J.; Rivera-Barrero, C.; Méndez-Arteaga, J.; Ibarz, A. Characterization of polyphenol oxidase activity in juices from 12 underutilized tropical fruits with high agroindustrial potential. **Food and Bioprocess Technology**, v. 5, p. 2921–2927, 2012.

FAO/WHO. **Summary of evaluations performed by the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. Sulfur dioxide.** Food and Agriculture Organization/World Health Organization, Rome, Italy and Geneva, Switzerland, 2007.

Fatibelo Filho, O.; Vieira, I.C. Flow injection spectrophotometric determination of sulfite using a crude extract of sweet potato root (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.) as a source of polyphenol oxidase. **Analytica Chimica Acta**, v.354, p.51-57,1997.

Filik, H.; Çetintaş, G. Determination of sulfite in water and dried fruit samples by dispersive liquid-liquid microextraction combined with UV-Vis fiber optic linear array spectrophotometry. **Food Analytical Methods**, v. 5, p.1362-1367, 2012.

Fiorentino, D.; Gallone, A.; Fiocco, D.; Palazzo, G.; Mallardi, A. Mushroom tyrosinase in polyelectrolyte multilayers as an optical biosensor foro-diphenols, **Biosensors and Bioelectronics**, v.25, p.2033–2037, 2010.

Fráguas, R.M.; Simão, A.A.; Faria, P.V.; Queiroz, E.R.; Oliveira Junior, E.N.; Abreu, C.M.P. Preparation and characterization chitosan edible films. **Polímeros**, v.25, p.48-53, 2015.

Goto, Y.; Matsui, T.; Ozaki, S-I.; Watanabe, Y.; Fukuzumi, S. Mechanisms of Sulfoxidation Catalyzed by High-Valent Intermediates of Heme Enzymes: Electron-Transfer vs Oxygen-Transfer Mechanism. **Journal of the American Chemical Society**, v. 121, p. 9497-9502,1999.

Guo, S.; Wang, E. Synthesis and electrochemical applications of gold nanoparticles. **Analytical Chimica Acta**, v.598, p.181-192, 2007.

Harper, H. P. **Manual de química fisiológica**, 3 ed. São Paulo, Atheneu Editora, 1973.

Iammarino, M.; Di Taranto, M.; Muscarella, M. Investigations on the presence of sulfites in fresh meat preparations: estimation of an allowable maximum limit. **Meat Science**, v.90, p. 304-308, 2012.

Iwasawa, S.; Kikuchi, Y.; Nishiwaki, Y.; Nakano, M.; Michikawa, T.; Tsuboi, T.; Tanaka, S.; Uemura, T.; Ishigami, A.; Nakashima, H. Effects of SO<sub>2</sub> on respiratory system of adult Miyakejima resident 2 years after returning to the island. **Journal Occupational Health**, v. 51, p. 38-47, 2009.

Janegitz, B.C.; Medeiros, R.A.; Rocha-Filho, R.C.; Fatibello-Filho, O. Direct electrochemistry of tyrosinase and biosensing for phenol based on gold nanoparticles electrodeposited on a boron-doped diamond electrode. **Diamond and Related Materials**, v. 25, p. 128-133, 2012.

Kalimuthu, P.; Tkac, J.; Kappler, U.; Davis, J.J.; Bernhardt, P.V. Highly Sensitive and Stable Electrochemical Sulfite Biosensor Incorporating a Bacterial Sulfite Dehydrogenase. **Analytical Chemistry**, v. 82, p. 7374–7379, 2010.

Katz, E.; Willner, I. Integrated nanoparticle-biomolecule hybrid systems: synthesis, properties, and applications. **Angewandte Chemie International Edition**, v.19, n. 43, n. 45, p.6042-108, 2004.

Kertesz, D & Zito, R. Mushroom polyphenol oxidase purification and general properties. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.96, p.447-462, 1965.

Kim, J.; Grate, J. W.; Wang, P. Nanostructures for enzyme stabilization. **Chemical Engineering Science**, v. 61, p. 1017–1026, 2006.

Koch, M.; Köppen, R.; Siegel, D.; Witt, A.; Nehls, I. Determination of total sulfite in wine by ion chromatography after in-sample oxidation. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, p. 9463–9467, 2010.

Liu, C.H.; Wu, C.T. Optimization of nanostructured lipid carriers for lutein delivery. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 353, n. 2, p.149-156, 2010.

López-Gallego, F.; Betancor, L.; Mateo, C.; Hidalgo, A.; Alonso-Morales, N.; Dellamora-Ortiz, G.; Guisán, J. M.; Fernández-Lafuente, R. Enzyme stabilization by glutaraldehyde crosslinking of adsorbed proteins on aminated supports. **Journal Biotechnology**, v. 119, 70-75, 2005.

Lowinson, D.; Bertotti, M. Determination of sulphite in wine by coulometric titration. **Food Additives & Contaminants**, v.18, n. 9, p. 773-7777, 2001.

Lupetti, K. O.; Ramos, L. A.; Fatibello, O. F. Enzymatic determination of dopamine in pharmaceutical formulations using a flow injection analysis system with avocado (*Persea americana*) crude extract. **Química Nova**, v. 26, nº 2, p.197-201, 2003.

Machado, R.M.D.; Toledo, M.C.F. Sulfitos em Alimentos. **Brazilian Journal Food Technology**, v. 9, p. 265-275, 2006.

Mattison, C.P.; Desormeaux, W.A.; Wasserman, R.L.; Yoshioka-Tarver, M.; Condon, B.; Grimm, C.C. Decreased immunoglobulin E (IgE) binding to cashew allergens following sodium sulfite treatment and heating. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.62, p. 6746-6755, 2014.

Mayer, A.M. Polyphenol oxidases in plants and fungi: Going places? A review. **Phytochemistry**, v.67, p. 2318–2331, 2006.

Molinero-Abad, B.; Alonso-Lomillo, M.A.; Domínguez-Renedo, O.; Arcos-Martínez, M.J. Sulfite oxidase biosensors based on tetrathiafulvalene modified screen-printed carbon electrodes for sulfite determination in wine, **Analytica Chimica Acta**, v.812, p.41-44, 2014.

Monteiro Júnior, A.O.C.; Airoidi, C. Some Studies of Crosslinking Chitosan-Glutaraldehyde interaction in a homogenous system. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.26, p.119-128, 1999.

Namatollahi, D.; Tammari, E.; Karbasi, H. Electrooxidation of catechols in the presence of sulfite: presentation of a facile and green method for aromatic sulfonation. **International Journal Electrochemical Science**, v.2, p.986-995, 2007.

Narang, J.; Chauchan, N.; Singh, A.; Pundir, C. S. A nylon membrane based amperometric biosensor for polyphenol determination. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v.72, p.276-281, 2011.

Patel, V.R.; Agrawal, Y.K Nanosuspension: an approach to enhance solubility of Quintanar-Guerrero, D.; Allemann, E.; Fessl, H.; Doelker, E. Preparation techniques and mechanisms of formation of biodegradable nanoparticles from preformed polymers. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 24, p. 1113-28, 1998.

Rao, J.P., Geckeler, K.E. Polymer nanoparticles: Preparation techniques and size-control Parameters. **Progress in Polymer Science**, v. 36, n. 7, p. 887–913, 2011.

Rawal, R.; Chawla, S.; Dahiya, T.; Pundir, C.S. Development of an amperometric sulfite biosensor based on a gold nanoparticles/chitosan/multiwalled carbon nanotubes/polyaniline-modified gold electrode. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v.401, n<sup>o</sup> 8, p.2599-2608, 2011.

Rawal, R.; Chawla, S.; Pundir, C.S. An electrochemical sulfite biosensor based on gold coated magnetic nanoparticles modified gold electrode. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 31, p.144– 150, 2012.

Rawal, R.; Pundir, C.S. Development of electrochemical sulfite biosensor based on SOx/PBNPs/PPY modified Au electrode. **Biochemical Engineering Journal**, v.71, p.30– 37, 2013.

Saltmarsh, M. **Essential guide to food additives** (4<sup>th</sup> ed.), RSC Publishing, Cambridge, UK, 2013.

Sartori, E.R.; Vicentini, F.C.; Fatibello-Filho, O. Indirect determination of sulfite using a polyphenol oxidase biosensor based on a glassy carbon electrode modified with multi-walled carbon nanotubes and gold nanoparticles within a poly(allylamine hydrochloride) film. **Talanta**, v. 15, n<sup>o</sup> 87, p.235-242, 2011.

Satienperakul, S., Phongdong, P.; Liawruangrath, S. Pervaporation flow injection analysis for the determination of sulphite in food samples utilizing potassium permanganate-rhodamine B chemiluminescence detection. **Food Chemistry**, v. 212, p. 893–898, 2010.

Scampicchio, M.; Lawrence, N.S.; Arecchi, A.; Mannino, S. Determination of Sulfite in Wine by Linear Sweep Voltammetry. **Electroanalysis**, v. 20, n. 4, p.444-447, 2008.

Souza, K. V.; Zamora, P.G.P.; Zawadzki, S.F. Chitosan/Fe Spheres on the Blue QR-19 Dye Degradation by Photo Fenton Processes Using Artificial or Solar Light. **Polímeros**, v.20. p. 210-214, 2010.

Stohs, S.J.; Miller, M. J. S. A case study involving allergic reactions to sulfur-containing compounds including, sulfite, taurine, acesulfame potassium and sulfonamides. **Food Chemical Toxicology**, v. 63, p.240–243, 2014.

Suh, H.; Cho, Y.; Chung, M.; Kim, B. Preliminary data on sulphite intake from the Korean diet. **Journal of Food Composition and Analysis**, v.20, p. 212-219, 2007.

Tan, Y.Y.; Kan, J.Q.; Li, S.Q. Amperometric biosensor for catechol using electrochemical template process. **Sensors and Actuator B: Chemical**, v.152, p.285,291,2011.

Teixeira, P.R.S.; Teixeira, A.S.N.M.; Farias, E.A.O.; Silva, D.A.; Nunes, L.C.C.; Leite, C.M.S.; da Silva Filho, E.C.; Eiras, C. Chemically modified babassu coconut (*Orbignya sp.*) biopolymer: characterization and development of a thin film for its application in electrochemical sensors. **Journal of Polymer Research**, v.25, p.127-138, 2018.

Vally, H.; Misso, N. L. A.; Madan, V. Clinical effects of sulphite additive. **Clinical & Experimental Allergy**, v.39, p. 1643-1651, 2009.

Vieira, A.P.; Santana, S.A.A.; Bezerra, C.W.B.; Silva, H.A.S.; Chaves, J.A.P.; Melo, J.C.P.; da Silva Filho, E.C.; Airoidi, C. Kinetics and thermodynamics of textile dye adsorption from aqueous solutions using babassu coconut mesocarp. **Journal of Hazardous Materials**, v.166, p.1272-1278,2009.

Vieira, A.P.; Santana, S.A.A.; Bezerra, C.W.B.; Silva, H.A.S.; Chaves, J.A.P.; Melo, J.C.P.; da Silva Filho, E.C.; Airoidi, C. Epicarp and mesocarp of babassu (*Orbignya speciosa*): characterization and application in copper phtalocyanine dye removal. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v.22, nº 1, p.21-29, 2011.

Wang, C.; Feng, S.; Wu, L.; Yan, S.; Zhong, C.; Guo, P.; Huang, R.; Weng, X.; Zhou, X. A new fluorescent turn-on probe for highly sensitive and selective detection of sulfite and bisulfite. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v.190, p.792–799, 2014.

Wang, T.; Turhan, M.; Gunasekaran, S. Selected properties of pH-sensitive, biodegradable chitosan–poly(vinyl alcohol) hydrogel. **Polymer International**, v.57, p.911-918, 2004.

Xie, X.; Gan, T.; Sun, D.; Wu, K. Application of multi-walled carbon nanotubes/nafion composite film in electrochemical determination of  $Pb^{2+}$ , fuller. **Nanotubes and Carbon Nanostructures**, v. 16, p. 103-113, 2008.

Yang, X. F.; Guo, X. Q.; Zhao, Y. B. Novel spectrofluorimetric method for the determination of sulfite with rhodamine B hydrazide in a micellar medium, **Analytica Chimica Acta**, v.456, p.121–128, 2002.

Zhang, X.; Guo, Q.; Cui, D.; Recent Advances in Nanotechnology Applied to Biosensors. **Sensors**, v.9, p.1033–1053, 2009.

Zhou, G.; Yang, J. C. In situ UHV-TEM investigation of the kinetics of initial stages of oxidation on the roughened Cu (110) surface. **Surface Science**, v. 559, p. 100-110, 2004.

# ANEXOS



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ**  
**NÚCLEO DE INOVAÇÃO E TRANSFERÊNCIA DE TECNOLOGIA**  
*Campus Universitário Ministro Petrônio Portela, Setor de Convivência L09 e L10*  
*Bairro Ininga CEP: 64049-550-Teresina-PI Fone/Fax (86)3237-1638*

DECLARAÇÃO

Declaro para os devidos fins que a Universidade Federal do Piauí, através do Núcleo de Inovação e Transferência de Tecnologia da UFPI – NINTEC –, efetuou às 17:31 horas do dia 28/02/2019, sob o número de Protocolo do INPI: **870190020976** o depósito de Pedido de Patente de Invenção intitulado "**PROCESSOS DE OBTENÇÃO DE NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS PARA IMOBILIZAÇÃO DE MOLÉCULAS E BIOMOLÉCULAS, E PRODUTOS OBTIDOS**", com o número **BR 10 2019 004253-2**, desenvolvida pelos inventores:

CARLA EIRAS  
ANA SIQUEIRA DO NASCIMENTO MARREIRO TEIXEIRA  
PAULO RONALDO SOUSA TEIXEIRA  
EMANUEL AIRTON DE OLIVEIRA FARIAS  
DURCILENE ALVES DA SILVA  
LÍVIO CÉSAR CUNHA NUNES

Teresina, 04 de abril de 2019.

Profa. Dra. Maria Rita de Moraes Chaves Santos

*Coordenadora do Núcleo de Inovação e Transferência de Tecnologia*





**USO DE NANOPARTÍCULAS DO MESOCARPO DO BABAÇU (*ORBIGNYA PHALERATA* MART) COMO PLATAFORMA PARA ANCORAGEM DE ENZIMAS NO DESENVOLVIMENTO DE BIOCENSORES: UM MAPEAMENTO TECNOLÓGICO**

**NANOPARTICLES F USE MESOCARP BABASSU (*ORBIGNYA PHALERATA* MART) AS PLATFORM FOR ENZYMES IN ANCHORAGE BIOSENSORS DEVELOPMENT: A MAPPING TECHNOLOGY**

Ana Siqueira do Nascimento Marreiro Teixeira<sup>1</sup>; Paulo Ronaldo Sousa Teixeira<sup>2</sup>; Carla Eiras<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Instituto Federal do Piauí – IFPI – Campus Angical, Angical – PI-, Brasil.

[anamarreiro@ifpi.edu.br](mailto:anamarreiro@ifpi.edu.br)

<sup>2</sup>Instituto Federal do Piauí – IFPI – Campus Teresina Zona Sul, Teresina – PI, Brasil.

[paulo\\_ronaldo@ifpi.edu.br](mailto:paulo_ronaldo@ifpi.edu.br)

<sup>3</sup>Universidade Federal do Piauí- UFPI- Campus Ministro Petrônio Portela, Teresina-PI, Brasil

[carla.eiras.ufpi@gmail.com](mailto:carla.eiras.ufpi@gmail.com)

**Resumo**

*A imobilização de enzimas na construção de biossensores torna-se atraente pela capacidade enzimática de catalisar com grande eficiência, reações biológicas com alta sensibilidade e seletividade. A utilização de materiais nanoestruturados, tais como nanopartículas poliméricas, surge como alternativa para aumentar a eficiência da imobilização de enzimas. Dessa forma, surge o interesse na síntese de nanopartículas do mesocarpo do babaçu (*Orbignya phalerata* Mart), por se tratar de um biopolímero natural, atóxico, facilmente encontrado na região nordeste do País. Diante do relatado, o presente trabalho propõe um estudo prospectivo a respeito do desenvolvimento de um biossensor contendo a enzima polifenol oxidase como monocamada imobilizada, pela técnica de automontagem, sobre a superfície de nanopartículas poliméricas geradas a partir do mesocarpo de babaçu para detecção de sulfitos em produtos alimentícios, visto que tais compostos são causadores de reações alérgicas em indivíduos que apresentam sensibilidade a este conservante. Para o mapeamento científico e tecnológico, foram realizadas buscas nas bases de periódicos Web of Science, Scopus e Scielo, e nos bancos de patentes INPI, Espacenet e USPTO, para todas patentes depositadas, e artigos publicados no período de 2005 a agosto 2016. A partir dos artigos e patentes analisados, constatou-se que os estudos relacionados ao mesocarpo de babaçu são escassos, sendo que o desenvolvimento de um biossensor para detecção de sulfito a base de nanopartículas poliméricas deste biopolímero como plataforma para*