

UFRRJ
INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

TESE

**DESENVOLVIMENTO DE BIOSSENSOR
ELETROQUÍMICO EMPREGANDO PEROXIDASE DE
EXTRATO DE MAXIXE (*Cucumis anguria* L.) PARA
DETERMINAÇÃO DE DOPAMINA**

Daniel Ananias Reis de Campos

2024



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

DESENVOLVIMENTO DE BIOSSENSOR
ELETROQUÍMICO COM PEROXIDASE DE EXTRATO DE
MAXIXE (*Cucumis anguria* L.) PARA DETERMINAÇÃO DE
DOPAMINA

DANIEL ANANIAS REIS DE CAMPOS

Sob Orientação do Professor
Dr. João Victor Nicolini

e Coorientação da Professora
Dra. Inês Rosane Welter Zwirtes de Oliveira

Tese submetida como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Química, no Programa de Pós-Graduação em Química, Área de Concentração em Química.

Seropédica, RJ
Março de 2024

Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
Biblioteca Central / Seção de Processamento Técnico

Ficha catalográfica elaborada
com os dados fornecidos pelo(a)
autor(a)

C186d Campos, Daniel Ananias Reis de, 1991-
Desenvolvimento de biossensor eletroquímico com
peroxidase de extrato de maxixe (cucumis anguria l.)
Para determinação de dopamina / Daniel Ananias Reis de
Campos. - Seropédica, 2024.
147 f.: il.

Orientador: João Victor Nicolini.
Coorientadora: Inês Rosane Welter Zvirtes de
Oliveira.
Tese(Doutorado). -- Universidade Federal Rural do
Rio de Janeiro, Programa de Pós-Grasuação em Química,
2024.

1. Biossensores Eletroquímicos Enzimáticos. I.
Nicolini, João Victor, 1986-, orient. II. Oliveira,
Inês Rosane Welter Zvirtes de , 1974-, coorient. III
Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.
Programa de Pós-Grasuação em Química. IV. Título.

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

DANIEL ANANIAS REIS DE CAMPOS

Tese submetida como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor em Química,
no Programa de Pós-Graduação em Química, Área de concentração Química.

TESE APROVADA EM 05/03/2024

João Victor Nicolini Dr. UFRRJ
(Orientador)

Idio Alves de Sousa Filho Dr. UFRRJ

Eliane Pereira Cicolatti Dr^a. UFRRJ

Andréa Medeiros Salgado Dr^a. UFRJ

Tito Lívio Moitinho Dr. UFRJ



TERMO Nº 121/2024 - PPGQ (12.28.01.00.00.00.60)

(Nº do Protocolo: NÃO PROTOCOLADO)

(Assinado digitalmente em 06/03/2024 10:42)

*ELIANE PEREIRA CIPOLATTI
PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR
DEQ (12.28.01.00.00.00.00.45)
Matrícula: ###258#2*

(Assinado digitalmente em 06/03/2024 09:24)

*IDIO ALVES DE SOUSA FILHO
PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR
DQA (11.39.00.22)
Matrícula: ###444#1*

(Assinado digitalmente em 06/03/2024 12:37)

*JOAO VICTOR NICOLINI
PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR
CoordCGEngM (12.28.01.00.00.00.00.39)
Matrícula: ###033#6*

(Assinado digitalmente em 06/03/2024 10:56)

*ANDRÉA MEDEIROS SALGADO
ASSINANTE EXTERNO
CPF: ###.###.157-##*

(Assinado digitalmente em 06/03/2024 10:03)

*TITO LIVIO MOITINHO ALVES
ASSINANTE EXTERNO
CPF: ###.###.855-##*

Visualize o documento original em <https://sipac.ufrrj.br/documentos/> informando seu número: **121**, ano: **2024**, tipo: **TERMO**, data de emissão: **06/03/2024** e o código de verificação: **2a310feb39**

*Panda, Pingo, Tchutchuca, Bingo e Gotinha...
dedico essa tese a vocês, que foram me
deixando, um a um, ao longo desse doutorado,
depois de duas décadas ao meu lado e me
fazendo companhia... A pior parte desse
doutorado, com certeza, foi perder vocês.*

AGRADECIMENTOS

Aos meus queridos orientadores, João e Inês, expresso minha profunda gratidão pela orientação dedicada e contribuições valiosas ao longo do meu doutorado. Obrigado pelo apoio incansável e pelo papel fundamental na realização deste trabalho. Em especial, ao professor João, por ter aceitado o desafio da orientação nos últimos meses.

À professora Rosane, agradeço por ter me ajudado de muitas formas nos quatro primeiros anos e de ter expressado a preocupação do meu trabalho poder ser melhor ao ponto de não se importar em passar a orientação ao professor João. Muitíssimo obrigado, professora.

Ao casal José Geraldo e Sheisi, pela amizade, pela chave do laboratório, pelo artigo de revisão e muito mais. Valeu!

Maria Eduarda e Regivânia, obrigado pela ajuda e companhia no laboratório, nos experimentos nos colégios e nas semanas de tecnologia da Rural. Muitas fotos pra ver...

Ao professor Evelton pelos eletrodos de platina, que são muito melhores que os comprados... Muito obrigado.

Ao professor Antônio Gerson pela ajuda no potenciostato nos primeiros meses e por sempre perguntar como eu estava indo.

Às professoras Daniela Cosentino e Cristiane Martins pela “consultoria” em bioquímica e pelos experimentos que deram ou não certos. Muito obrigado pela atenção de vocês e de seus alunos.

Ao professor Marcelo Lima pelo uso da centrífuga nesses cinco anos, obrigado.

À professora Áurea Echevarria e às suas alunas Mariana e Geicy, que me emprestaram o laboratório quando meu potenciostato queimou.

Aos professores Idio (UFRRJ) e Helen (UFRJ) pelas ideias e dicas no seminário de tese.

A todos que me ajudaram em algum momento da minha vida estudantil, desde o Jardim de Infância I, no CESE, até o doutorado, na Rural. Muitíssimo obrigado a todos. Meus pais, Selma e Francisco, que me mantiveram em escola particular até onde foi possível e me sustentaram quando eu não podia na fase adulta. A todos meus professores e diretoras, em especial aos professores da minha matéria preferida (Matemática), Edhana e Adalto, que me deram dicas sobre a faculdade. E também à professora mais bem humorada que já tive, Luiza Mateus. Sinto falta das aulas de vocês. E a diretora Eliane do CESE pelo carinho a minha

família. Ao professor Francisco, do Ensino Médio, não sei onde o senhor está, mas eu só descobri e fiz Química pela sua forma de falar com espanto e respeito dessa Ciência maravilhosa. Obrigado.

À Márcia e à Rafaela, que me ajudaram com recursos e carinho, e me presentaram no primeiro período com calculadora e jaleco (os quais uso até hoje) quando eu não tinha dinheiro para comprar. Que Deus multiplique amor em suas vidas, e que momentos difíceis sejam passageiros.

A todos que me ajudaram de qualquer forma... que oraram por mim... deram carona... conversa... lista de exercício... dicas... é impossível fazer uma faculdade sem dezenas de pessoas te ajudando.

E, é claro, a Deus, por eu estar vivo e ter a inteligência que veio de Ti. Não sei onde vou parar com esses diplomas e muito menos entendo o que aconteceu na minha vida nos últimos anos, mas espero que me ajude a não desistir do Senhor e que, com tudo que aprendi, eu possa ser feliz onde quer que eu esteja e ajude às pessoas a te conhecerem e a serem felizes também.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

Obrigado, Daniel.

RESUMO

CAMPOS, Daniel Ananias Reis de. Desenvolvimento de biossensor com peroxidase de extrato de maxixe (*Cucumis anguria L.*) para determinação de dopamina. 144p. Tese (Doutorado em Química, Química Analítica). Instituto de Química, Departamento de Química Analítica, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2024.

Biossensores se encontram entre um dos maiores avanços científicos das últimas décadas, uma vez que permitem testes rápidos para inúmeros analitos. A dopamina, uma molécula neurotransmissora, desempenha um papel crucial no sistema nervoso central e periférico, influenciando uma variedade de processos fisiológicos e comportamentais. Seu monitoramento preciso, viabilizado pelo uso de biossensores, torna-se essencial para entender os mecanismos subjacentes às doenças neurológicas e psiquiátricas, bem como para desenvolver estratégias terapêuticas mais eficazes. A peroxidase é uma das enzimas mais empregadas em pesquisas de biossensores amperométricos. Por isso é cada vez mais importante avançar no conhecimento das aplicações dessa enzima e em fontes alternativas à peroxidase comercial (HRP) de *Amoracia rusticana*. Neste trabalho, o extrato de maxixe (*Cucumis anguria*) foi selecionado e usado como fonte da enzima peroxidase para a imobilização em nanotubos de titanato (NTT) e em nanopartículas magnéticas de óxido de ferro (NPM). Posteriormente, foram construídos biossensores com o extrato de maxixe filtrado e concentrado (NTTP-F e NTTP-R) e um com a peroxidase comercial (NTT-HRP). Os biossensores construídos foram empregados na quantificação de dopamina em produto farmacêutico ($5,00 \text{ mg mL}^{-1}$). Foi necessário a aplicação de um potencial de $-0,30 \text{ V}$ por 5 s antes de cada varredura de Voltametria de Onda Quadrada (VOQ) para promover a dessorção do analito da superfície do biossensor. Para o biossensor NTTP, a curva de calibração obtida foi de $4,98$ a $65,4 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$, com LD de $2,46 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$. Para o biossensor NPMP, a curva de calibração obtida foi de $4,98$ a $61,0 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$, com LD de $2,11 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$. Na determinação de dopamina na ampola comercial, o biossensor NTTP apresentou o intervalo de confiança de $5,04 \pm 0,06 \text{ mg mL}^{-1}$ (ER = +1,2%) e, o biossensor NPMP, $4,76 \pm 0,04 \text{ mg mL}^{-1}$ (ER = -4,8%). O biossensor NTTP apresentou melhores resultados comparado aos resultados obtidos usando o biossensor NPMP em relação a: sinal maior, melhor repetitividade, curva de calibração um pouco mais ampla e maior exatidão no experimento de adição de padrão. Os biossensores NTTP-R, NTTP-F e NTT-HRP apresentaram a mesma faixa linear da curva de calibração, de $4,98$ a $56,6 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$, com LDs de $1,20$, $1,04$ e $1,83 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$, respectivamente. Na determinação de dopamina na ampola comercial, o biossensor NTTP-F apresentou o intervalo de confiança de $5,47 \pm 0,09 \text{ mg mL}^{-1}$ (ER = +10%). O biossensor NTTP-R, $5,0 \pm 0,2 \text{ mg mL}^{-1}$ (ER = 0%) e, o biossensor NTT-HRP, $5,0 \pm 0,4 \text{ mg mL}^{-1}$ (ER = 0%). No teste de interferente feito com ureia 10 g L^{-1} , o biossensor NTTP-R obteve a menor perda de sinal. Por fim, os NTT apresentaram melhores características eletroquímicas que as NPM. Embora bem semelhantes, o biossensor NTTP-R apresentou melhores resultados do que o NTTP-F e do que o biossensor NTT-HRP. Os biossensores construídos com extrato de maxixe não apresentaram grandes diferenças do biossensor construído com HRP. Porém o biossensor NTTP-R apresentou melhores características do que o NTT-HRP e do que o NTTP-F.

PALAVRAS-CHAVES: Biossensor, maxixe, nanotubos de titanato, nanopartículas magnéticas, dopamina.

ABSTRACT

CAMPOS, Daniel Ananias Reis de. Biosensor of carbon paste modified with maxixe peroxidase for determination of dopamine. 144p. Thesis (Doctorate in Chemistry, Analytical Chemistry) Instituto de Química, Departamento de Química Analítica, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2024.

Biosensors stand as one of the greatest scientific advancements of recent decades, as they enable rapid testing for numerous analytes. Dopamine, a neurotransmitter molecule, plays a crucial role in both the central and peripheral nervous systems, influencing a variety of physiological and behavioral processes. Its precise monitoring, facilitated by the use of biosensors, becomes essential for understanding the underlying mechanisms of neurological and psychiatric disorders, as well as for developing more effective therapeutic strategies. Peroxidase is one of the most employed enzymes in amperometric biosensor research. Therefore, advancing knowledge on the applications of this enzyme and seeking alternative sources to commercial peroxidase (HRP) from *Armoracia rusticana* becomes increasingly important. In this study, extract from *Cucumis anguria* was selected and utilized as a source of peroxidase enzyme for immobilization on titanate nanotubes (NTT) and iron oxide magnetic nanoparticles (NPM). In the second part of the thesis, biosensors were constructed using filtered and concentrated angled loofah extract (NTTP-F and NTTP-R) and one using commercial peroxidase (NTT-HRP). The constructed biosensors were employed in the quantification of dopamine in a pharmaceutical product (5.00 mg mL^{-1}) using square wave voltammetry (SWV). The application of a potential of -0.30 V for 5 s was necessary before each SWV scan to promote the desorption of the analyte from the biosensor surface. Parameters such as pH, amplitude, and frequency were optimized. For the NTTP biosensor, the obtained calibration curve ranged from 4.98 to $65.4 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$, with a detection limit (LD) of $2.46 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$. The NPMP biosensor calibration curve ranged from 4.98 to $61.0 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$, with an LD of $2.11 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$. In the determination of dopamine in the commercial ampoule, the NTTP biosensor presented a confidence interval of $5.04 \pm 0.06 \text{ mg mL}^{-1}$ (RE = +1.2%), and the NPMP biosensor showed $4.76 \pm 0.04 \text{ mg mL}^{-1}$ (RE = -4.8%). The NTT biosensor demonstrated superior results compared to the NPM biosensor in terms of a higher signal, better repeatability, a slightly broader calibration curve, and greater accuracy in the standard addition experiment. NTTP-R, NTTP-F, and NTT-HRP biosensors exhibited the same linear range of the calibration curve (4.98 to $56.6 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$), with LDs of 1.20 , 1.04 , and $1.83 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$, respectively. In the determination of dopamine in the commercial ampoule, NTTP-F presented a confidence interval of $5.47 \pm 0.09 \text{ mg mL}^{-1}$ (RE = +10%), NTTP-R showed $5.0 \pm 0.2 \text{ mg mL}^{-1}$ (RE = 0%), and NTT-HRP displayed $5.0 \pm 0.4 \text{ mg mL}^{-1}$ (RE = 0%). In the interference test with 10 g L^{-1} urea, the NTTP-R biosensor exhibited the least signal loss. Finally, the NTTs displayed better electrochemical characteristics than the NPMs. Despite being quite similar, the NTTP-R biosensor yielded better results than NTTP-F and the NTT-HRP biosensor. Biosensors constructed with gherkin extract did not show significant differences from the biosensor constructed with HRP. However, the NTTP-R biosensor exhibited better characteristics than both the NTT-HRP and the NTTP-F.

KEYWORDS: Biosensor, maxixe, titanium nanotubes, magnetic nanoparticles, dopamine.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação dos componentes básicos de um biossensor, mostrando os principais tipos de biorreceptores e transdutores.	23
Figura 2. Estrutura e sequência de um teste de fluxo lateral.	24
Figura 3. Distribuição das vendas de diferentes tipos de biossensores no ano de 2016.....	27
Figura 4. Mecanismos de resposta de diferentes gerações de biossensores enzimáticos amperométricos.	30
Figura 5. Diferentes formas de nanomateriais com diferentes dimensões utilizados na construção de biossensores	34
Figura 6. Ciclo catalítico da enzima peroxidase.....	42
Figura 7. Reação de formação de tetraguaiacol empregando peroxidase como catalisador ...	43
Figura 8. Maxixe.	45
Figura 9. Diferentes métodos de imobilização enzimática.....	46
Figura 10. Estrutura da dopamina e dopamina oxidada	52
Figura 11. Esquema de uma célula voltamétrica.....	55
Figura 12. Modelo de Voltamograma cíclico.....	57
Figura 13. Gráficos da técnica de voltametria de onda quadrada.....	58
Figura 14. Eletrodos empregados nos experimentos voltamétricos:	61
Figura 15. Esquema das etapas para obtenção dos extratos vegetais para avaliação da atividade da peroxidase presente.....	62
Figura 16. Etapas de obtenção dos extratos de maxixe para posterior preparo dos biossensores NTTP-R, NTTP-F e NTT-HRP.....	63
Figura 17. Exemplo de Gráfico de Tempo <i>versus</i> Absorbância média.	64
Figura 18. Etapas de obtenção dos Biossensores NTTP e NPMP.....	66
Figura 19. Etapas de obtenção dos Biossensores NTTP-F e NTTP-R.....	66
Figura 20. Esquema das etapas de funcionalização dos NTT seguidas da imobilização da PMX.	67
Figura 21. Eletrodos de trabalho comerciais empregados para pasta de carbono.	69
Figura 22. Gráfico de pH <i>versus</i> atividade enzimática do extrato de maxixe.	75
Figura 23. Atividades das alíquotas das eluições em diferentes colunas de sílica-gel.....	75
Figura 24. Atividades enzimáticas da peroxidase nos extratos antes e depois da concentração com filtro Centripep®.	77
Figura 25. Eletroforese dos extratos	77
Figura 26. Estabilidade dos extratos de maxixe e da solução de HRP em termos de atividade	78

Figura 27. Estabilidade dos extratos de maxixe e da solução de HRP em termos de atividade relativa (%).	79
Figura 28. FTIR dos NTT: (cinza) sem funcionalização, (azul) funcionalizados com APTMS e (laranja) funcionalizados com APTMS e glutaraldeído.	80
Figura 29. FTIR dos NTT (A) sem funcionalização e (B) funcionalizados com a imobilização de EMX-R, EMX-F e solução de HRP.	81
Figura 30. FTIR dos NTT-AG depois da imobilização com HRP e da HRP liofilizada.	82
Figura 31. FTIR das NPM: (A) sem modificação e (B) com peroxidase de maxixe imobilizada.	83
Figura 32. Estudo do efeito da amplitude da VOQ empregando os biossensores NPMP e NTTP.	86
Figura 33. Estudo do efeito da frequência da VOQ empregando os biossensores NPMP e NTTP.	87
Figura 34. Estudo do efeito do pH da solução tampão empregando os biossensores NPMP e NTTP.	87
Figura 35. Voltamogramas cíclicos do biossensor NPMP (curva vermelha), sensor ENPM (curva verde) e sensor EPC (curva preta).	88
Figura 36. Voltamogramas cíclicos (A) do biossensor NPMP, (B) do ENPM e (C) do EPC em $\text{Fe}(\text{CN})_6^{-3}$ (D) relação linear entre valores de I_{pa} e I_{pc} .	90
Figura 37. Voltamogramas cíclicos do biossensor NTTP (linha vermelha), sensor ENTT (linha verde) e sensor EPC (linha preta) na solução $\text{Fe}(\text{CN})_6^{-3}$.	90
Figura 38. Voltamogramas cíclicos (A) do biossensor NTTP, (B) do ENTT e (C) do EPC em $\text{Fe}(\text{CN})_6^{-}$ e (D) relação linear entre valores de I_{pa} e I_{pc} .	92
Figura 39. Voltamogramas de onda quadrada empregando o biossensor NPMP, onde: (a) foi aplicado o potencial de -0,30 V antes de cada varredura e (b) não houve aplicação do potencial entre as varreduras.	93
Figura 40. Voltamogramas de onda quadrada empregando o biossensor NTTP, onde: (a) foi aplicado o potencial de -0,30 V antes de cada varredura e (b) não houve aplicação do potencial entre as varreduras.	94
Figura 41. Voltamogramas cíclicos para o biossensores NPMP em diferentes dias.	96
Figura 42. Voltamogramas cíclicos para o biossensores NTTP em diferentes dias.	97
Figura 43. Curva de calibração da dopamina empregando o biossensor NPMP.	98
Figura 44. Curva de calibração da dopamina empregando o biossensor NTTP.	98
Figura 45. Gráfico da curva analítica da concentração de dopamina versus absorvância.	99
Figura 46. (A, B, C) Gráficos da adição de padrão em amostra comercial, em triplicata, empregando o biossensor NPMP.	100
Figura 47. (A, B, C) Gráficos da adição de padrão em amostra comercial, em triplicata, empregando o biossensor NTTP.	101
Figura 48. Comparação dos biossensores NTTP e NPMP em uma solução de dopamina.	103

Figura 49. Gráfico da estabilidade dos biossensor NTTP-F e NTTP-R.....	105
Figura 50. Curva de calibração da dopamina empregando o biossensor NTTP-F construído.	106
Figura 51. Curva de calibração da dopamina empregando o biossensor NTTP-R construído.	107
Figura 52. Gráficos da adição de padrão em amostra comercial para cada réplica (A, B, C) empregando o biossensor construído de NTTP-F.	108
Figura 53. Gráficos da adição de padrão em amostra comercial, em triplicata, empregando o biossensor construído de NTTP-R.....	108
Figura 54. Estudo do efeito da amplitude da VOQ empregando o biossensor NTT-HRP.....	110
Figura 55. Estudo do efeito da frequência da VOQ empregando o biossensor NTT-HRP....	110
Figura 56. Estudo do efeito do pH da solução tampão empregando o biossensor NTT-HRP.	111
Figura 57. Gráfico da estabilidade do biossensor NTT-HRP.....	112
Figura 58. Curva de calibração da dopamina empregando o biossensor NTT-HRP construído. Inserção: voltamogramas de cada ponto da curva analítica;	113
Figura 59. (A, B, C) Gráficos da adição de padrão em amostra comercial, em triplicata, empregando o biossensor construído de NTT-HRP.....	114
Figura 60. Gráfico da estabilidade dos biossensores de NTTP-F, de NTTP-R e de NTT-HRP.	117
Figura 61. Valores de Δi no emprego dos biossensores em uma solução de dopamina $2,00 \times 10^{-4}$ mol L ⁻¹ com ureia 10 g L ⁻¹ em PBS pH 7,0 em comparação com uma solução sem o interferente.....	119

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Biossensores já construídos com diferentes tipos de biorreceptores e transdutores.	38
Tabela 2. Biossensores eletroquímicos de peroxidase imobilizadas em NPM.....	51
Tabela 3. Biossensores eletroquímicos de peroxidase imobilizadas em NTT.	51
Tabela 4. Comparação de biossensores eletroquímicos para determinação dopamina.	53
Tabela 5. Atividade da peroxidase encontrada no extrato de diversos vegetais.....	74
Tabela 6. Principais picos de absorção no espectro de FTIR da HRP liofilizada.	82
Tabela 7. Valores de Potencial Zeta (mV) para as NPM antes e após a deposição do EMX...84	
Tabela 8. Valores de Potencial Zeta (mV) para os NTT antes e após as etapas de funcionalização.....	84
Tabela 9. Valores de Potencial Zeta (mV) para os NTT funcionalizados após as deposições dos extratos de maxixe ou solução de HRP.	85
Tabela 10. Valores ótimos das variáveis experimentais para os biossensores NPMP e NTTP.	88
Tabela 11. Teste de repetitividade do biossensor NTTP e NPMP.	95
Tabela 12. Teste de reprodutibilidade do biossensor NTTP.	95
Tabela 13. Concentração da amostra comercial encontrada pelo método comparativo de espectrofotometria por UV.	100
Tabela 14. Determinação de dopamina em amostra comercial empregando os biossensores NPMP e NTTP e o método comparativo.....	101
Tabela 15. Teste de repetitividade do biossensor NTTP-F, NTTP-R e NTTP.....	104
Tabela 16. Teste de reprodutibilidade dos biossensor NTTP-F, NTTP-R e NTTP.	104
Tabela 17. Determinação de dopamina em amostra comercial empregando os biossensores NTTP-R e NTTP-F e o método comparativo.	109
Tabela 18. Valores ótimos das variáveis experimentais para o biossensor NTT-HRP.	111
Tabela 19. Teste de repetitividade do biossensor NTT-HRP.	111
Tabela 20. Teste de reprodutibilidade do biossensor NTT-HRP.	112
Tabela 21. Determinação de dopamina em amostra comercial empregando o biossensor NTT-HRP construído e o método comparativo.....	115
Tabela 22. Comparação de biossensores para determinação dopamina.	117
Tabela 23. Comparação dos biossensores NTTP-F, NTTP-R e NTT-HRP.	120

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABS	Absorção
APTMS	3-aminopropiltrimetoxisilano
DOP	Dopamina
DPR	Desvio Padrão Relativo
ENPM	Eletrodo de pasta de carbono com nanopartículas magnéticas (sem enzima)
ENTT	Eletrodo de pasta de carbono com Nanotubos de titanato (sem enzima)
EPC	Eletrodo de pasta de carbono (sem enzima e sem nanomaterial)
FTIR	Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier
GLU	Glutaraldeído
HRP	Peroxidase de horseradish
LD	Limite de detecção
LQ	Limite de quantificação
NPM	nanopartículas magnéticas recobertas com quitosana
NPMP	Biossensor de nanopartículas magnéticas e peroxidase do extrato de maxixe
NTT	Nanotubos de titanato
NTT-HRP	Biossensor de Nanotubos de titanato e peroxidase de horseradish
NTTP	Biossensor de Nanotubos de titanato e peroxidase do extrato de maxixe
NTTP-F	Biossensor de Nanotubos de titanato e peroxidase do extrato filtrado
NTT-R	Biossensor de Nanotubos de titanato e peroxidase do extrato retido
PBS	<i>Phosphate Buffer Solution</i> (Solução Tampão de fosfato)
PMX	Peroxidase de Maxixe
EMX	Extrato de maxixe
EMX-F	Extrato de maxixe filtrado no filtro Centripep [®]
EMX-R	Extrato de maxixe retido no filtro Centripep [®]
r	Coefficiente de correlação
VC	Voltametria Cíclica

VOQ	Voltametria de Onda Quadrada
Ipa	Corrente de pico anódico
Ipc	Corrente de pico catódico

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1. INTRODUÇÃO	19
CAPÍTULO 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	22
2.1 Biossensores	22
2.1.1 Estrutura de um biossensor	23
2.1.2 Biossensores eletroquímicos enzimáticos	29
2.1.3 Eletrodo de pasta de carbono	32
2.1.4 Nanomateriais em biossensores eletroquímicos.....	33
2.1.5 Aplicações recentes para biossensores eletroquímicos	37
2.2 Enzimas	38
2.2.1 Peroxidase	41
2.2.2 Imobilização de enzimas	46
2.3 Biossensores Eletroquímicos Empregando Enzimas Peroxidases	50
2.4 Dopamina	52
2.4.1 Detecção de Dopamina por Biossensores Eletroquímicos	53
2.5 Voltametria	53
2.5.1 Voltametria cíclica	56
2.5.2 Voltametria de onda quadrada.....	57
CAPÍTULO 3. OBJETIVOS	59
3.1 Objetivo Geral	59
3.2 Objetivos Específicos	59
CAPÍTULO 4. EQUIPAMENTOS E METODOLOGIAS	60
4.1 Materiais e Reagentes	60
4.2 Preparação dos Extratos	61
4.3 Determinação da Atividade da Peroxidase	63
4.4 Estudo da Atividade da PMX no EMX	64
4.5 Eletroforese	65
4.6 Determinação da Massa Molecular da PMX com Coluna de Sílica Sephadex®	65
4.7 Construção dos Biossensores.....	65
4.7.1 Funcionalização dos NTT	67
4.7.2 Imobilização da peroxidase nos NTT e nas NPM.....	68
4.7.3 Preparo da pasta de carbono modificada.....	68
4.8 Experimentos Eletroanalíticos	69
4.9 Otimização dos Parâmetros Experimentais	70
4.10 Curva de Calibração	70
4.11 Adição de Padrão	71
4.12 Repetitividade, Reprodutibilidade e Estabilidade dos Biossensores	71
4.13 Método Comparativo	72
4.14 Teste com Ureia	72
CAPÍTULO 5. ESTUDOS SOBRE O EXTRATO DE MAXIXE	73
5.1 Estudo da Atividade Enzimática de Diferentes Vegetais	73
5.2 Efeito do pH no preparo do EMX	74
5.3 Determinação da Massa Molecular da PMX com Coluna de Sílica Sephadex®	75
5.4 Caracterização dos extratos EMX-R e EMX-F.....	76
5.5 Estabilidade dos Extratos de Maxixe	78

CAPÍTULO 6. IMOBILIZAÇÃO DA PEROXIDASE NOS NANOMATERIAIS	80
6.1 FTIR dos NTT	80
6.2 FTIR das NPM	83
6.3 Potencial Zeta dos Nanomateriais	83
CAPÍTULO 7. BIOSSENSORES NPMP e NTTP	86
7.1 Otimização dos parâmetros da voltametria de onda quadrada.....	86
7.2 Caracterização eletroquímica com voltametria cíclica.....	88
7.3 Método para Dessorção da Analito na Superfície do Biossensor	93
7.4 Repetitividade, reprodutibilidade e estabilidade	95
7.5 Curva de calibração	97
7.6 Método Comparativo Espectrofotométrico	99
7.7 Adição de padrão	100
7.8 Comparação entre os biossensores NTTP e NPMP	102
CAPÍTULO 8. BIOSSENSORES NTTP-F e NTTP-R	104
8.1 Repetitividade, reprodutibilidade e estabilidade	104
8.2 Curva de calibração	106
8.3 Adição de padrão	107
CAPÍTULO 9. BIOSSENSOR NTT-HRP	110
9.1 Otimização dos parâmetros experimentais da voltametria de onda quadrada	110
9.2 Repetitividade, reprodutibilidade e estabilidade	111
9.3 Curva de calibração	113
9.4 Adição de padrão	114
CAPÍTULO 10. COMPARAÇÃO DOS BIOSSENSORES NPMP, NTTP, NTTP-R, NTTP-F E NTT-HRP	116
10.1 Perspectivas para Próximos Trabalhos.....	122
CAPÍTULO 11. CONCLUSÕES	123
CAPÍTULO 12. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	125
CAPÍTULO 13. ANEXOS	141
Anexo I – Absorbâncias Médias e Atividades de Extratos de Diferentes Vegetais	142
Anexo II – Absorbâncias Médias e Atividades de Extrato de Maxixe em diferentes valores de pH.....	143
Anexo III – Absorbâncias Médias do EMX-R, EMX-F e HRP em Diferentes Dias	145
Anexo IV – Valores de Δi para os biossensores de NTTP-R, NTTP -F e NTT-HRP em Diferentes Dias	146

CAPÍTULO 1. INTRODUÇÃO

A IUPAC define um sensor químico como "um dispositivo que transforma informações químicas, variando da concentração de um componente específico da amostra até a análise da composição total, em um sinal analiticamente útil". Biossensores são definidos como "sensores químicos em que o sistema de reconhecimento utiliza um mecanismo bioquímico" (KHANMOHAMMADI *et al.*, 2020; POGHOSSIAN *et al.*, 2019). Um biossensor é um sistema que consiste em dois componentes básicos conectados em série: um sistema de reconhecimento biológico (biorreceptor, como enzimas, anticorpos, antígenos, DNA, dentre outros) e um transdutor (KHAN *et al.*, 2020; PUROHIT *et al.*, 2020). Os biossensores eletroquímicos são aqueles que fornecem um sinal elétrico para a resposta química transduzida. O reconhecimento do analito pelo componente biológico gera um sinal que é transmitido ao transdutor, cuja finalidade é transformá-lo em outro tipo de sinal mensurável que é proporcional à concentração de um analito na amostra. Esse biorreconhecimento deve possuir um alto grau de seletividade e especificidade. Por fim, na maioria dos biossensores comerciais, o sinal elétrico gerado no transdutor é analisado por uma unidade de processamento, que o converte em uma informação mostrada ao analista por meio de um display. Essa informação é a concentração do analito ou simplesmente a detecção de sua presença na amostra (PUROHIT *et al.*, 2020; KHAN *et al.*, 2020; ROTARIU *et al.*, 2016).

Com o avanço da nanotecnologia, os biossensores têm sido miniaturizados cada vez mais. Os nanomateriais são aliados perfeitos na busca por sensores mais sensíveis e seletivos. Estes, em conjunto com técnicas novas de transdução e imobilização dos componentes biológicos, permitem inúmeros arranjos para detecção de vários tipos de analitos de interesse. Os nanomateriais comumente empregados incluem os nanomateriais de carbono e nanopartículas metálicas (NEVES *et al.*, 2018; TRAN e MULCHANDANI, 2016).

Diferentes abordagens têm sido utilizadas para a construção e/ou modificação de eletrodos utilizando nanomateriais, incluindo os eletrodos de pasta de carbono, eletrodos impressos em tela (conhecidos como *screen-printed*) e eletrodos impressos em 3D (AMBAYE *et al.*, 2021).

Atualmente, os biossensores são majoritariamente empregados na área da saúde (ZHOU *et al.*, 2019), em aplicações como diagnósticos, tratamento e monitoramento de doenças, testes

de gravidez e fertilidade, microrganismos causadores de doenças e marcadores bioquímicos em fluidos corporais, como sangue, urina e saliva (MOHANKUMAR *et al.*, 2021; BHALLA *et al.*, 2016). Além disso, por suas excelentes características, como portabilidade e rapidez, podem ser aplicados em uma ampla gama de outras áreas, como pesquisa forense e biomédica (CARNEIRO *et al.*, 2020; GATTANI *et al.*, 2019).

Uma molécula de grande interesse para monitoramento é a dopamina, pois esta desempenha um papel crucial no sistema nervoso como neurotransmissor, controlando a comunicação entre células nervosas. Além de influenciar funções cognitivas, como aprendizado e memória, esta substância também regula as emoções, o humor e o prazer (LIU e LIU, 2021; DECARLI *et al.*, 2022). A deficiência desse neurotransmissor está associada à doença de Parkinson, na qual ocorre degeneração de células produtoras de dopamina. Além disso, a dopamina atua como um agente vasoativo. Essa função é utilizada clinicamente para o suporte hemodinâmico em casos de insuficiência cardíaca, onde a dopamina ajuda a aumentar o fluxo sanguíneo nos tecidos do coração. Assim, esta molécula desempenha múltiplas funções no organismo, sendo essencial tanto para o funcionamento do sistema nervoso quanto para a regulação cardiovascular (SUHITO *et al.*, 2019; KONG *et al.*, 2018).

Assim, a construção de um método fácil, seletivo e sensível para detecção de dopamina é necessária para monitorar seus níveis no corpo humano. A detecção precisa da dopamina é crucial para a compreensão de doenças neurológicas e também para a avaliação da eficácia de tratamentos farmacológicos. Vários métodos têm sido empregados para a determinação de dopamina como quimioluminescência, cromatografia, colorimetria, fluorescência e espectrofotometria (XIE *et al.*, 2017). No entanto, esses métodos convencionais envolvem pré-tratamentos de amostras caros e demorados (HALDORAI *et al.*, 2017). Nos últimos anos, os métodos eletroquímicos de detecção têm despertado enorme interesse devido à simplicidade, baixo custo, tempo de resposta rápido, baixo limite de detecção, alta sensibilidade e seletividade (LI *et al.*, 2017).

Os biossensores têm sido empregues para a quantificação de dopamina em plasma humano, amostras de soro sanguíneo, urina humana (SUHITO *et al.*, 2019; KONG *et al.*, 2018) e ampolas comerciais de injeção de dopamina (DECARLI *et al.*, 2022; FLORESCU E DAVID, 2017; FRITZEN-GARCIA *et al.*, 2009). A construção dos biossensores para detecção de dopamina, algumas enzimas têm sido exploradas como elementos receptores: polifenol oxidase, tirosinase, peroxidase de rábano (HRP), tiramina oxidase e lacase (LIU *et al.*, 2021).

Um grupo de enzimas com bastante destaque são as peroxidases, que, devido à sua versatilidade e à sua larga distribuição, apresentam imenso potencial para serem empregadas como enzimas industriais (SINGH *et al.*, 2019). Catalisam a reação redox para uma ampla gama de substratos, com aplicações medicinais, bioquímicas, imunológicas, biotecnológicas e industriais. Elas têm sido usadas com sucesso para branqueamento de polpa nas indústrias de papel e têxtil (YADAV e YADAV, 2015), biorremediação e descoloração (SILVA *et al.*, 2012b), e aplicações analíticas que incluem os biossensores. Por exemplo, biossensores baseados em peroxidase encontram aplicação em sistemas analíticos para determinação de peróxido de hidrogênio, glicose, álcoois, glutamato, colina e dopamina (PANDEY *et al.*, 2017). Para a maioria destes fins biotecnológicos e industriais, portanto, a utilização de fontes vegetais de peroxidase é até agora a opção mais econômica. Extratos vegetais ricos em enzimas têm sido utilizados para obtenção de biossensores. Embora estes extratos contenham apenas cerca de 1% a 30% da enzima pretendida (além de outras enzimas ativas e/ou inativas e constituintes celulares) os extratos enzimáticos são frequentemente mais estáveis que as enzimas purificadas devido à presença de uma mistura de componentes que conferem proteção contra oxidação e desnaturação indevidas (FABER, 2011).

As peroxidases vegetais podem ser facilmente extraídas de vários tipos de plantas, como raiz-forte, soja, nabo, gengibre, entre outras (JUN *et al.*, 2019). Neste sentido, esta tese de doutorado tem como objetivo desenvolver um biossensor eletroquímico de pasta de carbono a partir de um extrato enzimático de maxixe (*Cucumis anguria* L.) contendo peroxidase para detecção de dopamina. A metodologia apresentada tem como objetivo ser simples, rápida e de baixo custo para obtenção de biossensores eletroquímicos. Nesta tese, foram empregados nanotubos de titanato e nanopartículas magnéticas. Esses materiais nanoestruturados possuem grande relação área superficial/volume, altas propriedades térmicas e mecânicas (CIPOLATTI, *et al.*, 2014), e propriedades elétricas que aumentam a eficiência de transferência de elétrons para dispositivos eletroquímicos.

CAPÍTULO 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Biossensores

A IUPAC define formalmente um sensor químico como sendo "um dispositivo que transforma informações químicas, variando da concentração de um componente específico da amostra até a análise da composição total, em um sinal analiticamente útil" e define os biossensores como "sensores químicos em que o sistema de reconhecimento utiliza um mecanismo bioquímico" (KHANMOHAMMADI *et al.*, 2020; POGHOSSIAN *et al.*, 2019).

A história dos biossensores começa com os trabalhos do professor Leland Clark Jr no início da década de 1950. Em conjunto com outros dois pesquisadores, Frank Gollan e Vishwa Gupta, Clark desenvolveu o primeiro oxigenador sanguíneo de bolhas. Em 1956, Clark desenvolveu um eletrodo de platina para quantificar o oxigênio que era dissolvido no sangue pela máquina de circulação sanguínea extracorpórea recém inventada. Porém, foi apenas em 1962 que o professor descreveu o primeiro biossensor. Empregando soluções de glicose e da enzima glicose oxidase para a calibração do eletrodo para medir oxigênio, ele percebeu que seria possível a quantificação da glicose em solução. Como a glicose reagia com o oxigênio, o eletrodo detectava a diminuição da corrente elétrica, devido à diminuição do oxigênio na solução. Essa diminuição era proporcional à concentração da glicose na solução. Dessa forma, Leland Clark Jr inventou um campo da ciência e fez com que a qualidade de vida das pessoas fosse afetada positivamente com o rápido diagnóstico de doenças e seu monitoramento, com o uso desses dispositivos que viriam a ser chamados de biossensores. Em 1992, foi homenageado no *World Congress on Biosensors* e recebeu o título de "Pai dos biossensores" (BOLLELLA e KATZ, 2020; ARORA, 2013; HEINEMAN E JENSEN, 2006). O primeiro biossensor disponível para a quantificação de alguma substância foi o glicosímetro sanguíneo da *Yellow Spring Instruments* em 1975 (KURBANOGLU *et al.*, 2020; MEKTAR e GIRIGOSWAMI, 2019).

2.1.1 Estrutura de um biossensor

Um biossensor é formado por três componentes na maior parte dos casos, que incluem o biorreceptor, o transdutor e a unidade de processamento dos dados, conforme mostrado Figura 1. Esses sensores geralmente são classificados conforme o tipo de biorreceptor ou transdutor empregado.

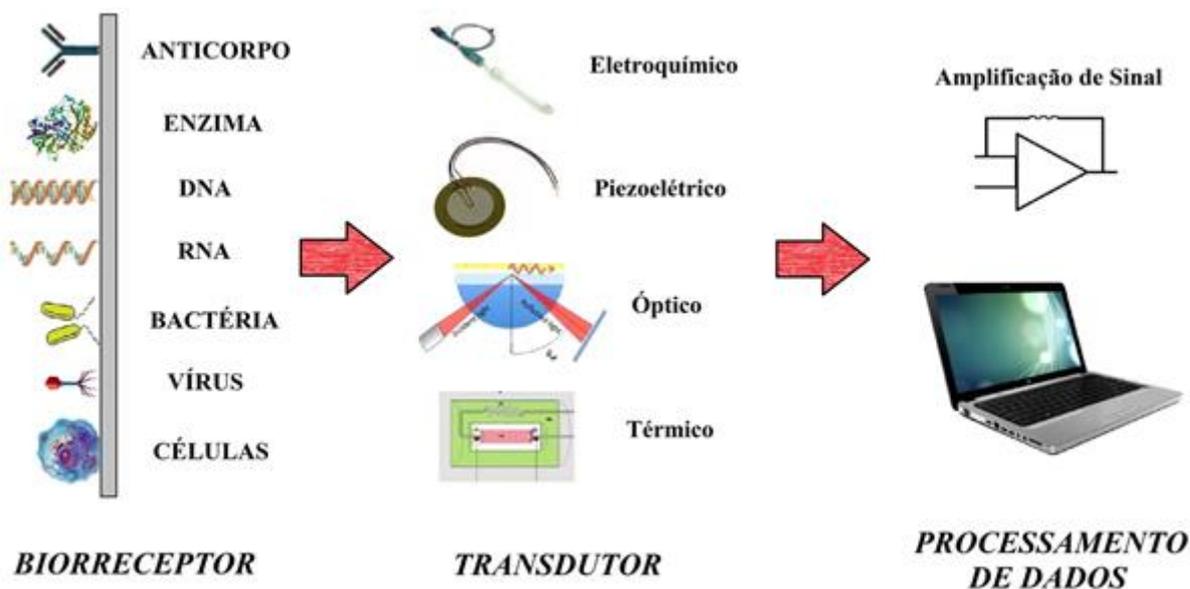


Figura 1. Representação dos componentes básicos de um biossensor, mostrando os principais tipos de biorreceptores e transdutores. (Fonte: De autoria própria)

2.1.1.1 Biorreceptor

O biorreceptor constitui o principal componente de um biossensor, sendo o promotor do reconhecimento do analito e o motivo pelo qual estes sensores possuem o prefixo *bio*. Os mais empregados são enzimas e anticorpos, porém sequências de DNA, de RNA, parte ou exemplares inteiros de células, bactérias e vírus podem ser empregados (MOHANKUMAR *et al.*, 2021; PUROHIT *et al.*, 2020; HALILOVIĆ *et al.*, 2019; ROTARIU *et al.*, 2016).

De acordo com o princípio do biorreconhecimento, os biossensores são classificados como biossensores catalíticos e biossensores de afinidade ou não catalíticos. Em um biossensor catalítico, a interação analito-biorreceptor resulta no desenvolvimento de um novo produto de reação bioquímica. Para este tipo de biossensor são empregados biorreceptores como enzimas, microrganismos, tecidos e células inteiras. No caso do biossensor de afinidade (não catalítico), o analito liga-se irreversivelmente ao biorreceptor e durante a interação nenhum novo produto

de reação bioquímica é formado. Este tipo de biossensor emprega anticorpos, receptores celulares e ácidos nucleicos como alvo de detecção (SHUKLA *et al.*, 2016).

Os anticorpos são elementos de biorreconhecimento de afinidade, que têm sido utilizados há mais de duas décadas devido à sua ampla gama de aplicações e fortes interações antígeno-anticorpo. Os anticorpos possuem a estrutura das imunoglobulinas (Ig) em forma de “Y”, que consiste em duas cadeias polipeptídicas pesadas e duas leves conectadas por ligações dissulfeto. Cinco classes de anticorpos foram definidas com base nas diferenças nas cadeias pesadas: IgG, IgM, IgA, IgD e IgE (SCHROEDER e CAVACINI, 2010). Biossensores que possuem um anticorpo incorporado como ligantes ou funcionam na interação anticorpo-antígeno são chamados imunossensores. Os anticorpos são empregados mais comumente nos testes imunocromatográficos de fluxo lateral, como o teste de gravidez, conforme mostra Figura 2.

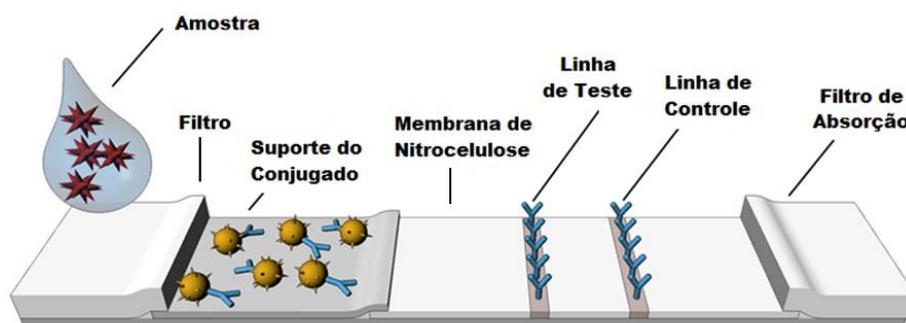


Figura 2. Estrutura e sequência de um teste de fluxo lateral.
(Fonte: Adaptado de MIOCEVIC *et al.*, 2017)

Estes são testes semiquantitativos, rápidos e simples, onde o resultado pode ser obtido pela análise visual de duas linhas produzidas no próprio teste, a linha de teste e a de controle. Na tira do teste, geralmente de plástico, ficam imobilizados filtros de absorção nas extremidades para garantir um fluxo contínuo em uma só direção, um suporte com anticorpos que se ligarão ao analito e anticorpos imobilizados em duas linhas. À primeira linha, ligam-se o analito já ligado ao anticorpo que estava presente no suporte. À segunda linha, ligam-se os anticorpos no suporte e que não se ligaram ao analito. Quando os anticorpos se ligam aos anticorpos das linhas, há a liberação de um corante, o qual fornece o resultado para o usuário (MIOCEVIC *et al.*, 2017). O teste de fluxo lateral pode ser empregado para detectar desde o hormônio

gonadotrofina coriônica (teste de gravidez) até mesmo a bactéria *Vibrio Cholerae*, como no trabalho realizado por Chen *et al.* (2014).

Aptâmeros são ácidos nucleicos sintéticos de fita simples (sequências de DNA ou RNA) que se ligam seletivamente às moléculas alvo e podem ser dobrados em estruturas bidimensionais (2D) e tridimensionais (3D). Em estruturas 2D ou 3D, os alvos apresentam alto desempenho de ligação devido à maior densidade superficial e menor bloqueio espacial (DHIMAN *et al.*, 2017).

Biossensores baseados em células inteiras utilizam microrganismos (bactérias, fungos - leveduras e bolores, algas, protozoários e vírus). As células podem interagir com uma ampla variedade de analitos, exibindo a resposta registrada e transmitida pelo transdutor (RON e RISHPON, 2010). Devido à sua boa sensibilidade, alta seletividade e capacidade de detecção, esses biossensores foram empregados com sucesso em monitoramento ambiental, análise de alimentos, farmacologia, metais tóxicos, pesticidas, detecção de contaminantes orgânicos e triagem de drogas (BEREPIKI *et al.*, 2020).

As enzimas são biocatalisadores comuns, eficientes no aumento da taxa de reação biológica. O princípio de funcionamento de um biossensor baseado em enzima depende da reação catalítica e da capacidade de ligação para a detecção do analito alvo. Vários mecanismos possíveis estão envolvidos no processo de reconhecimento do analito: (a) O analito é metabolizado pela enzima, então a concentração da enzima é estimada medindo a transformação catalítica do analito pela enzima e (b) uma enzima inibida ou ativada pelo analito, portanto, a concentração do analito está relacionada à diminuição da formação de produtos enzimáticos (LIM e AHMED, 2016).

As enzimas da classe das oxirredutases (oxidases, peroxidases e desidrogenases) são as mais empregadas nos biossensores enzimáticos. O analito quantificado pode ser tanto um substrato da enzima como um inibidor desta. Os inibidores geralmente são pesticidas ou princípios ativos de medicamentos (ROTARIU *et al.*, 2016). A escolha do biorreceptor mais adequado para cada sistema depende das propriedades de cada amostra (analito a ser quantificado) e do tipo de grandeza física a ser detectada pelo transdutor (OLIVEIRA, 2007), sendo os transdutores eletroquímicos mais comumente usados para biossensores baseados em enzimas.

2.1.1.2 Transdutor

Os transdutores são elementos que convertem uma forma de energia em outra. Sua função nos biossensores é transformar o sinal químico da ligação entre o analito e o biorreceptor em um sinal mensurável. Este processo de conversão de energia é conhecido como sinalização (KHAN *et al.*, 2020; BHALLA *et al.*, 2016). O sinal produzido pela interação analito com o biorreceptor é proporcional à concentração do analito na amostra. Os principais tipos de transdutores são eletroquímicos, ópticos, térmicos e piezoelétricos (PUROHIT *et al.*, 2020; KHAN *et al.*, 2020; ROTARIU, *et al.*, 2016).

Os biossensores eletroquímicos medem um sinal elétrico que é resultado de algum evento biológico (BALAMURUGAN *et al.*, 2018), sendo o principal tipo de biossensor (GATTANI *et al.*, 2019; HALILOVIĆ *et al.*, 2019). Os biossensores eletroquímicos representam a maior fatia no mercado, com 70% das vendas, conforme Figura 3 (HALILOVIĆ *et al.*, 2019). Este tipo de dispositivo apresenta menor custo, maior sensibilidade e menor tempo de análise, além de serem mais compatíveis com os métodos de miniaturização disponíveis. Com o avanço da nanotecnologia os biossensores eletroquímicos tiveram o tamanho ainda mais reduzido e obtiveram melhores resultados em termos de sensibilidade e rapidez, conforme será discutido mais adiante.

Os biossensores eletroquímicos podem ser classificados em três tipos: amperométricos, potenciométricos e condutimétricos (KURBANOGLU *et al.*, 2020; PUROHIT *et al.*, 2020; ZHOU *et al.*, 2019; GATTANI *et al.*, 2019; PUTZBACH e RONKAINEN, 2013). Os condutimétricos medem a alteração na condutividade da solução, que ocorre após a geração ou consumo de íons por uma reação química (PUROHIT *et al.*, 2020). Os potenciométricos medem diferença de potencial, mas sem a passagem de corrente elétrica. Os biossensores que empregam transdutores amperométricos medem a corrente produzida após a aplicação de uma diferença de potencial (ddp) entre dois eletrodos. Essa ddp promove uma reação de oxirredução reversível das espécies eletroativas presentes na solução na superfície do eletrodo de trabalho (PUROHIT *et al.*, 2020; DAS *et al.*, 2016; PUTZBACH e RONKAINEN, 2013; ÇEVIK *et al.*, 2012). Biossensores amperométricos enzimáticos geralmente empregam enzimas da classe das oxirredutases (DAS *et al.*, 2016).

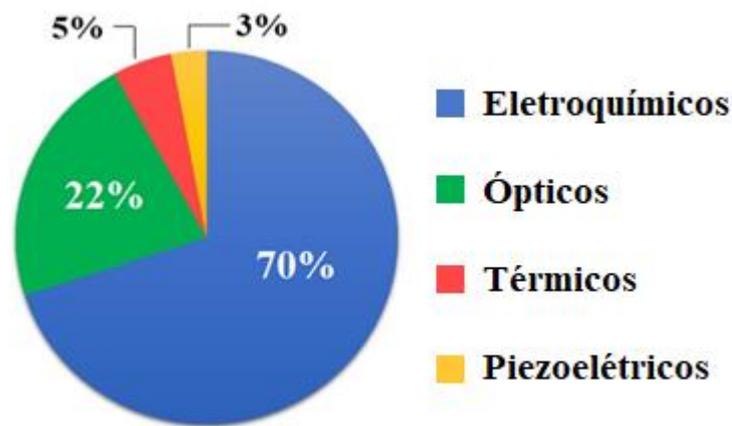


Figura 3. Distribuição das vendas de diferentes tipos de biossensores no ano de 2016. (Fonte: Elaboração própria a partir de dados de NEVES *et al.*, 2018).

Os glicosímetros portáteis dominam a maior parte do mercado de biossensores eletroquímicos (NEVES *et al.*, 2018). Uma das características dos aparelhos portáteis, os chamados *Point of Care*, como os glicosímetros, é a simplicidade para ser usado pelo consumidor em seus lares. Esses dispositivos geralmente funcionam com uma tira (*test strip*) onde é aplicada a amostra a ser analisada. Essas tiras representam 35% do mercado de biossensores. É previsto que este mercado atingirá o valor de 30 bilhões de dólares até o ano de 2027. Por este motivo, o foco da indústria é desenvolver biossensores capazes de identificar doenças infectocontagiosas e controle de doenças crônicas (NEVES *et al.*, 2018).

Os biossensores ópticos empregam algum tipo de fenômeno óptico produzido pelo contato entre o analito e o biorreceptor. Entre os fenômenos mais comuns estão refração, absorção, dispersão, fluorescência, fosforescência, quimiluminescência, ressonância de plasma de superfície ou uma simples mudança de cor, com os comprimentos de onda detectados nos dispositivos variando do infravermelho ao ultravioleta (CHEN *et al.*, 2020; HALILOVIĆ *et al.*, 2019). Eles possuem as vantagens de produzir menos ruído nos sinais gerados, não sofrer interferência eletromagnética (CHEN *et al.*, 2019) e, até mesmo, ser capaz de identificar mais de um analito simultaneamente, desde que cada um produza um sinal com um comprimento de onda diferente (HALILOVIĆ *et al.*, 2019). Existem dois tipos principais de biossensores ópticos (a) Fibra Óptica, (b) Ressonância Plasmática de Superfície (SPR) (YANG *et al.*, 2020). O biossensor de fibra óptica é um sistema de sensor derivado de fibra óptica que emprega um campo óptico, conhecido como campo evanescente, que é observado em fibras ópticas cônicas. Uma onda evanescente é produzida na interface da amostra quando a luz passa através de uma

fibra óptica como resultado da reflexão interna total. A onda evanescente pode ser usada para excitar a fluorescência na proximidade de uma superfície de detecção. Os sinais de transdução em biossensores de fibra óptica são baseados em pequenas mudanças no índice de refração devido à imobilização de biomoléculas ou reações de ligação entre biomoléculas específicas (MALHOTRA e ALI, 2018). Os biossensores baseados em SPR detectam a mudança no índice de refração causada pela interação molecular em uma superfície metálica por meio de ondas plasmônicas de superfície. De acordo com o fenômeno SPR, quando a luz polarizada ilumina uma superfície metálica na interface entre dois meios de índices de refração diferentes, em um determinado ângulo ela produz ondas de densidade de carga de elétrons chamadas *plasmons*. Com base na espessura da camada na superfície do metal, o fenômeno SPR resulta no declínio da intensidade da luz refletida em relação à luz incidente em um ângulo específico conhecido como ângulo de ressonância. A diminuição da intensidade é proporcional à massa na superfície (SOLAIMUTHU *et al.*, 2020).

Os biossensores piezoelétricos também são chamados de biossensores acústicos por empregarem ondas sonoras, produzidas pelo efeito piezoelétrico. Esse efeito é observado em alguns cristais anisotrópicos, como o quartzo, os quais possuem a capacidade de produzir uma diferença de potencial elétrico quando comprimido ou vice-versa. A deformação mecânica (oscilação) gerada por um potencial aplicado produz ondas sonoras e esse arranjo é empregado como um transdutor. A frequência de oscilação será proporcional à massa do sistema cristal/biorreceptor. Por exemplo, Rozmyslowicz *et al.* (2015) imobilizaram anticorpos em um cristal de quartzo para detectar uma proteína presente na superfície do vírus HIV. O sistema inicial anticorpo/cristal apresenta uma determinada frequência de oscilação. Quando os vírus se ligam aos anticorpos, a frequência diminui com o aumento da massa do sistema. Esses sensores são conhecidos como microbalanças de quartzo. Essas microbalanças têm sido usadas por vários anos não apenas em biossensores, porém não são adequados aos níveis cada vez maiores de miniaturização exigida. Dessa forma, o interesse pelo desenvolvimento de transdutores piezoelétricos microusinados (cristais com a superfície modificada) tem aumentado recentemente (POHANKA, 2017; LI *et al.*, 2016).

Os biossensores térmicos medem a energia absorvida ou liberada por uma reação bioquímica entre o analito e o biorreceptor (VASUKI *et al.*, 2019). Eles geralmente empregam enzimas e são chamados de termistores enzimáticos (PISOCHI *et al.*, 2013). Esses dispositivos medem a alteração da temperatura ocasionada por uma ou várias reações químicas quando o

analito entra em contato com o biorreceptor. A concentração do analito será proporcional ao calor absorvido ou gerado e será calculada pela entalpia conhecida da reação. Esse tipo de biossensor pode ser empregado quando existem várias reações em cadeia e não é possível analisá-las separadamente. Dessa forma, a soma das entalpias das reações envolvidas poderá ser calculada e através dela ser possível determinar a concentração da substância de interesse. A medição da temperatura é feita empregando termopares, que determinam a temperatura pela variação da resistência elétrica da solução analisada (YAKOVLEVA *et al.*, 2013).

2.1.2 Biossensores eletroquímicos enzimáticos

Especificamente, os biossensores amperométricos e voltamétricos são operados com um sistema de três eletrodos, que contém um biossensor como eletrodo de trabalho (WE) para reconhecimento do alvo, um contra-eletrodo como fonte de corrente e um eletrodo de referência para aplicar um potencial estável. O princípio de funcionamento destes biossensores é baseado em reações redox no sistema eletroquímico iniciadas por espécies eletroativas específicas. A reação redox ocorre na superfície do WE sob um potencial aplicado gerando sinais de corrente para quantificação do alvo. O potencial é regulado pelo eletrodo de referência e o circuito é completado pelo contra-eletrodo, no caso de sistemas com três eletrodos. A diferença entre as duas técnicas é o potencial aplicado, que é constante para medições amperométricas e variável para detecção voltamétrica. De acordo com os modos de alteração de potencial, este último pode ser realizado com diversas técnicas, incluindo voltametria cíclica, voltametria de pulso diferencial, voltametria de onda quadrada e voltametria de decaagem anódica (WU *et al.*, 2023).

Em biossensores enzimáticos, uma enzima específica do alvo (por exemplo, glicose oxidase (GOx), lactato oxidase ou uricase) é imobilizada no WE para catalisar a oxidação da molécula alvo (LABIB *et al.*, 2016).

Os biossensores eletroquímicos enzimáticos podem ser divididos por gerações. Na classificação mais comum, o aprimoramento das técnicas de transdução separa os dispositivos em 1ª, 2ª ou 3ª geração (BALAMURUGAN *et al.*, 2018; DAS *et al.*, 2016), sempre com o objetivo de sobrepor as desvantagens da geração anterior e promover uma melhor seletividade e maior limite de detecção do biossensor, como mostrado na Figura 4. Embora, ultimamente,

alguns artigos acrescentem mais duas gerações (MALIK *et al.*, 2023; SUMITHA E XAVIER *et al.*, 2023).

A primeira geração, como o biossensor de Clark em 1962, faz a medição da concentração de produtos e/ou reagentes. Uma das dificuldades nesses casos é a necessidade de o potencial aplicado ser bem maior do que o suficiente, levando a perda de especificidade do biossensor, além do fato de gases possuírem solubilidade baixa em soluções aquosas (BALAMURUGAN *et al.*, 2018; DAS *et al.*, 2016).

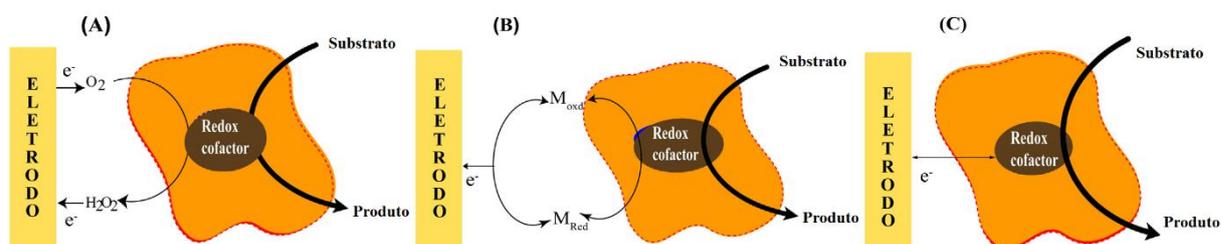


Figura 4. Mecanismos de resposta de diferentes gerações de biossensores enzimáticos amperométricos: (A) 1ª geração, onde substrato e/ou produto é usado como indicador redox; (B) 2ª geração, onde o mediador redox artificial é usado para retransmitir os elétrons; (C) 3ª geração, transferência direta de elétrons entre a enzima e o eletrodo (Fonte: DAS *et al.*, 2016).

A segunda geração de biossensores emprega mediadores redox entre a enzima e o eletrodo, ou seja, a reação promovida na enzima transfere elétrons para um “transportador de elétrons” e este para o eletrodo. O principal exemplo dessa geração de biossensores são os glicosímetros que empregam o método colorimétrico para a quantificação da glicose no sangue. O meio é incolor inicialmente e muda de cor à medida que é oxidado devido à reação da enzima glicose oxidase com a glicose presente no sangue. Os principais problemas enfrentados por essa geração são a lixiviação desse mediador na amostra onde ele pode ser solúvel e a difusão do mediador entre a enzima e a superfície eletrodo (BALAMURUGAN *et al.*, 2018; DAS *et al.*, 2016; PUTZBACH e RONKAINEN, 2013).

A terceira geração é baseada na transferência direta de elétrons do centro redox da enzima para o eletrodo. Assim, o biossensor pode trabalhar numa faixa de potencial muito próxima ao potencial da enzima, também não há reações intermediária que podem reagir com a amostra. As desvantagens são a perda da estrutura da enzima, ocasionada pela imobilização direta desta no eletrodo, e a cinética lenta de transferência de elétron geralmente observada, uma vez que, na maioria dos casos, o centro ativo da enzima está parte interna da enzima, longe

da superfície do eletrodo (BALAMURUGAN *et al.*, 2018; DAS *et al.*, 2016; PUTZBACH e RONKAINEN, 2013; ÇEVIK *et al.*, 2012).

Para os sensores de glicose, alguns pesquisadores estão considerando a quarta geração de biossensores como sendo aquela formada por sensores sem enzimas ou qualquer outro material biológico imobilizado, por exemplo em nanomateriais (METKAR *et al.*, 2019). Com os atuais biossensores, existem adversidades que devem ser contornadas, tais como, o controle de atividade da enzima imobilizada que deve ser feito para garantir resultados confiáveis, a inibição da enzima por mudanças de temperatura, umidade, contato com solventes, entre outras, além de toda a esterilização da linha de fabricação. O fim dessas desvantagens também acarretaria uma redução dos preços dos sensores mais modernos. O principal objetivo, entretanto, seria tornar a medição do nível de substâncias algo menos invasivo (HWANG *et al.*, 2018).

Apesar de os biossensores terem sido inventados na década de 1960, são poucos os biossensores que se tornaram um sucesso comercial, como o teste de gravidez e o glicosímetro, tendo este último dominado o mercado de biossensores desde a sua invenção (JIANG, 2019; BALAMURUGAN *et al.*, 2018). As principais características que um biossensor deve possuir para estar disponível comercialmente, na maioria das ocasiões, são a miniaturização, a análise automatizada, o baixo consumo de reagente, a demanda mínima de tempo e habilidades do usuário (ROTARIU *et al.*, 2016). Existem alguns fatores que impedem o avanço do número de biossensores disponíveis para a população. Entre os principais: produção de protótipos comercialmente viáveis com a partir das pesquisas realizadas; existência de um mercado para o biossensor desenvolvido; questões regulatórias complexas envolvidas principalmente na área da saúde e possivelmente em outras áreas; cooperação de pesquisadores de diferentes áreas; vantagens claras sobre os métodos já empregados (BHALLA *et al.*, 2016).

Um grande número de técnicas de fabricação de sensores e biossensores eletroquímicos tem sido relatado, incluindo modificação de eletrodo de pasta de carbono, deposição química de vapor, imersão, processo sol-gel, pirólise por spray, eletrodeposição, fotolitografia, impressão por contato, corte a laser (AMBAYE *et al.*, 2021) e tecnologias de eletrodos de impressão, que incluem a serigrafia (*screen printed*), impressão a jato de tinta e impressão 3D (KATSELI *et al.*, 2019). Aliado a isso, tem-se empregado nanomateriais, como nanopartículas metálicas, nanotubos de carbono e grafeno, adicionados à interface de biossensor para facilitar

a transferência de elétrons para aumentar a sensibilidade e diminuir o limite de detecção (MALIK *et al.*, 2023).

2.1.3 Eletrodo de pasta de carbono

O eletrodo de pasta de carbono foi inventado pelo professor Ralph N. Adams em 1958. Inicialmente, Adams e seu grupo de alunos desejavam obter um eletrodo alternativo ao eletrodo de gota pendente de mercúrio para aplicações onde o mercúrio não poderia ser empregado. Eles falharam com o eletrodo de gota pendente de carbono, mas perceberam que uma substância mais espessa, a pasta de carbono, poderia ser empregada. Assim, a primeira pasta de carbono foi feita da mistura de 1 g de grafite com 7 mL de bromofórmio. A segunda empregou tetracloreto de carbono ao invés de bromofórmio (ŠVANCARA *et al.*, 2012).

A pasta de carbono é constituída basicamente de dois componentes: carbono em pó (grafite) e um líquido orgânico, que serve como aglutinante e deve ser imiscível com soluções aquosas. Ambos devem possuir alta pureza. O líquido aglutinante fornece consistência à pasta de carbono e preenche os espaços entre as partículas de carbono. Por isso, deve ser quimicamente inerte, não pode ser solúvel em soluções aquosas e deve possuir baixa volatilidade. Podem ser empregados vários líquidos para esta função, como parafina, silicone ou outros materiais de carbono (SILVA, 2018). Os líquidos halogenados inicialmente empregados foram sendo substituídos por outros líquidos menos tóxicos e com disponibilidade melhor, como o óleo mineral comercial Nujol[®], que é um dos mais empregados (ŠVANCARA *et al.*, 2012).

Recentes avanços na detecção de dopamina por meio de eletrodos de pasta de carbono modificados têm oferecido informações valiosas para aplicações clínicas e farmacêuticas. No estudo de Liu *et al.* (2018b), um eletrodo de pasta de carbono modificado com óxido de grafeno reduzido e cloreto de poli(diallyl-dimetil-amônio) demonstrou boas sensibilidade e seletividade para a detecção de dopamina. Essa abordagem, integrada a um dispositivo microfluídico, permitiu a quantificação precisa de dopamina em amostras em volumes de microlitro, destacando seu potencial para monitoramento *in vivo*.

Outro trabalho relevante é o de Thomas *et al.* (2021), que empregou materiais perovskitas, como LaNiO₃, LaFeO₃ e LaCoO₃, na modificação de eletrodos de pasta de carbono. Esses materiais resultaram em eletrodos com alta área ativa e baixa resistência à

transferência de carga, proporcionando uma detecção de nanomolar de neurotransmissores, incluindo dopamina.

Dando ênfase a estratégias baseadas em enzimas, Bodur *et al.* (2021) desenvolveram um sistema de biossensor dienzimático utilizando acetilcolinesterase e colina oxidase em um eletrodo de pasta de carbono modificado com nanodots de carbono. Esse sensor permitiu a medição precisa de acetilcolina, um neurotransmissor associado à doença de Alzheimer.

Esses estudos destacam a diversidade de estratégias na modificação de eletrodos de pasta de carbono para a detecção de dopamina, proporcionando avanços significativos em sensibilidade, seletividade e aplicabilidade clínica.

2.1.4 Nanomateriais em biossensores eletroquímicos

Os materiais que possuem uma dimensão menor que 100 nm são chamados de nanomateriais (SHEIKHZADEH *et al.*, 2020; DARWESH *et al.*, 2019; PUTZBACH e RONKAINEN, 2013). Eles podem ser divididos em quatro grupos, de acordo com a matéria-prima empregada em suas sínteses: de carbono (grafeno, óxido de grafeno, nanotubos de carbono, fulereno), inorgânicos (metais, óxidos metálicos, semicondutores), orgânicos (polímeros, dendrímeros, micelas, lipossomas) e compósitos (combinação de um nanomaterial com outro nanomaterial ou qualquer material a granel) (SHEIKHZADEH *et al.*, 2020). Os nanomateriais também podem ser classificados de acordo com suas dimensões e formas. A Figura 5 mostra as diferentes formas e dimensões nas quais os nanomateriais podem ser sintetizados.



Figura 5. Diferentes formas de nanomateriais com diferentes dimensões utilizados na construção de biossensores (Fonte: Adaptado de MALIK *et al.*, 2023).

O desenvolvimento de biossensores tem sido muito impactado pela nanotecnologia nos últimos anos devido ao surgimento de inúmeros nanomateriais e suas ótimas propriedades elétricas, térmicas, químicas e ópticas (SHEIKHZADEH *et al.*, 2020; BHALLA *et al.*, 2016; ANSARI e HUSSEIN, 2012). Por isso que quase todos os biossensores desenvolvidos atualmente em pesquisas possuem algum nanomaterial em sua composição (CARNEIRO *et al.*, 2020), sendo os mais empregados as nanopartículas de metais nobres, nanoestruturas de carbono, nanoestruturas de materiais condutores, nanopartículas magnéticas e quantum dots (CARNEIRO *et al.*, 2020; FARZIN *et al.*, 2018).

Biossensores que empregam biomoléculas imobilizadas em nanomateriais possuem propriedades químicas e físicas muito vantajosas, tais como: aumento do número de moléculas imobilizadas devido a elevada área superficial, amplificação do sinal eletroquímico e estabilidade do sistema biomolécula-suporte (CARNEIRO *et al.*, 2020; AMINI e SHAMSIPUR *et al.*, 2019; ZHANG e WEI, 2016; PUTZBACH e RONKAINEN, 2013). Por exemplo, nanotubos de carbono e grafeno possuem alta razão área por peso (até $1000 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$), além de possuírem estruturas com poros de vários tamanhos (ZDARTA *et al.*, 2018).

Embora os nanomateriais exibam funções diferentes em esquemas de biodeteção eletroquímica de acordo com suas propriedades distintas, o papel básico dos nanomateriais pode ser geralmente categorizado da seguinte forma: (1) Suporte de imobilização para enzima; (2) Nanomateriais como mediador; (3) Nanomateriais como amplificador de sinal (BATOOL *et al.*, 2019).

A imobilização enzimática é uma parte importante da construção de biossensores eletroquímicos de alto desempenho. Numerosas abordagens foram consideradas para obter uma imobilização enzimática eficiente, que será discutido com mais detalhes no Tópico 2.2. A construção avançada de nanomateriais oferece possibilidades de modificação de propriedades, melhorando assim sua aplicação e também sua função na imobilização de enzimas.

A conexão elétrica entre as biomoléculas e a superfície do eletrodo é um parâmetro importante na montagem de biossensores eletroquímicos (HAYAT *et al.*, 2014). Num esforço para aumentar a taxa de transferência de elétrons entre a superfície do eletrodo e as biomoléculas, estão sendo utilizados nanomateriais metálicos que são capazes de aumentar a taxa de transferência de elétrons devido às suas propriedades metálicas. Os nanomateriais metálicos desempenham um papel significativo como mediadores na transferência de elétrons. O comportamento condutivo dos nanomateriais, bem como o arranjo entre proteínas e nanomateriais, está diretamente associado ao aumento da taxa de transferência de elétrons (XIAO *et al.*, 2003).

A amplificação de sinais com nanomateriais ganhou importância ao alcançar maior sensibilidade para detecção de analitos. No projeto de biossensores eletroquímicos, vários nanomateriais, incluindo nanomateriais de carbono, nanopartículas metálicas, semicondutores e nanomateriais de nanofios, foram incorporados como amplificadores de sinal eletroquímico (DING *et al.*, 2013). Os nanomateriais foram integrados para obter a ligação de enzimas na plataforma de transdução para melhorar o sinal de eventos de biorreconhecimento, bem como para garantir uma reação eletroquímica. Na amplificação de sinal, os nanomateriais são comumente usados como catalisadores para gerar um sinal eletroquímico para o alto carregamento de *tags* de sinal (BATOOL *et al.*, 2019).

2.1.4.1 Nanopartículas magnéticas (NPM)

As NPM do tipo mais empregado são sintetizadas a partir de óxido de ferro (II, III), muito devido às suas propriedades superparamagnéticas (são magnéticas apenas na presença de

um campo magnético externo) e biocompatibilidade com enzimas e anticorpos. Elas apresentam baixo custo de produção, fácil preparação e baixa toxicidade. Apresentam forma esférica e podem ser recobertas com quitosana. Após o revestimento com quitosana, o diâmetro máximo das partículas aumenta, devido à formação de agregados. Esse fenômeno pode ser atribuído a interações e intramoleculares das cadeias poliméricas, que contêm grupos amino e hidroxila (SAATCI E DELIORMANLI, 2023). Enzimas são imobilizadas em partículas magnéticas através das interações dos grupos amino, hidroxila e carboxila com a superfície das nanopartículas. Além disso, esse tipo de material possui elevada área superficial e pode ser separado pela aplicação de um campo magnético externo (SHEIKHZADEH *et al.*, 2020; HARRAD *et al.*, 2018; MOHAMED *et al.*, 2017).

Babadostu *et al.* (2014) e Li *et al.* (2012) construíram biossensores para detectar fenóis onde foi empregado óxido de ferro (Fe_3O_4) para a construção de nanopartículas. A enzima lacase foi imobilizada nestas partículas nos dois trabalhos. Partículas desse tipo são empregadas em alguns estudos para a criação de sensores eletroquímicos, como no trabalho realizado por Shabani *et al.* (2018), o que, somado às características descritas no parágrafo anterior, justifica sua aplicação no desenvolvimento de biossensores.

Çevik *et al.* (2012) construíram um biossensor para detectar compostos fenólicos (fenol, catecol, p-cresol, 2-aminofenol e pirogallol) onde foi empregado nanopartículas de óxido de ferro (Fe_3O_4) em sua construção para a imobilização de peroxidase.

Darwesh *et al.* (2019) e Mohamed *et al.* (2017) imobilizaram a enzima peroxidase em nanopartículas magnéticas de Fe_3O_4 e observaram o aumento da estabilidade da atividade enzimática ao longo do tempo e mediante alterações de pH e temperatura, além do reuso do suporte obtido (DARWESH *et al.*, 2019).

2.1.4.2 Nanotubos de titanato (NTT)

Nanotubos de titanato ($\text{H}_2\text{Ti}_3\text{O}_7$) são nanoestruturas tubulares ocas, compostas por 3 a 4 camadas, com um espaçamento aproximado de 0,4 nm e um diâmetro interno variando entre 4 a 5 nm (LIU *et al.*, 2019). Os NTT exibem desempenho eletroquímico muito bom, tornando-os altamente adequados para aplicações de biossensores. As características estruturais dos NTT, como sua alta área superficial, morfologia unidimensional e química superficial ajustável, contribuem para sua transferência de elétrons. Esses recursos desempenham um papel

fundamental no desenvolvimento de biossensores eletroquímicos sensíveis e seletivos (NICOLINI *et al.*, 2016).

A imobilização de enzimas em NTT tem sido realizada com sucesso em vários biossensores devido a sua boa biocompatibilidade, inércia química, rigidez, não toxicidade e alta hidrofiliabilidade (ZHAO *et al.*, 2015). Essas aplicações incluem detecção de glicose (ZHAO *et al.*, 2015; TANG *et al.*, 2014), colesterol (KOMATHI *et al.*, 2016) e peróxido de hidrogênio (NICOLINI *et al.*, 2016). A integração dos NTT com enzimas imobilizadas representa um avanço significativo no campo da tecnologia de biossensores, oferecendo soluções inovadoras para a detecção sensível e confiável de moléculas-alvo em contextos biológicos e ambientais diversos.

2.1.5 Aplicações recentes para biossensores eletroquímicos

Atualmente, os biossensores são majoritariamente empregados na área da saúde (ZHOU *et al.*, 2019), em aplicações como diagnósticos, tratamento e monitoramento de doenças, testes de gravidez e fertilidade, microrganismos causadores de doenças e marcadores (que são substâncias indicadoras de uma doença) em fluidos corporais, como sangue, urina e saliva (MOHANKUMAR *et al.*, 2021; BHALLA *et al.*, 2016). Eles podem ser utilizados por pacientes em suas próprias residências no acompanhamento de alguma doença sem a necessidade de treinamentos complexos ou no próprio local onde os pacientes estão sendo atendidos (sendo conhecidos como “*Point-of-Care*” nesses casos), uma vez que geram sinais em poucos segundos ou minutos. Também podem ser usados em áreas remotas e pesquisa em campos, por exemplo, já que são dispositivos pequenos e sem a necessidade de grandes fontes de energia. Por esses motivos, esses dispositivos estão mudando a forma de se realizar os diagnósticos biomédicos (BHALLA *et al.*, 2016; JIANG, 2019).

Os biossensores apresentam três principais vantagens em relação a outras técnicas: são extremamente simples, rápidos e portáteis (MAHMOUDPOUR *et al.*, 2019). Essas vantagens somadas a outras, como a alta especificidade e baixos limites de detecção, fazem com que esse tipo de sensor represente uma das mais proeminentes tecnologias para as análises de vários tipos e com inúmeras finalidades (CARNEIRO *et al.*, 2020; GATTANI *et al.*, 2019), tais como vírus (FARIA E ZUCOLOTTI, 2019; CHEN *et al.*, 2017), análise forense (YÁÑEZ-SEDEÑO *et al.*, 2014), monitoramento ambiental (DALKIRAN *et al.*, 2020; MAHMOUDPOUR 2019; JUSTINO *et al.*, 2017), detecção de contaminantes em alimentos (KURBANOGU *et al.*,

2020; BALAMURUGAN *et al.*, 2018), de alergênicos em alimentos (HOSU *et al.*, 2018), de armas biológicas (BAHADIR e SEZGINTÜRK, 2015), de explosivos (LIU *et al.*, 2019), de marcadores de câncer (KHANMOHAMMADI *et al.*, 2020), entre outras. Na Tabela 1, são apresentados alguns exemplos de estudos com biossensores que empregam diferentes transdutores e biorreceptores.

Tabela 1. Biossensores já construídos com diferentes tipos de biorreceptores e transdutores.

ANALITO	BIORRECEPTOR	TRANSDUTOR	REFERÊNCIA
Fenóis	Enzima	Eletroquímico	Camargo <i>et al.</i> , 2018
Zika Vírus	DNA	Eletroquímico	Faria e Zucolotto, 2019
Ebola Vírus	Anticorpo	Eletroquímico	Chen <i>et al.</i> , 2017
<i>Escherichia coli</i>	Vírus	Eletroquímico	Ertürk e Lood, 2018
Cd, As, Cr, Hg, Pb	<i>Escherichia coli</i>	Óptico	Wasito <i>et al.</i> , 2019
Biomarcadores de Sepsis	RNA	Óptico	Fabri-Faja <i>et al.</i> , 2019
Biomarcadores de Câncer de Mama	Anticorpo	Piezoelétrico	Arif <i>et al.</i> , 2015

Muitos trabalhos já foram realizados para a determinação de fenóis empregando biossensores enzimáticos, grande parte empregando a enzima peroxidase: Chekin *et al.* (2015), fármaco para a doença de Parkinson; Wu *et al.* (2016), antioxidantes alimentícios; Vilian *et al.*, (2017), bisfenol; Ribeiro *et al.* (2013), dopamina; Rotariu *et al.* (2016), 2-clorofenol.

2.2 Enzimas

Do ponto de vista químico, uma enzima é uma macromolécula que age como catalisador (LIESE e HILTERHAUS, 2013). Com exceção de um pequeno grupo de moléculas de RNA, as riboenzimas, todas as outras enzimas são proteínas (BHAKTA *et al.*, 2015) e atualmente são conhecidas cerca de 2000 enzimas (KURBANOGU *et al.*, 2020). As enzimas, como qualquer proteína, têm pesos moleculares grandes, variando de cerca de 12.000 a mais de um milhão de unidades de massa atômica e são formadas por uma sequência de aminoácidos (estrutura primária), que arranjada em estrutura tridimensional formam a estrutura secundária (as mais comuns, hélice α ou conformações β). O dobramento da estrutura secundária dá origem a forma da proteína (estrutura terciária). A estrutura quaternária corresponde a duas ou mais cadeias polipeptídicas, idênticas ou não, que se agrupam e se ajustam para formar a estrutura total da

proteína. Mais de uma dessas estruturas terciárias, idênticas ou não, podem ser agrupadas originando a estrutura quaternária da proteína (KURBANOGLU *et al.*, 2020; BHAKTA *et al.*, 2015; NELSON e FOX, 2014).

Em 1897, Eduard Buchner mostrou que extratos de levedura podiam formar etanol a partir de açúcar, provando que a catálise era feita por moléculas que podiam ser extraídas das células. Anos depois, Frederick W. Kühne nomeou estas moléculas de *enzimas*. Em 1926, James Sumner cristalizou a enzima urease e descobriu que ela era constituída totalmente de proteína, sendo, dessa forma, o primeiro a postular que toda enzima é uma proteína, tendo ganhado o prêmio Nobel em 1947. J. B. S. Haldane supôs em seu postulado *Enzymes* (1930) que ligações fracas entre o substrato e a enzima poderiam ser usadas para a catálise, ideia que permanece até os dias atuais. No final do século XX, milhares de enzimas foram purificadas e tiveram suas estruturas e seus mecanismos de catálise descritos (KURBANOGLU *et al.*, 2020; NELSON e FOX, 2014).

As enzimas são classificadas de acordo com a reação de catálise que promovem. Cada enzima registrada possui um número de classificação (EC) composto de quatro grupos de números, separados por um ponto entre eles, de acordo com (SARROUH *et al.*, 2012):

- Classe;
- Subclasse;
- Grupos químicos específicos que participam da reação;
- A própria enzima.

A *International Union of Biochemistry and Molecular Biology* (IUBMB) classifica as enzimas nos seguintes grupos (KURBANOGLU *et al.*, 2020; BIOCHEMICAL NOMENCLATURE COMMITTEES, 2021):

1. Oxirredutases: neste grupo estão as enzimas que catalisam reações de oxirredução. O substrato oxidado é chamado de doador de elétrons ou hidrogênio. Quando a molécula aceitadora é o O₂, a enzima é chamada oxidase. Esta classe possui 24 subclasses;
2. Transferases: enzimas que transferem grupos funcionais de uma molécula (doador) a outra (aceitador). Esta classe possui 10 subclasses;
3. Hidrolases: participam da hidrólise de ligações orgânicas C-O, C-N, C-C e algumas outras, como ligações de anidridos fosfóricos. Esta classe possui 13 subclasses;
4. Liases: quebram ligações C-C, C-O, C-N por eliminação, formando ligações duplas ou anéis, ou também adicionando grupos a ligações duplas. Esta classe possui 8 subclasses;

5. Isomerasas: enzimas que promovem alterações dentro de uma molécula que podem ser de natureza geométrica ou estrutural. Esta classe possui 6 subclasses;
6. Ligases: enzimas que catalisam a junção de duas moléculas. Os termos “sintase” e “carboxilase” são empregados em alguns casos. Esta classe possui 6 subclasses;
7. Translocases: são enzimas que transportam íons ou moléculas através de membranas celulares.

O poder catalítico e a seletividade das enzimas podem ser explicados em duas partes: rearranjo de ligações covalentes e interações não covalentes. A primeira explica que ligações covalentes transitórias entre grupos funcionais enzimáticos e substrato são formadas no sítio ativo da enzima, ativando o substrato para a reação. Essas interações transitórias diminuem a energia de ativação necessária, aumentando a velocidade da reação (NELSON e FOX, 2014). A segunda explicação diz que boa parte da energia necessária para diminuir a energia de ativação é proveniente de interações fracas não covalentes entre substrato e enzima. Essa explicação pode ser dividida em dois princípios inter-relacionados (NELSON e FOX, 2014):

1. O poder catalítico das enzimas provém basicamente da energia livre liberada na formação de muitas ligações fracas e interações entre a enzima e seu substrato. Essa energia de ligação contribui tanto para a especificidade como também para a catálise.
2. Interações fracas são otimizadas no estado de transição da reação. Os sítios ativos das enzimas são complementares não aos substratos por si mesmos, mas aos estados de transição pelos quais os substratos passam ao serem convertidos em produtos durante a reação enzimática.

Enzimas têm sido empregadas pelo ser humano há milênios na fabricação de queijos, iogurte e vinho, por exemplo. Atualmente o uso dessa classe de moléculas não se restringe apenas ao ramo de bebidas e alimentos. Por exemplo, as enzimas lipases estão presentes na fabricação de biodiesel, nas indústrias de detergente, de papel de celulose, farmacêutica, além das tradicionais de laticínios e panificação (RENGE *et al.*, 2012). As principais enzimas de uso industrial são as proteases, amilases, lactases, pectinases, celulasas, pectinases, oxirredutases, lipases e xilanases. As proteases representam 60% do mercado de enzimas, tendo sua aplicabilidade desde o processamento de couro, amaciamento de carne, formulação de remédios

até na indústria alimentícia. As amilases vêm em seguida movimentando 30% do mercado global (SOUZA, 2012).

As enzimas catalisam a produção de produtos com alta pureza na maioria dos casos, minimizando a geração de resíduos. Por isso, são atraentes para fins industriais, além de sua alta seletividade e eficiência na bioconversão substrato-produto (SARROUH *et al.*, 2012).

Com o rápido desenvolvimento tecnológico das últimas décadas, as enzimas passaram a desempenhar um importante papel na biotecnologia, já que são uma das principais classes de substâncias existentes. Por serem excelentes moléculas de biorreconhecimento, são empregadas em biossensores eletroquímicos, baseando-se na detecção de um sinal elétrico produzido por uma espécie química produzida ou consumida na reação enzimática. Peroxidase, lacase e tirosinase são alguns dos principais exemplos de enzimas oxirredutoras usadas no desenvolvimento de biossensores eletroquímicos (ROTARIU *et al.*, 2016; PUTZBACH E RONKAINEN, 2013).

2.2.1 Peroxidase

A atividade da peroxidase (EC 1.11.1.x) foi observada e descrita primeiramente em 1855. O termo *peroxidase* foi usado pela primeira vez em 1898 por Linossier (JUAREZ-MORENO *et al.*, 2015; AZEVEDO *et al.*, 2003) e hoje se refere a um grupo de enzimas, tais como: NADH peroxidase, glutathiona peroxidase, iodeto peroxidase, entre outras, que são oxirredutases que catalisam a redução de peróxidos e a oxidação de um grande número de compostos de origem orgânica ou inorgânica. Elas podem conter grupo heme ou não e são divididas de acordo com sua origem em quatro classes: vegetais, fúngicas, bacterianas e de origem animal. O peso molecular dessas enzimas varia entre 30 mil e 150 mil Da. Desempenham um importante papel nos seres vivos. Nas plantas, pertencem à mecanismos de defesa de células infectadas e, nos animais, elimina o peróxido de hidrogênio das células (AMINI E SHAMSIPUR *et al.*, 2019; HAMID e KHALIL-UR-REHMAN, 2009; SCHMIDT, 2008).

As peroxidases catalisam a oxidação de diversas substâncias orgânicas e inorgânicas (FRITZKE *et al.*, 2020), principalmente fenóis (ROTARIU *et al.*, 2016). Devido ao fato de catalisar reações redox para vários tipos de substratos, a peroxidase se tornou uma das enzimas mais presentes na literatura, sendo empregada em estudos para inúmeras finalidades, desde

aplicações biotecnológicas até industriais (BILAL *et al.*, 2018). É aplicada no desenvolvimento de produtos para a remoção de contaminantes de fontes de água, atuando como catalisador na degradação de fenóis (GARG *et al.*, 2020; MOUSSAVI e HADDAD, 2019; SILVA *et al.*, 2018), medicamentos (AL-DHABI *et al.*, 2020), corantes (BARBOSA *et al.*, 2020; FRITZKE *et al.*, 2020; QAYYUM *et al.*, 2020; DARWESH *et al.*, 2019), toxinas (GARCIA *et al.*, 2018) e outros contaminantes hídricos (MOUSSAVI e HADDAD, 2019; KUMAR e CHANDRA, 2018). Também está presente na síntese de polímeros (JIN *et al.*, 2020; HU *et al.*, 2020; LI *et al.*, 2019; AN *et al.*, 2010) e principalmente na elaboração de biossensores (JIANG *et al.*, 2020; CHEN *et al.*, 2020; BARBOSA *et al.*, 2020; DALKIRAN, 2020; TANG *et al.*, 2018; NEELAM *et al.*, 2019).

O esquema simplificado abaixo (Figura 6) mostra o mecanismo de reação da peroxidase na presença de peróxido de hidrogênio e do substrato doador de elétrons (S). Na primeira etapa (a), o átomo de ferro do grupo heme é oxidado pelo peróxido com a perda de dois elétrons, formando o Composto I, o qual consiste do ferro oxiferril ($O=Fe^{4+}$) e o radical protoporfirina (R^+). Na segunda etapa (b), o Composto I oxida uma molécula do substrato doador de elétrons (S) e passa a ser denominado Composto II. Na terceira etapa, a etapa anterior se repete com outra molécula doadora de elétrons sendo oxidada, fazendo com que a enzima retorne ao estado inicial. Compostos fenólicos são oxidados a radicais livres nas etapas (b) e (c) (BOLLELLA *et al.*, 2018; HAMID e KHALIL-UR-REHMAN, 2009; OLIVEIRA, 2007).

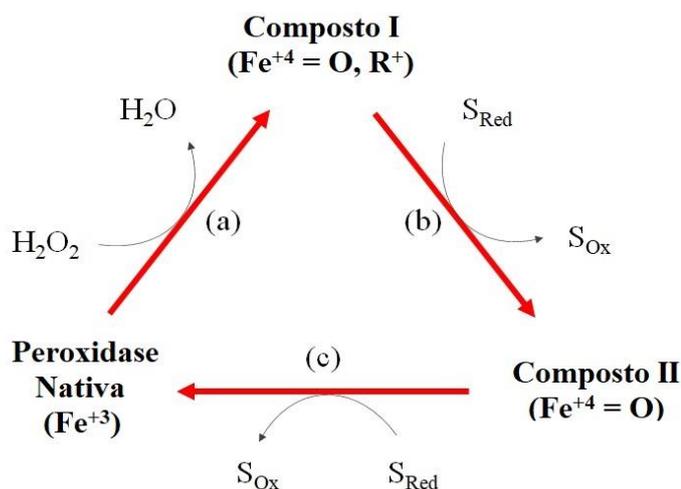


Figura 6. Ciclo catalítico da enzima peroxidase, onde R^+ = radical protoporfirina, S_{red} = substrato doador de elétrons reduzido, S_{ox} = substrato doador de elétrons oxidado (Fonte: Elaboração própria a partir de dados de BOLLELLA *et al.*, 2018; HAMID e KHALIL-UR-REHMAN, 2009; OLIVEIRA, 2007).

As peroxidases que não carregam grupo heme em sua estrutura possuem uma molécula do aminoácido cisteína em seu centro ativo. Esta cisteína é oxidada por uma molécula de peróxido de hidrogênio. O intermediário oxidado forma uma ligação com outra cisteína, este segundo intermediário é, então, reduzido pelo substrato (AMINI E SHAMSIPUR *et al.*, 2019; SCHMIDT, 2008).

Na maioria dos estudos, a atividade da peroxidase é medida pela reação entre guaiacol e peróxido de hidrogênio na presença de solução de peroxidase comercial ou um extrato bruto de algum vegetal. O produto formado é o tetraguaiacol, uma substância marrom alaranjada que absorve a luz em 470 nm, conforme reação mostrada na Figura 7. A absorbância do tetraguaiacol formado fornece a atividade da enzima em unidades por mililitro (U mL^{-1}) (OZTEKIN *et al.*, 2019; MOHAMED *et al.*, 2017).

A principal desvantagem de ser usar a peroxidase a nível industrial é a perda de atividade enzimática a longo prazo quando o meio reacional não possui o substrato a ser reduzido, mas possui peróxido de hidrogênio (JUAREZ-MORENO *et al.*, 2015). Para tornar mais favorável a utilização de enzimas em processos biotecnológicos, diferentes métodos de redução de custos têm sido colocados em prática, um dos quais é a imobilização (MOHAMAD *et al.*, 2015).

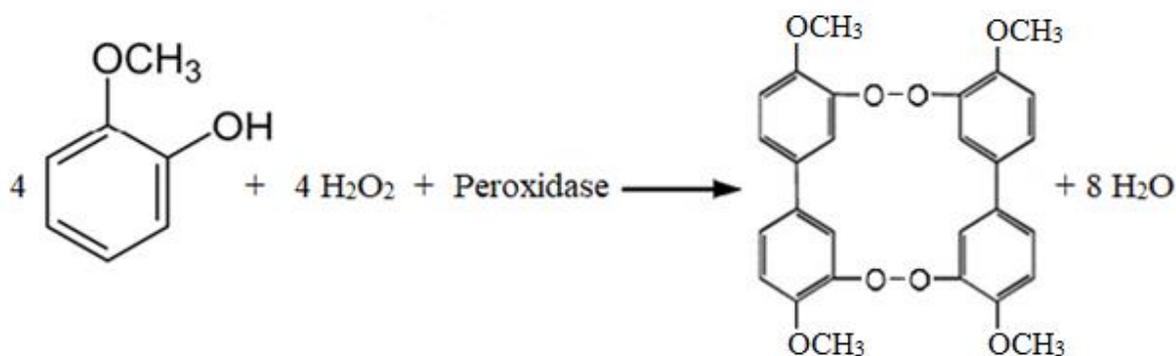


Figura 7. Reação de formação de tetraguaiacol empregando peroxidase como catalisador (Fonte: De autoria própria).

Na revisão de Oliveira *et al.* (2021) é feita uma extensa pesquisa sobre trabalhos que descrevem a extração de peroxidase de diversas fontes vegetais. Em quase a totalidade dos casos, a solução de extração foi tampão fosfato (de sódio ou potássio) e em menor número, o tampão tris-HCl. A metodologia de preparo do extrato se inicia com a homogeneização de 1 g de vegetal com 1 a 10 mL da solução de extração. Após a homogeneização, são realizadas a filtração e a centrifugação. Em poucos trabalhos é aplicado aquecimento, com a maioria

centrifugando o filtrado a 4 °C. Em alguns trabalhos, o extrato é empregado sem etapas posteriores de purificação e, na maioria, o sobrenadante do extrato centrifugado passa por purificação que pode ser de diferentes formas: precipitação com acetona e sulfato de amônio, colunas de troca iônica positiva e negativa e colunas de sílica Sephadex.

2.2.2 Extrato vegetal como fonte de Peroxidases

A forma de obtenção de enzimas que apresenta maior interesse pela indústria é a microbiana, pois dessa forma são mais facilmente produzidas em larga escala e possuem custos menores, embora as enzimas de origem vegetal ou animal sejam as mais estudadas (SOUZA, 2012). Novas fontes de enzimas têm sido estudadas para aplicações em biotecnologia, uma vez que tecidos vegetais podem apresentar propriedades bioquímicas que se adequam melhor em algumas aplicações (CENTENO *et al.*, 2017). Por esses motivos e devido a menores custos, já foram estudados muitos vegetais como alternativa às enzimas comerciais. Por exemplo, em diversos estudos já foram empregados os seguintes vegetais como fonte de peroxidase: fibra de coco (KOZAN *et al.*, 2010); nabo, repolho, rabanete, tomate (RATHNAMSAMY *et al.*, 2014), caule e folhas de couve-flor (DEVA *et al.*, 2014), farelo de soja e farelo de arroz (GOLUNSKI *et al.*, 2015), casca de tangerina (NOUREN, *et al.*, 2013), alface, brócolis, palmeira real, soja, mamão, berinjela, limão (PANDEY *et al.*, 2017).

A principal fonte de peroxidase comercial (HRP) é a raiz-forte (*Armoracia rusticana*) (VETAL e RATHOD, 2015), que geralmente é cultivada em países de clima frio (SILVA, 2012). Na construção de biossensores, a peroxidase comercial é a enzima mais empregada na área de análise eletroquímica (ZHANG e WEI, 2016). Porém, o seu alto custo faz com que muitos pesquisadores busquem alternativas como fonte desta enzima (FRITZKE *et al.*, 2020; VETAL e RATHOD, 2015). Por esse motivo, nos últimos anos, é crescente a tendência de empregar extratos brutos ou tecidos vegetais como fonte enzimática. Esse procedimento é muito mais barato do que as enzimas purificadas disponíveis no mercado, além de ser mais simples e proporcionar uma estabilidade maior da enzima devido à presença das substâncias naturalmente presente na fonte vegetal empregada (OLIVEIRA *et al.*, 2012). Uma desvantagem existente no uso de extratos é a que a seletividade do método analítico pode diminuir em alguns casos. Outra desvantagem é a presença dos componentes naturais do extrato vegetal, que podem interferir nas análises (POLESEL *et al.*, 2010).

2.2.2.1 Maxixe

O maxixe (*Cucumis anguria* L.) é uma hortaliça pertencente à família *cucurbitaceae*. Seus frutos são verdes claros ovalados, com comprimento de 5 a 7 cm e diâmetro de 3 a 4 cm, recobertos por espinhos moles e não pontiagudos. São consumidos como cozidos, fritos e fresco em saladas. (REIS *et al.*, 2015). A planta é rasteira (trepadeira) com caule ramificado, anguloso e áspero. Suas folhas têm comprimento entre 8 e 10 cm. As sementes são achatadas numerosas e desprovidas de endosperma, como visto na Figura 8 (MATTOS, 2016).



Figura 8. Maxixe. (Fonte: BRANCO, 2017)

Nativo do continente africano, onde se encontra na África Tropical Oriental, na África Tropical Centro-Oeste, na África Tropical do Sul e na África do Sul, adaptou-se muito bem a outros continentes e é cultivado também no Caribe, na Índia, na América Central e na América no Sul (USDA, 2019). No Brasil, as regiões principais de seu cultivo são a Norte e a Nordeste por causa do clima. Como o maxixe é uma espécie de clima quente, é muito sensível a temperaturas baixas e geadas, deve ser cultivado de preferência durante a época quente do ano, quando apresenta e ciclo de aproximadamente 70 dias, suporta altas temperaturas e pluviosidades. A planta prefere solos arenosos ou arenoargilosos, com o valor de pH destes variando entre 5,0 e 6,0 (REIS *et al.*, 2015; MATTOS, 2016).

O maxixe está sujeito a perdas de produtividade e qualidade dos frutos em função do parasitismo de vários microrganismos – vírus, fungos, bactérias e nematoides. Ainda assim é considerado uma hortaliça bastante resistente a doenças e ataques de pragas (REIS *et al.*, 2015).

Até o presente momento, não há relatado na literatura nenhuma extração de peroxidase empregando o maxixe como fonte.

2.2.2 Imobilização de enzimas

A imobilização de enzimas é o processo de fixação de moléculas de enzimas em um substrato sólido, com exceção da metodologia de ligação cruzada. A enzima imobilizada tem seu movimento restrito a uma região estreitamente definida, protegendo-a contra degradação e desativação, diminuindo o custo global das atividades mediadas por enzimas através do reaproveitamento das enzimas, podendo aumentar a estabilidade enzimática e atividade. Esta técnica também é utilizada em biotransformações, aplicações bioanalíticas, indústrias farmacêuticas, de diagnóstico, alimentícias e têxteis, construção de biossensores, dentre outras (ATTIQUE *et al.*, 2013). A imobilização de uma biomolécula na superfície de um material é uma das etapas cruciais na construção de um biossensor para garantir a estabilidade operacional a longo prazo (CARNEIRO *et al.*, 2020). Os parâmetros importantes da matriz de suporte para imobilização de enzimas incluem área superficial, tamanho de partícula, natureza orgânica ou inorgânica, carga superficial, hidrofobicidade e hidrofiliabilidade, funcionalização superficial, estabilidade química e mecânica e porosidade do material de suporte (SOUZA *et al.*, 2012). Desta forma, se faz muito importante a escolha adequada da técnica de imobilização.

Existem várias técnicas de imobilização enzimáticas, quase todas consistem em unir a enzima a um suporte sólido insolúvel no ambiente reacional, conforme apresentado na Figura 9. Os principais métodos de imobilização são adsorção, confinamento, ligação covalente e ligação cruzada (KURBANOGLU *et al.*, 2020; HARRAD *et al.*, 2018; RASHIDI *et al.*, 2018).

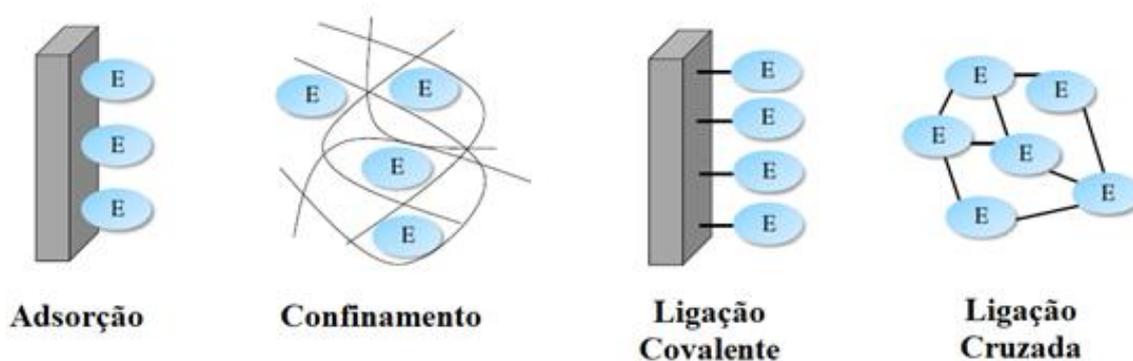


Figura 9. Diferentes métodos de imobilização enzimática.
(Fonte: Adaptado de SASSOLAS *et al.*, 2012)

Dessa forma, a enzima passa de uma forma homogênea (enzima livre) para uma heterogênea (enzima imobilizada). A finalidade da imobilização enzimática é obter um catalisador que pode ser empregado em processos contínuos, pode ser reutilizado e possui estabilidade de armazenamento e características otimizadas em relação à forma livre. As enzimas imobilizadas possuem resistência a solventes orgânicos, variação de pH, temperatura e pressão superior na maioria dos casos (ZDARTA *et al.*, 2018). Por esses motivos, a imobilização de enzimas é tão vantajosa para a indústria, resultando em produtos com custos de produção mais baixos, devido à facilidade no manuseio e na separação das enzimas da mistura reacional, um possível aumento na estabilidade e atividade enzimática, além da reutilização já mencionada (ANSARI e HUSEIN, 2012).

Enzimas podem ser imobilizadas desde em bagaço de cana-de-açúcar (QUEIROZ *et al.*, 2018) até em nanomateriais como nanotubos de carbono e *quantum dots*, por exemplo (FARZIN e ABDOOS, 2021). São empregados como suporte polímeros naturais (quitosana, celulose, polissacarídeos), polímeros sintéticos (poliacrilonitrila), sílicas, nanopartículas magnéticas, vidro poroso, óxidos (ferro, zinco, alumínio), materiais de carbono (nanotubos simples e multicamadas, grafeno, nanoesferas), entre outros (ZDARTA *et al.*, 2018). A seguir, são apresentados os principais métodos de imobilização.

2.2.2.1 Adsorção

Este método, o mais simples de todos, baseia-se em interação geralmente fraca entre o suporte sólido e a enzima, como forças de van der Waals, interações dipolo-dipolo e ligações de hidrogênio (CARNEIRO *et al.*, 2020; JESIONOWSKI *et al.*, 2014). Portanto, não há necessidade de modificação química da enzima, o que torna o método fácil, barato e reversível (KURBANOGU *et al.*, 2020). A ligação estabelecida é fraca e não altera a estrutura original da enzima na maioria dos casos. Com isso, o sítio ativo da enzima não sofre mudanças, mantendo a atividade enzimática. Estas razões tornam o método por adsorção o mais empregado para imobilização de enzimas (JESIONOWSKI *et al.*, 2014).

Muitos materiais podem ser aplicados para adsorção de enzimas, porém uma enzima não poderá ser imobilizada em qualquer suporte, existindo materiais mais adequados para cada tipo de enzima. A razão pela qual isso ocorre é que, para a adsorção da enzima ser eficiente, alguns requisitos devem ser atendidos. O principal é a existência de grupos ativos específicos

no material a ser empregado como suporte que produza afinidade deste com a enzima. Na ausência dessas interações, existem agentes que são empregados de forma a acrescentar grupos químicos na superfície do material, produzindo as interações necessárias para a imobilização (JESIONOWSKI *et al.*, 2014).

Quando o material de suporte possui carga elétrica, as enzimas devem ter cargas opostas para ocorrer a adsorção. A atração eletrostática pode ser facilmente conseguida pela alteração do pH do meio, observando-se o ponto isoelétrico do suporte e da enzima (GUISAN, 2013).

Na imobilização por adsorção, como as interações são fracas, as enzimas podem sofrer dessorção devido a mudanças de temperatura, pH, força iônica e fluidodinâmica. Portanto, enzimas imobilizadas por adsorção possuem menor estabilidade operacional e de armazenamento comparado com outras técnicas de imobilização (KURBANOGLU *et al.*, 2020; JESIONOWSKI *et al.*, 2014; SASSOLAS *et al.*, 2012). Além disso, para suportes carregados, podem ocorrer distorções e alterações na cinética da enzima (GUISAN, 2013).

2.2.2.2 Ligação Covalente

Este tipo de imobilização consiste em unir a enzima ao suporte através de ligações covalentes, de forma irreversível. Ao contrário da maioria dos outros tipos de imobilização, estas ligações são fortes, o que é a principal vantagem, e normalmente envolve vários aminoácidos da enzima, proporcionando uma rigidez na sua estrutura. Isto auxilia manter a estrutura da enzima inalterada mesmo quando esta fica exposta a solventes orgânicos e variações de temperatura e pH, entre outras circunstâncias, não sendo a enzima dessorvida do suporte (CARNEIRO *et al.*, 2020; KURBANOGLU *et al.*, 2020; SOUZA, 2016).

Os protocolos para a ligação covalente de enzimas ao suporte sólido geralmente se iniciam pela modificação da superfície do material a ser empregado como suporte, ativando-o. Isto é realizado com o emprego de reagentes de reticulação com grupos funcionais que produzem grupos reativos na superfície do suporte, como glutaraldeído, derivados de tiol e polímeros. Estes grupos produzidos reagirão com a enzima colocada em contato com o material ativado, após essa etapa o excesso da biomolécula é removido (CARNEIRO *et al.*, 2020; SOUZA, 2016; SASSOLAS *et al.*, 2012).

Apesar de seu importante desempenho como técnica de imobilização, a principal desvantagem desta técnica está no fato de as ligações covalentes poderem alterar a estrutura original da proteína ocasionando a inativação ou redução da atividade catalítica da enzima, caso

o sítio ativo seja modificado durante o processo (CARNEIRO *et al.*, 2020; KURBANOGLU *et al.*, 2020; SOUZA, 2016). Outras desvantagens são a difícil otimização das condições reacionais para promover as ligações covalentes entre a enzima e o suporte (SOUZA, 2016) e de geralmente esse método ser um processo caro (KURBANOGLU *et al.*, 2020).

2.2.2.3 Confinamento

A imobilização por confinamento (ou encapsulação, em alguns casos) envolve a síntese do polímero *in situ* em torno da enzima a ser imobilizada, de forma irreversível. Assim, a enzima é adicionada à mistura reacional e, conforme a polimerização ocorre, a enzima é confinada dentro da matriz polimérica que se forma em torno dela. Este método é útil para as enzimas que reagem moléculas pequenas de substratos e produtos e para estruturas poliméricas que não permitam a passagem da enzima para fora dos poros formados, apenas a difusão dos substratos e produtos (LIU *et al.*, 2018; SOUZA, 2016).

As vantagens são que na maioria dos procedimentos por confinamento não ocorre perda da atividade enzimática, uma vez que não há modificações na estrutura da enzima e a enzima é protegida dentro da matriz porosa, minimizando os efeitos de fatores que poderiam inativá-la, como, por exemplo, o contato com solventes orgânicos. Como desvantagens, pode-se citar o difícil controle dos tamanhos dos poros da matriz. Poros de tamanhos inadequados podem causar perda da enzima por dessorção ou bloqueia da difusão de substratos e produtos. Alguns tipos de reagentes empregados na síntese da matriz polimérica podem ocasionar a inativação das enzimas (LIU *et al.*, 2018; SOUZA, 2016).

2.2.2.4 Ligação Cruzada

Também chamada de reticulação, esse tipo de imobilização não emprega necessariamente um suporte sólido (KURBANOGLU *et al.*, 2020; SOUZA, 2016; CARVALHO *et al.*, 2015). Ela é realizada tanto para formar agregados enzimáticos em solução, como também para criar estruturas tridimensionais que envolvem a ligação de moléculas das enzimas entre si e com o suporte sólido, de forma irreversível. As moléculas de enzima reagem entre si na presença de um agente reticulante. A enzima também pode ser reticulada com outra proteína inerte. As vantagens desse método estão na forte ligação química formada entre as enzimas e a possibilidade do uso de mais de um tipo de enzima simultaneamente, formando um agregado com a capacidade de catalisar reações em cadeia. Ele também é indicado no uso de

solventes orgânicos de altas temperaturas. As desvantagens são a possibilidade de perdas de atividade enzimática devido à alteração na estrutura original da biomolécula (SOUZA, 2016; CARVALHO *et al.*, 2015), a necessidade de cristalização e o difícil controle das propriedades das estruturas produzidas (KURBANOGLU *et al.*, 2020).

2.3 Biossensores Eletroquímicos Empregando Enzimas Peroxidases

Biossensores de peroxidase são empregados nas análises de fenóis, com poucas exceções. Para este tipo de finalidade, também são empregadas as enzimas tirosinase e lacase, porém a peroxidase reage com um número maior de compostos e gera um sinal maior, o que promove uma sensibilidade maior nos biossensores com esta enzima (HERNÁNDEZ-CANCEL *et al.*, 2015). Os biossensores eletroquímicos enzimáticos podem ser empregados nas indústrias e são de extrema importância no desenvolvimento de novas técnicas para a detecção de compostos fenólicos tóxicos que podem ser encontrados na natureza. Esses compostos são originários de atividades agrícolas ou industriais, como agrotóxicos, detergentes e resíduos. Por esses motivos, a peroxidase se mostra a principal enzima para o emprego da detecção desses tipos de compostos (NEELAM *et al.*, 2019).

Já foram construídos biossensores empregando a peroxidase para a detecção dos seguintes analitos: bisfenol (VILIAN *et al.*, 2016), BHA e propilgalol (WU *et al.*, 2016), glifosato (OLIVEIRA *et al.*, 2012), hidroquinona (OLIVEIRA *et al.*, 2004), dopamina (RIBEIRO *et al.*, 2013), 2-clorofenol (ROTARIU *et al.*, 2016), octopamina, pirogalol, 3,4-dihidroxi-L-fenilalanina (CHEKIM *et al.*, 2015), ácido gálico, ácido clorogênico, ácido cafeico, substâncias presentes no chá verde, como (-)-epicatequina, (-)-galato de epicatequina, (+)-catequina, (-)-galocatequina (MELLO *et al.*, 2003), entre outros.

Como fonte de peroxidase para aplicação em biossensores, já foram empregados extratos de diversos vegetais, como: atemoia (OLIVEIRA *et al.*, 2012), abobrinha (RIBEIRO *et al.*, 2013), broto de feijão (MOCCELINI *et al.*, 2008), alfafa (FERNANDES *et al.*, 2012), alho (ICHI *et al.*, 2009), soja (TANG *et al.*, 2018), canola (RAMÍREZ *et al.*, 2011), capim mombaça (CENTENO *et al.*, 2017), gengibre, batata doce, inhame, abacate, jaca (OLIVEIRA *et al.*, 2004), entre outros.

Nos processos industriais e biotecnológicos, a utilização de extratos frequentemente se configura como a opção mais economicamente viável. Entretanto, uma desvantagem de

biossensores com enzimas de extratos é a possível vida útil mais curta em comparação àqueles que empregam enzimas purificadas e a presença de algum composto no extrato que cause uma interferência na análise. Outra desvantagem é a variabilidade dos vegetais devido ao clima, época e local do plantio, entre outros motivos (ROSA *et al.*, 2020; PUTZBACH E RONKAINEN, 2013).

A Tabela 2 apresenta alguns trabalhos presentes na literatura que empregaram NPM de óxido de ferro para construção de diversos biossensores para diferentes analitos.

Tabela 2. Biossensores eletroquímicos de peroxidase imobilizadas em NPM.

Eletrodo	Analito	LD ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Referência
NPM/HRP/Anticorpo CD63	Biomarcador para câncer hepático	-----	Chen <i>et al.</i> , 2020
ECV/NPM/AuNP-HRP	H ₂ O ₂	0,03	Wei <i>et al.</i> , 2011
EPT/NPM/OGR-HRP	H ₂ O ₂	-----	Waifalkar <i>et al.</i> , 2018
ECV/Ni-NPM	H ₂ O ₂	1,4	Yalçiner <i>et al.</i> , 2011
E Au/NPM-HRP	Fenol	2,44	Çevik <i>et al.</i> , 2012

LD = Limite de Detecção; PC = pasta de carbono; NTCPM = nanotubos de carbono de paredes múltiplas; NPP = nanopartículas peguizadas de poliuretano; HRP = peroxidase de *Armoracia rusticana*

Existe uma limitação de estudos que abordaram a imobilização da peroxidase em nanotubos de titânio. A Tabela 3 fornece de forma concisa um resumo dos trabalhos disponíveis na literatura sobre o assunto.

Tabela 3. Biossensores eletroquímicos de peroxidase imobilizadas em NTT.

Eletrodo	Analito	LD ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Referência
SPE/NTT-HRP	H ₂ O ₂	10,7	Ferraz <i>et al.</i> , 2016
PC/NTT-HRP	H ₂ O ₂	1,20	Nicolini <i>et al.</i> , 2016
NTT-HRP	H ₂ O ₂	0,100	Wu <i>et al.</i> , 2008
NTT-Bz-HRP	H ₂ O ₂	0,035	Sovic <i>et al.</i> , 2011
NTT-HRP-Th	H ₂ O ₂	-----	Xiao <i>et al.</i> , 2011
ECV/NTT/AuNP-HRP	H ₂ O ₂	2,20	Liu <i>et al.</i> , 2012

LD = Limite de Detecção; NTT = nanotubos de titanato; HRP = peroxidase de *Armoracia rusticana*; SPE = *eletrodo screen printe*; PC = pasta de carbono; Bz = benzoquinona; Th = Cloreto de tionila; ECV = eletrodo de carbono vítreo; AuNP = nanopartículas de ouro.

2.4 Dopamina

A dopamina (3,4-diidroxifeniletilamina) é uma molécula que desempenha funções importantes nos processos fisiológicos e bioquímicos humanos (LIU e LIU, 2021; DECARLI *et al.*, 2022; KONG *et al.*, 2018). Como neurotransmissor, atua no sistema nervoso central e periférico e está envolvido no aprendizado, movimento, memória, entre outras funções (SUHITO *et al.*, 2019). Ambas as concentrações no organismo, altas e baixas, estão associadas a doenças como hipertensão, insuficiência cardíaca, doença de Parkinson, esquizofrenia, doença de Alzheimer e depressão (LIU e LIU, 2021; DECARLI *et al.*, 2022; KONG *et al.*, 2018; RAOOF *et al.*, 2011).

Vários métodos analíticos foram relatados para a determinação de dopamina, como cromatografia líquida-espectrometria de massa em tandem, cromatografia líquida de alta eficiência, quimiluminescência, espectrofotometria e sensores colorimétricos (DECARLI *et al.*, 2022; SUHITO *et al.*, 2019). Entretanto, essas técnicas requerem profissionais bem habilitados, são dispendiosas e não rápidas, não permitindo a análise em tempo real da dopamina, o que atrapalha em alguns diagnósticos de problemas neurológicos. Métodos eletroquímicos (incluindo o emprego de biossensores) têm recebido muita atenção em pesquisas devido suas vantagens que suprimem as desvantagens das técnicas mencionadas acima (KONG *et al.*, 2018; SUHITO *et al.*, 2019).

As principais técnicas eletroanalíticas empregadas na determinação de dopamina são VOQ (DECARLI *et al.*, 2022; KONG *et al.*, 2018), voltametria de pulso diferencial (FLORESCU E DAVID, 2017; RAOOF *et al.*, 2011) e amperometria de potencial constante. (FOOLADSAZ *et al.*, 2011) A Figura 10 mostra o produto de oxidação da dopamina na superfície do eletrodo de trabalho nas técnicas eletroanalíticas (DECARLI *et al.*, 2022; KONG *et al.*, 2018; LIU e LIU, 2021).

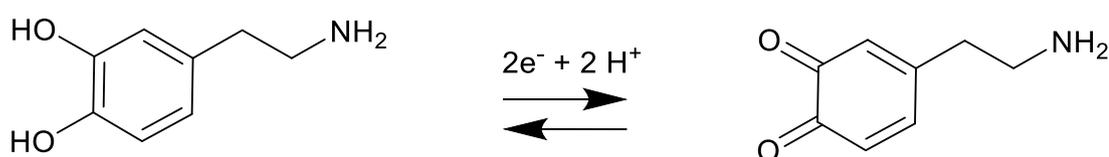


Figura 10. Estrutura da dopamina e dopamina oxidada. (Fonte: De autoria própria).

A detecção precisa da dopamina é essencial para a compreensão de doenças neurológicas e também para a avaliação da eficácia de terapias farmacológicas. O uso de biossensores descrito na literatura para a quantificação de dopamina empregam plasma humano, urina (SUHITO *et al.*, 2019; KONG *et al.*, 2018) ou produto farmacêutico como amostra (DECARLI *et al.*, 2022; FLORESCU E DAVID, 2017; FRITZEN-GARCIA *et al.*, 2013).

2.4.1 Detecção de Dopamina por Biossensores Eletroquímicos

A Tabela 4 compila diversos estudos relevantes na literatura dedicados à determinação da dopamina, proporcionando uma visão abrangente das estratégias adotadas para aprimorar a detecção dessa molécula. Observa-se uma ampla variedade de modificações em eletrodos de pasta de carbono, incluindo o emprego da enzima peroxidase em conjunto com nanotubos de titânio (NTT) e nanopartículas magnéticas (NPM).

Tabela 4. Comparação de biossensores eletroquímicos para determinação dopamina.

Eletrodo	Faixa Linear ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	LD ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Referência
PC / Lacase / Surfactantes zwitteriônicos	0,99 – 67,8	0,252	Decarli <i>et al.</i> , 2022
PC / Peroxidase de Abobrinha / NTCPM	32,0 – 44,0	2,0	Ribeiro <i>et al.</i> , 2013
PC / Peroxidase de <i>Araucaria Angustifolia</i> / NPP	9,9 - 1600	0,90	Fritzen-Garcia <i>et al.</i> , 2009
PC / HRP / NPP	17 - 1900	0,20	Fritzen-Garcia <i>et al.</i> , 2013
PC / Catalase / ZnO	5,0 - 31	3,0	Fooladsaz <i>et al.</i> , 2012
ECV/Arginina/NPM	10 – 1000	14,1	Chandra <i>et al.</i> , 2012
Eletrodo de Ouro / Tirosinase / Porfirina - Co (II)	2,0 - 30	0,43	Florescu e David, 2017
PC / Tecido de banana / NTCPM	10 - 30	2,09	Raof <i>et al.</i> , 2011

LD = Limite de Detecção; PC = pasta de carbono; NTCPM = nanotubos de carbono de paredes múltiplas; NPP = nanopartículas peguadas de poliuretano; HRP = peroxidase de *Armoracia rusticana*

2.5 Voltametria

A voltametria é um conjunto de técnicas eletroanalíticas nas quais ocorrem uma transferência de elétrons ou íons na interface de um eletrodo, devido a uma diferença de

potencial elétrico gerado externamente e controlado por um equipamento chamado de potenciostato. O sistema formado pela solução e eletrodos é denominado célula eletrolítica (MIRCESKI *et al.*, 2018).

A voltametria revolucionou as análises químicas e a primeira técnica voltamétrica foi a polarografia em meados de 1920. As técnicas eletroanalíticas podem ser utilizadas em muitas áreas de estudo, desde catálise enzimática, biossensores, conversão de energia solar, entre outros. As principais vantagens dessas técnicas em relação a espectroscopia e a cromatografia é a relação custo-benefício. Apesar destas duas técnicas apresentarem os menores limites de detecção e de quantificação, as técnicas eletroanalíticas apresentam boas sensibilidade, precisão e exatidão, que podem ser suficientes para determinadas aplicações. Houve uma grande evolução nas técnicas voltamétricas, o que permitiu seu emprego de forma muito mais fácil e útil do que quando foram criadas no início do século XX, principalmente devido à invenção do computador (CHEN e SHAH, 2013).

As células eletroquímicas empregadas em uma técnica de voltametria podem ser compostas de dois a quatro eletrodos, sendo mais comum o sistema com três eletrodos: o eletrodo de referência, o de trabalho e o contraeletrodo (ou auxiliar). O sistema com dois eletrodos apresenta dois inconvenientes: a corrente gerada passa pelo eletrodo de referência, o que pode gerar algum distúrbio em seu potencial, e a resistência elétrica em soluções não aquosas será elevada, aumentando a corrente que passa pelos eletrodos, modificando muito os resultados. Para solucionar esses problemas, foi adicionado o eletrodo auxiliar (platina, ouro etc.), que garante que não haja corrente passando pelo eletrodo de referência, apenas entre o eletrodo de trabalho e o auxiliar (PACHECO *et al.*, 2013).

O objetivo da voltametria é a análise qualitativa e/ou quantitativa de alguma espécie redox em solução. Na maioria dos casos, um pequeno volume de solução eletrolítica é suficiente para as análises e pequenas quantidades de reagentes são empregados, uma vez que as reações redox ocorrem apenas na interface eletrodo/eletrólito, com a composição química da solução praticamente não se alterando no decorrer do processo (MIRCESKI *et al.*, 2018).

Na Figura 11, é representado um esquema de uma célula eletrolítica padrão. O sistema é construído e a medição voltamétrica realizada de forma a fornecer informações sobre os fenômenos que ocorrem apenas na superfície do eletrodo de trabalho. Para isso, é aplicada uma diferença de potencial entre o eletrodo de trabalho e o eletrodo de referência, o que gera uma corrente elétrica apenas entre o eletrodo de trabalho e o eletrodo auxiliar. A magnitude desta

corrente é medida e fornece as informações sobre o analito. As reações que ocorrem no eletrodo auxiliar geralmente não influenciam no resultado da análise (MIRCESKI *et al.*, 2018; PACHECO *et al.*, 2013).

As técnicas voltamétricas mais comuns são baseadas na alteração contínua do potencial aplicado à solução e medição da corrente elétrica gerada. Podem ser de varredura, como a voltametria cíclica, que é uma técnica muito empregada, ou de pulso, como a voltametria de pulso diferencial, a voltametria de pulso normal e a voltametria de onda quadrada. Sendo as técnicas de pulso geralmente mais sensíveis (KURBANOGLU *et al.*, 2020; CHEN e SHAH, 2013). Em análises eletroquímicas com biossensores enzimáticos, as técnicas amperométricas são as mais empregadas (KURBANOGLU *et al.*, 2020).

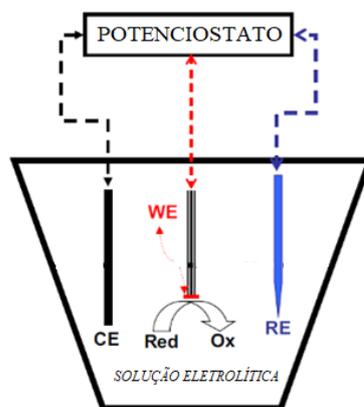


Figura 11. Esquema de uma célula voltamétrica.
(Fonte: MIRCESKI *et al.*, 2018)

Os eletrodos de trabalho inicialmente eram de mercúrio, porém sofreram muitas modificações, podendo ser de metais puros, ligas metálicas, materiais compostos, pastas etc. As modificações são realizadas de forma que aumente a sensibilidade, a seletividade e a estabilidade. Atualmente, os eletrodos de trabalho podem ser modificados de acordo com a finalidade da análise. Essa modificação pode ser permanente ou transitória e são muito realizadas no desenvolvimento de biossensores (PACHECO *et al.*, 2013).

Um tipo de eletrodo de trabalho muito empregado em pesquisas de biossensores são os eletrodos de pasta de carbono. Eles têm como uma das principais vantagens a possibilidade de uma alteração interna, o que não pode ser obtido na maioria dos eletrodos sólidos. O objetivo dessa modificação geralmente é construir um eletrodo mais sensível. Para realizar esta modificação, algum agente modificador é usado, como metais, enzimas, óxidos, entre outros

compostos orgânicos e inorgânicos (SILVA, 2018b). A pasta de carbono vem sendo empregada para a imobilização de enzimas, por estas aumentarem a seletividade e diminuírem o limite de detecção nas análises, uma vez que esse tipo de material permite uma transferência de elétrons eficiente entre a enzima e o eletrodo (SASSOLAS *et al.*, 2012; OLIVEIRA e VIEIRA, 2006). Pelos motivos acima descritos, eletrodos de pasta de carbono são versáteis, possuem a capacidade de ter a superfície renovada facilmente e são baratos (SASSOLAS *et al.*, 2012; OLIVEIRA e VIEIRA, 2006).

A voltametria cíclica (VC) e a Voltametria de Onda Quadrada (VOQ) são duas das principais técnicas eletroanalíticas empregadas em análises com biossensores.

2.5.1 Voltametria cíclica

A VC é a técnica de onda contínua mais comum, usada para determinar dados sobre o potencial redox de analitos em soluções. Apesar de não ser tão sensível quanto as técnicas de pulso, ela possui muitas utilidades, como analisar mecanismos de oxidação/redução, determinação de potenciais formais e cinética de transferência de elétrons (CHEN e SHAH, 2013). Nesta técnica, o potencial aplicado começa em um valor (V_1) e é aumentado a uma taxa constante até outro valor (V_2), sendo então diminuído até o valor inicial V_1 . Análises com diferentes taxas de varredura geralmente fornece resultados diferentes. O gráfico obtido é chamado de voltamograma, no qual é mostrada a corrente elétrica *versus* potencial elétrico. O aumento do potencial em direção ao potencial de redução do analito resultará em um aumento na corrente elétrica como visto na Figura 12 (NEELAM *et al.*, 2019).

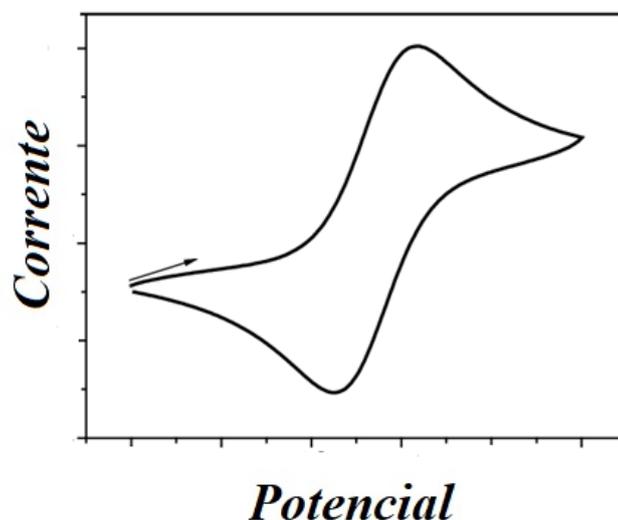


Figura 12. Modelo de Voltamograma cíclico.
(Fonte: FOGUEL *et al.*, 2008)

A VC é muito empregada em estudos sobre biossensores para a determinação de alguns parâmetros, como a corrente de pico catódica (I_{pc}) e a corrente de pico anódica (I_{pa}) (DAS *et al.*, 2016).

2.5.2 Voltametria de onda quadrada

A Voltametria de Onda Quadrada (VOQ) é uma das formas mais avançadas de técnica voltamétrica, devido à alta velocidade de análise e sensibilidade. O sinal gerado permite que ocorra momentaneamente uma oxidação e depois uma redução da espécie eletroativa na superfície do eletrodo, em cada uma das etapas da análise. Dessa forma, a VOQ é uma combinação de técnica de pulso com a voltametria cíclica. Apresenta menor sensibilidade quando empregada em reações lentas comparada a outras técnicas (MIRCESKI *et al.*, 2018).

A Figura 13 apresenta a explicação gráfica da técnica de voltametria de onda quadrada. Como toda técnica voltamétrica, a corrente é mensurada após a imposição de uma diferença de potencial. Na voltametria de onda quadrada, o potencial é aplicado no que se assemelha a degraus de uma escada (Figura 13b), a duração de cada passo é chamada de τ . Em cada um dos passos (Figura 13a), existem dois pulsos de durações idênticas, mas orientados de maneiras opostas. A altura de um pulso é chamada de amplitude de onda quadrada (E_{sw}). O potencial

aumenta a cada passo por um valor denominado incremento de varredura (ΔE). A duração de cada pulso é muito pequena, geralmente é expressa em termos de frequência, que é o inverso do tempo de duração ($f = \tau^{-1}$) (MIRCESKI *et al.*, 2018).

Os dois pulsos que são impostos em cada ciclo são chamados de pulso para frente (*forward*) e reverso (*reverse*), respectivamente. Ao fim de cada ciclo potencial, um componente das correntes anódicas (I_{for}) e catódicas (I_{rev}) correspondentes são medidas e refletem a mudança do equilíbrio redox no eletrodo de trabalho nas direções anódica e catódica, respectivamente. A soma em módulo de cada componente dessas correntes dá origem a duas curvas relativas aos pulsos para direto e reverso (Figura 13c). Uma terceira curva, chamada corrente resultante (I_{net}), é obtida pela subtração $I_{net} = I_{for} - I_{rev}$ (MIRCESKI *et al.*, 2018).

A VOQ tem sido muito empregada no desenvolvimento de sensores e biossensores eletroquímicos devido à alta sensibilidade da técnica (CHEN e SHAH, 2013). Entre as vantagens de biossensores que empregam a voltametria, destacam-se um tempo de resposta e limite de detecção menores (NEELAM *et al.*, 2019).

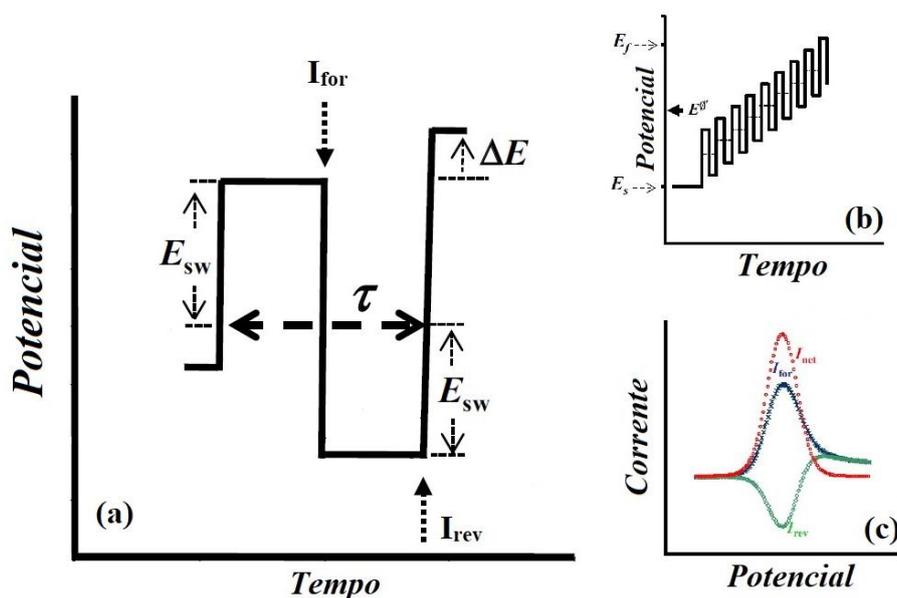


Figura 13. Gráficos da técnica de voltametria de onda quadrada. (a) ciclo de um único passo potencial; (b) a modulação potencial; (c) voltamograma típico. (Fonte: MIRCESKI *et al.*, 2018)

CAPÍTULO 3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Desenvolver um biossensor eletroquímico de pasta de carbono modificada com nanomateriais contendo extrato de maxixe como fonte de peroxidase (PMX) para detecção de dopamina.

3.2 Objetivos Específicos

- a. Obter um extrato de peroxidase a partir de vegetais selecionados e avaliar o mais propício para construção do biossensor;
- b. Avaliar o melhor pH de obtenção do extrato de maxixe como fonte de peroxidase;
- c. Imobilizar a PMX em nanotubos de titanato (NTT) e em nanopartículas magnéticas de Fe_3O_4 recobertas com quitosana (NPM);
- d. Construir biossensores de pasta de carbono modificada com NTT e NPM com extrato de maxixe como fonte de peroxidase e avaliar sua resposta eletroquímica para detecção de dopamina;
- e. Construir biossensor de pasta de carbono modificada com NTT contendo HRP comercial, para comparação com os biossensores com extrato de maxixe como fonte de peroxidase e avaliar sua resposta eletroquímica para detecção de dopamina;
- f. Determinar a concentração de dopamina em produto farmacêutico utilizando os biossensores desenvolvidos e comparar os resultados com o método padrão;

CAPÍTULO 4. EQUIPAMENTOS E METODOLOGIAS

4.1 Materiais e Reagentes

Para obtenção da enzima peroxidase usada na construção dos biossensores propostos, foram selecionados vários vegetais e determinada a atividade da enzima peroxidase. Os vegetais selecionados foram: maxixe (*Cucumis anguria*), couve-flor (*Brassica oleracea*), hortelã-pimenta (*Mentha x piperita*), boldo (*Peumus boldus*), polpa e casca de maracujá (*Passiflora edulis*), jabuticaba (*Myrciaria jaboticaba*), saião (*Kalanchoe brasiliensis*), jambo (*Syzygium jambos*), quiabo (*Abelmoschus esculentus*) e none (*Morinda citrifolia*). Feijão verde (*Phaseolus vulgaris*) e jiló (*Solanum gilo*) foram empregados para a comparação dos resultados obtidos, uma vez que esses vegetais já foram estudados em trabalhos anteriores de Fernandes (2007) e Oliveira (2006), respectivamente. Os vegetais foram obtidos nos mercados da cidade de Seropédica (RJ).

Para a preparação das soluções-tampão de fosfato, foram empregados fosfato monobásico anidro em pó (*Tedia*, 98%) e fosfato dibásico heptaidratado granular (*Tedia*, 98%). No preparo das soluções-tampão acetato/ácido acético, foram empregados acetato de sódio (*Sigma-Aldrich*, 99%) e ácido acético (*Tedia*, 99,7%). Nas soluções-tampão de bicarbonato de sódio, foi empregado bicarbonato de sódio em pó (*Isofar*, 99,7%). Para a medida do pH das soluções foi usado um medidor de pH Thermo Scientific Orion 4 Star.

Na determinação da atividade da peroxidase, foi empregado guaiacol (*Spectrum*, 99%), peróxido de hidrogênio (*Caledon* 30%) e o espectrofotômetro Shimadzu UV 1800 (EUA). A centrífuga refrigerada utilizada foi uma do modelo Eppendorf 5804 R.

A HRP comercial empregada foi obtida da Sigma Aldrich Tipo IV. A HRP liofilizada foi diluída em tampão PBS (Solução Tampão de fosfato) pH 6,0. A solução empregada na imobilização foi de 0,032 mg/mL.

Foram empregados filtros de seringa Millipore[®] de 0,45 e de 0,22 μm e filtro para centrífuga Centripep[®] de 3.000 Da de massa de corte.

Os NTT foram cedidos pelo Laboratório de Engenharia de Fenômenos de Interface (LABEFIT) do Programa de Engenharia Química (PEQ) da COPPE/UFRJ. O diâmetro médio apresentado pelos NTT é 50 nm e sua área superficial específica é de 118 $\text{m}^2 \text{g}^{-1}$, com

composição de 99,24% de TiO_2 (NICOLINI *et al.*, 2015). As NPM foram doadas pelo POLIMAT, Grupo de Estudos em Materiais Poliméricos do Departamento de Química da UFSC. As nanopartículas magnéticas recobertas com quitosana (NPM) possuem um diâmetro médio total de 38,3 nm, já considerando a cobertura com quitosana (MORAWSKI *et al.*, 2021).

O cloridrato de dopamina empregado foi adquirido da *Sigma-Aldrich* e as ampolas de dopamina (*Hipolabor*) foram obtidas por doação de um hospital da região.

As medições eletroquímicas foram realizadas em um potenciostato/galvanostato Autolab PGSTAT12 (Eco Chemie, Holanda). O eletrodo de referência empregado foi de Ag/AgCl (Figura 14a). Como eletrodo de trabalho, foi empregado um eletrodo comercial com a pasta de carbono sem e com modificação com extrato vegetal rico em peroxidase modificada (biossensor) (Figura 14b). O eletrodo auxiliar consistiu de uma placa de platina de 10 mm x 5 mm (Figura 14c). A célula sempre foi preenchida com 20 mL de solução a ser analisada.

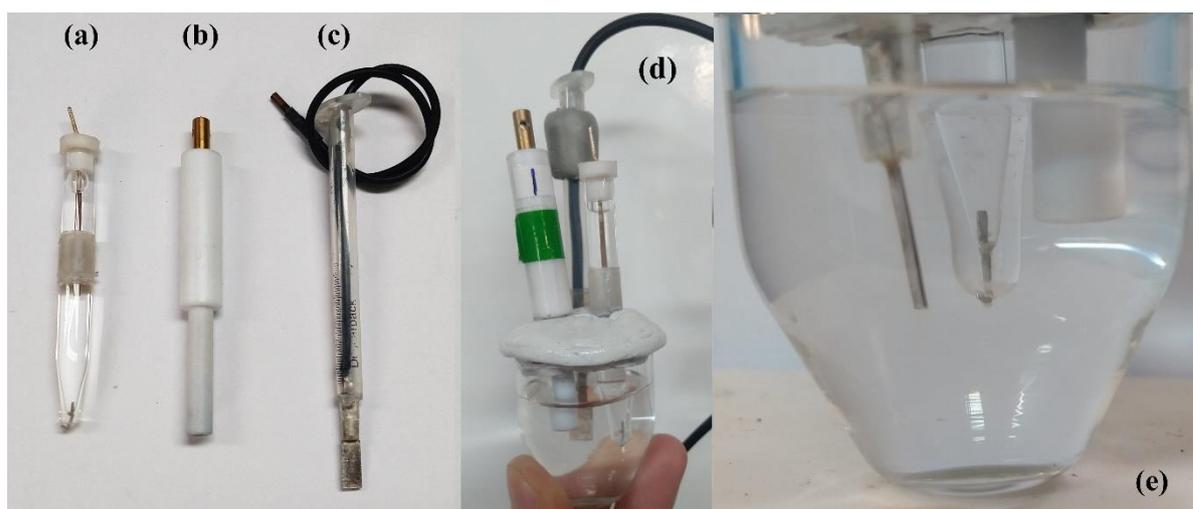


Figura 14. Eletrodos empregados nos experimentos voltamétricos: (a) eletrodo de referência de Ag/AgCl, (b) eletrodo de trabalho com pasta de carbono na extremidade, (c) eletrodo auxiliar de platina, (d) celinha de medição com eletrodos e (e) extremidades dos eletrodos dentro da celinha de medição. (Fonte: De autoria própria).

4.2 Preparação dos Extratos

Os extratos dos vegetais foram preparados misturando em um liquidificador 100 mL de solução-tampão de hidrogenofosfato/diidrogenofosfato 0,100 M pH 7,0 a 4 °C com 25 g do vegetal picado. O maxixe teve suas sementes descartadas.

A mistura foi homogeneizada por aproximadamente 1 minuto. Esse homogenato resultante foi filtrado com quatro camadas de gaze de algodão e recolhido em banho de gelo. O extrato filtrado na gaze foi colocado em um tubo falcon de 50 mL e centrifugado sob refrigeração a 4 °C por 10 minutos a 4600 g. O sobrenadante foi filtrado em filtros de seringa Millipore® de 0,45 e de 0,22 µm.



Figura 15. Esquema das etapas para obtenção dos extratos vegetais para avaliação da atividade da peroxidase presente. (Fonte: De autoria própria).

Para prosseguimento ao estudo de obtenção dos extratos, foi escolhido o vegetal maxixe. O extrato de maxixe obtido conforme Figura 15, chamado de EMX, foi empregado como fonte de peroxidase para a construção dos dois primeiros biossensores, com NTT (NTTP) e com NPM (NPMP).

Em seguida, 5 mL EMX foi centrifugado em um filtro Centriprep® de 3.000 Da de massa de corte, por 30 minutos. Desta forma, foram obtidos dois extratos: extrato filtrado (EMX-F) e o extrato retido (EMX-R). Estes filtrados foram empregados para construção dos biossensores com NTT, sendo o NTTP-F empregando o EMX-F e o NTTP-P empregando o EMX-P. Os extratos foram armazenados em congelador a -6 °C. A Figura 16 apresenta as etapas de preparo dos extratos e posterior preparo dos biossensores.

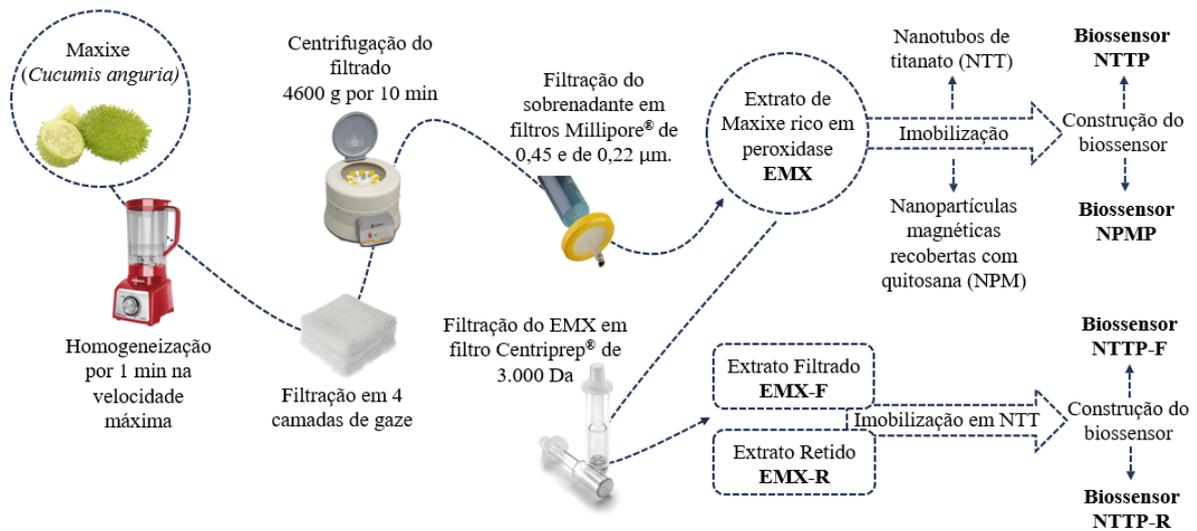


Figura 16. Etapas de obtenção dos extratos de maxixe para posterior preparo dos biossensores NTTP-R, NTTP-F e NTT-HRP. (Fonte: De autoria própria).

4.3 Determinação da Atividade da Peroxidase

Para a determinação da atividade enzimática, foi feita uma análise espectrofotométrica. Para a medida da absorbância do tetraguaicol, foram misturados, em uma cubeta de vidro, 0,200 mL do extrato ou solução de peroxidase, 2,700 mL de guaiacol 50,00 mmol L⁻¹ e 0,100 mL peróxido de hidrogênio 10,00 mmol L⁻¹. Assim que misturados os três componentes, o cronômetro foi acionado e a amostra começou a ser analisada. Uma medida foi realizada a cada 10 segundos por 2 minutos (FRITZEN-GARCIA *et al.*, 2013; RIBEIRO *et al.*, 2013; OLIVEIRA *et al.*, 2012; OLIVEIRA, 2007). A determinação foi feita em triplicata.

A atividade enzimática é definida como a quantidade de enzima que causa o aumento de 0,001 unidades de absorbância por minuto e foi determinada pela Equação 1 e é dada em unidades mL⁻¹.

$$A = \frac{\Delta abs. 1000}{\Delta t. V} \quad \text{Equação 1}$$

A = atividade da enzima em (U/mL)

ΔAbs = Variação da absorbância (470 nm)

V = Volume da solução de peroxidase (mL)

Δt = Variação do tempo (min)

Foi plotado um gráfico de tempo *versus* absorbância média, como mostra a Figura 17. Os pontos usados para o cálculo da variação da absorbância (ΔAbs) foram aqueles que formaram

uma reta. Os quatro primeiros pontos foram sempre empregados para se ter um padrão de escolha. Dessa forma foram usados os tempos de 40 e 10 segundos, e a variação de tempo empregada é igual a 0,5 min.

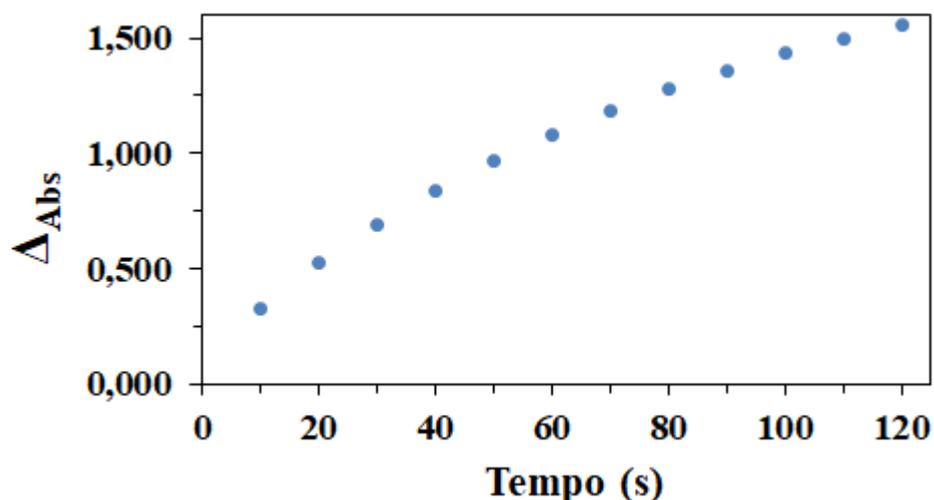


Figura 17. Exemplo de Gráfico de Tempo *versus* Absorbância média.
(Fonte: De autoria própria).

4.4 Estudo da Atividade da PMX no EMX

Após o maxixe apresentar os melhores valores para a atividade da peroxidase, foi realizado um estudo do valor da atividade enzimática em função do pH da solução tampão de fosfato 0,100 M e um estudo da estabilidade da peroxidase no extrato ao longo do tempo. A atividade enzimática do extrato pode ser afetada pelo pH da solução. Cada enzima tem uma faixa ótima e mudar o pH para um valor fora dessa faixa fará com que a atividade enzimática diminua. Valores extremos podem causar a desnaturação das enzimas. Sendo assim, investigou-se o efeito do pH na obtenção da peroxidase no extrato de maxixe.

4.4.1 Estudo do pH

Foram preparadas soluções-tampão em diferentes valores de pH, que variaram de 4,00 a 9,00, todas com concentração final de 0,100 M. As soluções com os valores de pH de 4,00, 4,50, 5,00 e 5,50 foram preparadas com ácido acético e acetato de sódio. As soluções com os valores de pH de 6,00, 6,50, 6,80, 6,90, 7,00, 7,10, 7,20 e 7,50 foram preparadas

hidrogenofosfato e diidrogenofosfato. As soluções com os valores de pH de 8,00, 8,50 e 9,00 foram preparadas com bicarbonato de sódio e carbonato de sódio.

4.4.2 Estudo da estabilidade no tempo

Todos os extratos e a solução de HRP tiveram sua atividade analisada por 4 semanas. A concentração da solução de HRP empregada foi de 0,032 mg/mL, necessária para se alcançar uma atividade enzimática próximas ao EMX-R e EMX-F. Os extratos e a solução de HRP foram armazenados sob refrigeração a -6 °C.

4.5 Eletroforese

A eletroforese foi realizada utilizando géis de corrida de poliacrilamida de 4 a 12% (SDS – Bolt™ Bis-Tris Plus Mini Protein Gels, 4-12% - 10-well). A eletroforese foi realizada para os extratos EMX-R e EMX-F.

4.6 Determinação da Massa Molecular da PMX com Coluna de Sílica Sephadex®

Foram realizadas cromatografia de exclusão molecular, também denominada de filtração em gel, para a determinação aproximada da massa molecular da PMX. Foram empregados três tipos de sílica-gel Sephadex®: G-25 (1.000 a 5.000 Da), G-50 (1.500 a 30.000 Da) e G-75 (3.000 a 80.000 Da). Foi empregado uma coluna com 22 cm de altura e 0,5 cm de diâmetro. A fase de eluição empregada foi PBS 0,1 mol/L com pH 7,0. O volume de EMX que passou pela coluna foi 0,200 mL, com uma atividade de 8850 U/mL. Alíquotas de 1 mL foram recolhidas ao final da coluna e suas atividades enzimáticas foram medidas.

4.7 Construção dos Biossensores

Na primeira parte desta tese, foram construídos dois biossensores: NTTP e NPMP, empregando o extrato de maxixe (EMX) como fonte de peroxidase. Ambos não empregaram a metodologia de lavagem das nanopartículas após a imobilização da peroxidase de maxixe a partir do extrato e esse extrato também não foi filtrado no filtro de centrífuga Centripep® com massa de corte de 3.000 Da.

O esquema das etapas de obtenção dos biossensores NTTP e NPMP estão descritas na Figura 18.



Figura 18. Etapas de obtenção dos Biossensores NTTP e NPMP.

Como os NTT se mostraram mais eficientes na construção de um biossensor eletroquímico, somente eles foram empregados na construção dos 3 biossensores posteriores, que empregou etapas adicionais no estudo e uso do EMX, que resultaram nos extratos EMX-R e EMX-F. O esquema resumido das etapas de obtenção dos biossensores NTTP-F e NTTP-R estão descritas na Figura 19.

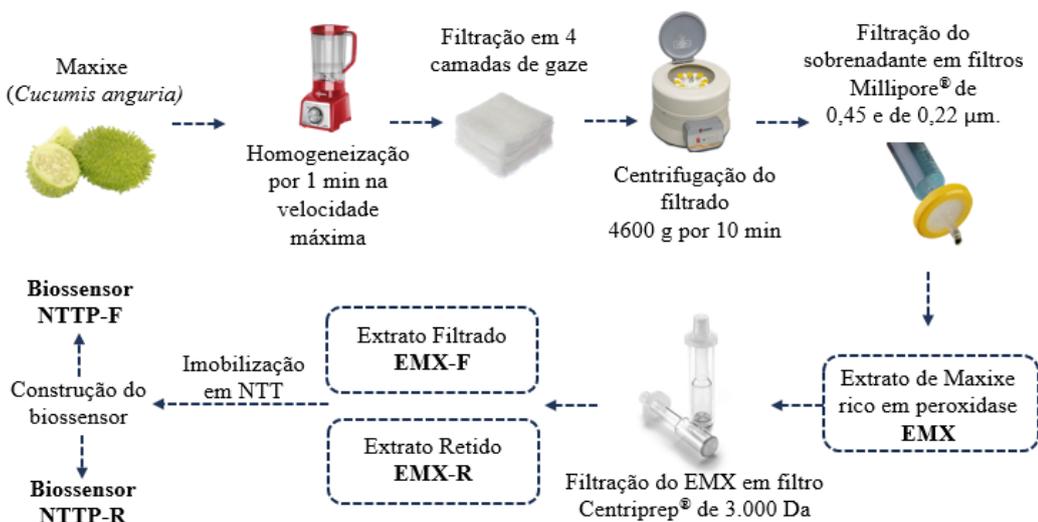


Figura 19. Etapas de obtenção dos Biossensores NTTP-F e NTTP-R.

4.7.1 Funcionalização dos NTT

Os NTT foram funcionalizados com (3-aminopropil)trimetoxisilano (APTMS) e glutaraldeído para melhor imobilização da enzima, por ligação covalente, conforme realizado por Nicolini *et al.* (2016) e mostrado na Figura 20.

Em um pequeno frasco de vidro, foram pesados 100,0 mg de NTT e adicionados 10,0 mL de diclorometano. O frasco foi colocado em banho de ultrassom por 20 min para dissipar os NTT. Em seguida, foi adicionado uma alíquota de 0,100 mL de APTMS e a mistura foi agitada com agitador magnético por 3 h. Após essa etapa, a mistura foi colocada em um tubo falcon de 15 mL e centrifugado por 2 min. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi lavado com 5 mL de diclorometano e centrifugado novamente. O processo se repetiu até serem feitas 4 lavagens. O precipitado da quinta centrifugação foi secado a 60 °C na estufa por cerca de 10 min em um vidro de relógio. Na 2ª etapa, esse sólido seco foi misturado, também em um frasco de vidro, com glutaraldeído 2,5% (preparado em tampão pH 7) na proporção de 10,0 mg de NTT para 500 µL de solução de glutaraldeído. A mistura foi colocada em banho de ultrassom por 20 min. Após esse tempo, a mistura foi agitada com agitador magnético por 1 h. Depois dessa etapa, a mistura foi colocada em um tubo falcon de 50 mL, completada por solução tampão 0,1 M, pH 7 até o volume de 30 mL e centrifugada por 2 min. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi lavado com 30 mL de tampão pH 7 e centrifugado novamente. O processo se repetiu até serem feitas 4 lavagens. Por último, o sólido obtido, de cor rosada, foi secado a 60 °C por cerca de 30 min. Os NTT funcionalizados foram empregados para a imobilização de peroxidase.

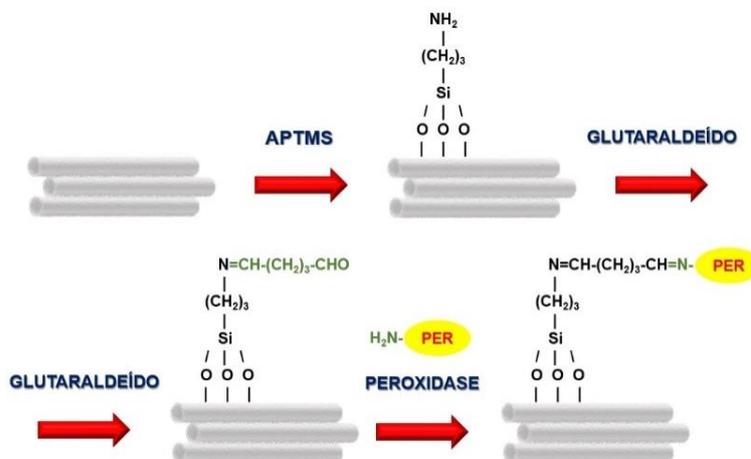


Figura 20. Esquema das etapas de funcionalização dos NTT seguidas da imobilização da peroxidase. Adaptado de SASSOLAS *et al.* (2012) e NICOLINI *et al.* (2015).

4.7.2 Imobilização da peroxidase nos NTT e nas NPM

As metodologias de imobilização descritas na literatura diferem um pouco entre si. Por esse motivo, duas metodologias foram empregadas: com a lavagem e sem a lavagem dos nanomateriais após a imobilização da PMX. Os biossensores NTT e NPMP empregaram somente a metodologia sem lavagem do nanomaterial após a imobilização.

A imobilização da peroxidase presente no extrato de maxixe foi realizado por ligação covalente nos NTT e adsorção física nas NPM. Para isso, uma massa necessária para preparar a porção de pasta de carbono desejada de NTT ou NPM foi pesada e colocada em contato com o extrato, por 48 horas. O volume de extrato variou de acordo com a atividade enzimática do EMX empregado (que foi medida antes da imobilização). A concentração de enzima imobilizada foi de $50,0 \text{ U mg}^{-1}$ de nanomaterial (FRITZEN-GARCIA, 2009; OLIVEIRA *et al.*, 2012; OLIVEIRA E VIEIRA, 2006).

Para os extratos EMX-F e EMX-R que foram empregados na imobilização nos NTT, após as 48 h, os NTT foram lavados com 1 mL de água destilada e centrifugado por 3 min em um tubo *ependorf*. O sobrenadante dessa lavagem não apresentou atividade enzimática, o que significa que toda a enzima adicionada na imobilização ficou imobilizada nos NTT. A peroxidase comercial (HRP) também foi imobilizada em NTT seguindo essa mesma metodologia.

Após as imobilizações, esses nanomateriais modificados foram utilizados na construção dos biossensores de pasta de carbono. Foram realizados experimentos de Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) e Potencial Zeta para a melhor compreensão da imobilização da peroxidase nos nanomateriais.

4.7.3 Preparo da pasta de carbono modificada

Os biossensores foram obtidos na composição 75/15/10% (m/m) de pó de grafite, nanomaterial contendo enzima imobilizada e óleo mineral, respectivamente. Os NTT ou NPM com enzima imobilizada foram homogeneizados com grafite em pó em um cadinho de porcelana e pistilo por 20 minutos. Após esse tempo, foi adicionado o óleo mineral à mistura, que foi homogeneizada novamente por 20 minutos. Ao final, a pasta de carbono modificada era armazenada sob refrigeração. Essa pasta de carbono foi colocada em um eletrodo comercial, de

politetrafluoretileno (Teflon[®]), próprio para pasta de carbono com 3 mm de diâmetro interno, conforme a Figura 21. O modelo empregado possui a possibilidade de escolha da quantidade de pasta colocada, uma vez que a haste central de cobre é rosqueável. Foram empregadas duas voltas da haste como profundidade a ser preenchida com a pasta, o que representa 25,0 mg de pasta de carbono modificada.

Também foram preparadas pastas de carbono sem enzima com nanomaterial (NTT e NPM) e uma pasta com apenas grafite/óleo mineral para comparação. Outra pasta de carbono com enzima imobilizada sem nanomaterial (com o extrato sendo gotejado diretamente sobre o grafite) foi construída, mas não apresentou sinal eletroquímico.

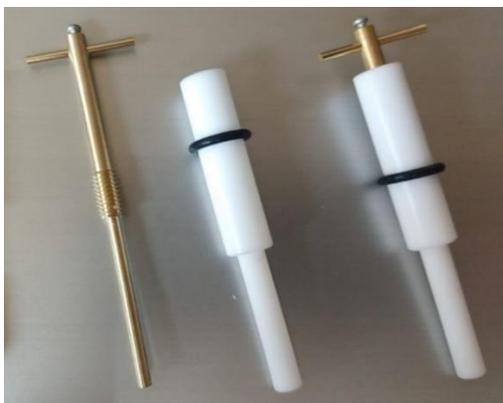


Figura 21. Eletrodos de trabalho comerciais empregados para pasta de carbono. (Fonte: De autoria própria).

4.8 Experimentos Eletroanalíticos

A VOQ foi escolhida por apresentar maior sinal do que outras técnica (RIBEIRO *et al.*, 2012) Na otimização, assim como na construção da curva analítica e na adição de padrão, foi empregado o valor da altura do pico da corrente resultante (Δi) dos voltamogramas de onda quadrada, conforme mostrado na Figura 13c. Foram realizadas varreduras em triplicatas para cada experimento. A faixa de potencial das varreduras foi de -0,15 a +0,50 V. Em todas as varreduras de VOQ e VC, a célula eletrolítica continha 20,00 mL de PBS 0,1 M no pH desejado e peróxido de hidrogênio $2,00 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$.

4.9 Otimização dos Parâmetros Experimentais

A célula eletroquímica continha 20,00 mL de PBS 0,1 M e dopamina $2,00 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹. A concentração de peróxido de hidrogênio foi de $2,00 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹ para as otimizações dos parâmetros voltamétricos e do valor de pH. O valor do pH da solução tampão foi de 7,0 para as otimizações dos parâmetros voltamétricos e da concentração de peróxido de hidrogênio.

Os parâmetros da VOQ que foram otimizados são amplitude (40 a 100 mV) e frequência (40 a 100 Hz). Também foi otimizado o pH da solução tampão (6,0 a 8,0). O incremento de potencial usado em todas as varreduras dos biossensores NTTP e NPMP foi de 5 mV e, para os biossensores NTTP-R, NTTP-F e NTT-HRP foi de 3 mV.

4.10 Curva de Calibração

Para a construção das curvas de calibração, foi preparada uma solução estoque de dopamina e alíquotas foram sendo adicionadas na célula eletroquímica, que continha 20,00 mL de PBS 0,1 M pH 7,0 e peróxido de hidrogênio $2,00 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹. A cada adição do analito foram obtidos voltamogramas de onda quadrada e a curva analítica foi plotada usando a altura da corrente de pico (Δi) do voltamograma resultante *versus* a concentração de dopamina.

O limite de detecção (LD) e o limite de quantificação (LQ) foram calculados empregando a Equação 2 e a Equação 3. O LD é a concentração mais baixa que pode ser detectada de forma confiável. Já o LQ é o valor mais baixo de corrente que pode ser quantificado com precisão e exatidão aceitáveis (GRIESHABER *et al.*, 2008). Para o biossensor NPMP, o LD calculado foi $2,11 \mu\text{mol L}^{-1}$ e o LQ de $7,03 \mu\text{mol L}^{-1}$. Para o biossensor NTTP, os valores foram 2,46 e $8,21 \mu\text{mol L}^{-1}$, respectivamente para o LD e LQ.

$$\text{LD} = \frac{3s_B}{A} \quad \text{Equação 2}$$

$$\text{LQ} = \frac{10s_B}{A} \quad \text{Equação 3}$$

Onde, s_B é a incerteza do coeficiente linear da reta ajustada e A é o coeficiente angular.

4.11 Adição de Padrão

Os biossensores desenvolvidos foram usados na determinação de dopamina em amostra de produto farmacêutico. O teor de dopamina foi determinado pelo método de adição múltipla de padrão. O sinal analítico foi obtido usando a técnica de VOQ em uma faixa de -0,15 a +0,50 V.

Inicialmente, a amostra de dopamina comercial foi diluída em PBS 0,100 M de pH 7,0 com um fator de diluição igual a 10.

O estudo da adição de padrão foi realizado em uma célula eletroquímica contendo 20,00 mL de PBS 0,100 M no pH otimizado para cada biossensor e peróxido de hidrogênio $2,00 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$. Foi adicionado 100 μL da amostra diluída de dopamina e obtido o voltamograma de onda quadrada. Em seguida, foram realizadas adições subsequentes de 100, 200, 300, 400 e 500 μL da solução de dopamina padrão com concentração de $1,50 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ (para o biossensor NTTP) e $1,00 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ (para os biossensores de NPMP, NTTP-R e NTTP-F). Em cada adição foi obtido um voltamograma de onda quadrada.

4.12 Repetitividade, Reprodutibilidade e Estabilidade dos Biossensores

Para o teste de repetitividade, foram realizadas 5 varreduras de VOQ com o mesmo biossensor. Para os biossensores NTTP e NPMP, foi empregada uma solução de dopamina $1,00 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$ em PBS de pH 7,0 e 6,0, respectivamente. Para os biossensores NTTP-F, NTTP-R e NTT-HRP, foi empregada uma solução de dopamina $5,00 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$ em PBS de pH 7,0.

Para o teste de reprodutibilidade, foram empregados 3 biossensores de cada tipo e realizadas 5 varreduras de VOQ com cada um deles, totalizando 15 varreduras, nas mesmas concentrações de dopamina e pH dos testes de repetitividade.

Para o teste de estabilidade dos biossensores NTTP e NPMP, foram realizadas varreduras de voltametria cíclica nos dias 1, 15 e 30 após os biossensores serem construídos, empregando-o em uma solução de dopamina $1,00 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ em PBS pH 7,0 e 6,0, respectivamente. A estabilidade dos biossensores NTTP-F, NTTP-R e NTT-HRP foi analisada a partir de varreduras de VOQ nos dias 1, 2, 3, 8, 14, 23 e 30. A solução empregada foi de dopamina $5,00 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$ em PBS de pH 7,0. Os biossensores foram mantidos sob refrigeração ao longo de todo o período.

Em todas as varreduras a concentração de peróxido de hidrogênio foi de $2,00 \times 10^{-3}$ mol/L.

4.13 Método Comparativo

Como método comparativo para determinar a concentração de dopamina nas amostras comerciais, foi empregada a espectrofotometria no comprimento de onda de 280 nm, que é o método padrão para determinação de dopamina (FRITZEN-GARCIA, 2013).

Uma solução estoque de dopamina $3,00 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ foi preparada em água. Alíquotas de 100 µL desta foram sendo adicionadas em uma cubeta contendo 2,700 mL de água para a construção da curva analítica. A primeira alíquota foi misturada com a água dentro da cubeta e a leitura foi realizada. Então, outra alíquota foi adicionada na mesma cubeta contendo a alíquota anterior e o procedimento foi sendo repetido.

Para a determinação da concentração de dopamina na amostra comercial, esta foi diluída em água, por um fator de diluição igual a 100. Alíquota de 200 µL da amostra diluída foi adicionada na cubeta contendo 2,700 mL de água e a leitura foi realizada. Os valores de absorbância encontrados foram colocados na equação da reta ajustada para determinação da concentração correspondente de dopamina em cada alíquota.

4.14 Teste com Ureia

Foi preparada uma solução de dopamina $5,00 \times 10^{-5}$ mol/L e peróxido de hidrogênio foi de $2,00 \times 10^{-3}$ mol/L. Os biossensores NTTP-R, NTTP-F e NTT-HRP foram empregados nessa solução com varreduras de VOQ. Após a primeira medida de cada biossensor, foi adicionada ureia na concentração final de 10 g L⁻¹. Foram realizadas outras varreduras de VOQ com cada biossensores nessa nova solução. O experimento foi realizado em triplicata.

CAPÍTULO 5. ESTUDOS SOBRE O EXTRATO DE MAXIXE

5.1 Estudo da Atividade Enzimática de Diferentes Vegetais

Os vegetais estudados foram selecionados a partir do critério da não existência de nenhum biossensor descrito na literatura que empregasse estes vegetais como fonte de peroxidase, as únicas exceções foram o jiló e o feijão verde (MOCCELINI *et al.*, 2008; OLIVEIRA, 2007, que foram empregados como confirmação se o procedimento de medida da atividade enzimática estava sendo realizado da maneira correta. A atividade enzimática da peroxidase dos homogenatos (U mL^{-1}) foi calculada pela Equação 1 e os resultados obtidos estão listados na Tabela 5. Os dados das absorbâncias médias estão no Anexo I. Com esses dados, foram construídos gráficos e os pontos da parte linear da curva foram empregados para calcular as variações de tempo e absorbâncias (Δ_T e Δ_{ABS}).

Como pode ser observado na Tabela 5, vários vegetais selecionados não apresentaram atividade: jaboticaba (*Myrciaria jaboticaba*), polpa do maracujá (*Passiflora edulis*), saião (*Kalanchoe brasiliensis*), jambo (*Syzygium jambos*), quiabo (*Abelmoschus esculentus*), none (*Morinda citrifolia*). A casca do maracujá (*Passiflora edulis*) apresentou atividade muito baixa. Boldo (*Peumus boldus*) e hortelã pimenta (*Mentha x piperita*) foram as únicas folhas que apresentaram alguma atividade, porém quase nulas. O maxixe (*Cucumis anguria*) obteve o maior valor (dentre os vegetais que nunca foram empregados em estudos), seguido da couve-flor (*Brassica oleracea*). O maxixe inteiro sem a parte das sementes foi usado na preparação do extrato. Em relação à couve-flor, a “flor” (parte branca) foi usada. Neste trabalho, foi selecionado o maxixe como fonte da enzima peroxidase na construção dos biossensores propostos, visto que ele apresenta a maior atividade enzimática (5100 U mL^{-1}). Este valor encontrado é similar aos que outros vegetais (como o jiló) apresentaram em pesquisas do desenvolvimento de biossensores (OLIVEIRA, 2007).

Tabela 5. Atividade da peroxidase encontrada no extrato de diversos vegetais.

VEGETAL	ATIVIDADE (U mL⁻¹)
Jiló – <i>Solanum gilo</i> *	5700
Feijão Verde – <i>Phaseolus vulgaris</i> *	4080
Maxixe – <i>Cucumis anguria</i>	5100
Couve-flor – <i>Brassica oleracea</i>	3190
Maracujá Casca – <i>Passiflora edulis</i>	502
Boldo – <i>Peumus boldus</i>	124
Hortelã Pimenta – <i>Mentha x piperita</i>	30
Jaboticaba – <i>Myrciaria jaboticaba</i>	0
Polpa de Maracujá – <i>Passiflora edulis</i>	0
Saião – <i>Kalanchoe brasiliensis</i>	0
Jambo – <i>Syzygium jambos</i>	0
Quiabo – <i>Abelmoschus esculentus</i>	0
None – <i>Morinda citrifolia</i>	0

* Vegetais empregados como referência.

Na literatura, Fatibello-Filho *et al.* (2002) descrevem a presença de grande quantidade de peroxidase em membros das famílias do maxixe e da couve-flor, *Cucurbitacea* e *Brassicaceae*, respectivamente. Esses vegetais são a abobrinha, da família *Cucurbitacea*, o nabo e o rabanete, da família *Brassicaceae*. Santos (2019) e Ribeiro *et al.* (2013) também extraíram peroxidase da abobrinha.

5.2 Efeito do pH no preparo do EMX

Os resultados da otimização da atividade da PMX em diferentes valores de pH são mostrados na Figura 22. O valor ótimo de pH encontrado foi igual a 7,0. Portanto, todos os extratos de maxixe desta tese foram preparados nesse pH. A maioria dos trabalhos citados na literatura que empregam extratos vegetais como fonte da peroxidase usaram pH ótimo de extração entre 6,0 e 7,0, isso é devido a boa parte dos vegetais possuírem pH fisiológico próximo de 7,0 e, desta forma, a enzima mantém sua estrutura natural e atividade máxima nesse valor de pH (OLIVEIRA *et al.*, 2012; RIBEIRO *et al.*, 2013; MOCCELINI *et al.*, 2008; FERNANDES *et al.*, 2012; FRITZEN-GARCIA *et al.*, 2009; OLIVEIRA, 2007).

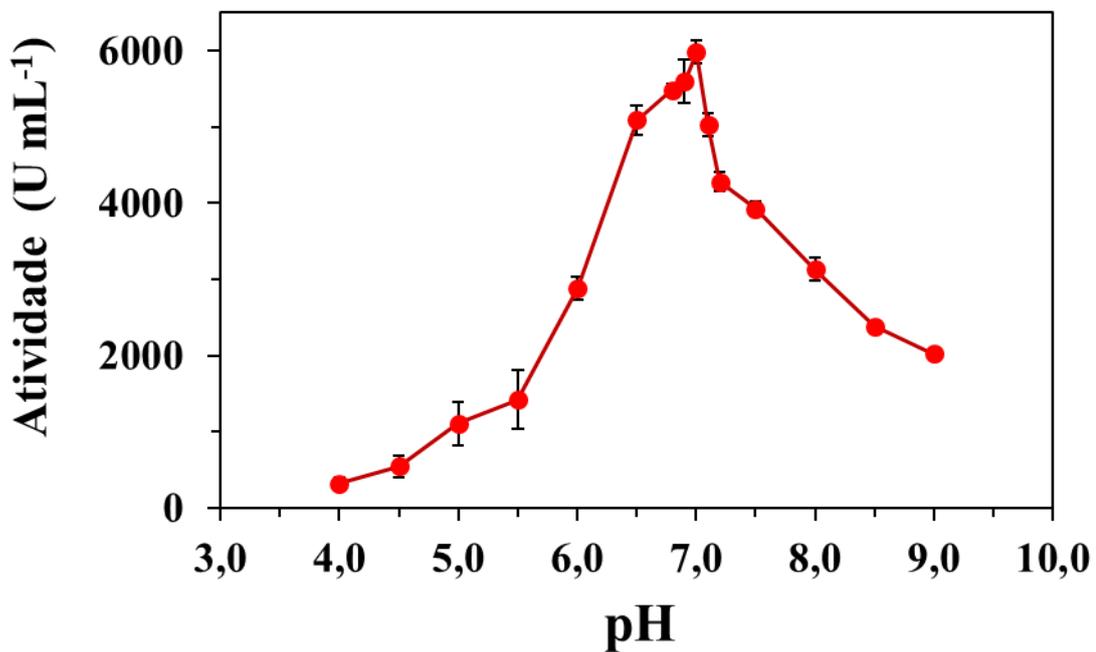


Figura 22. Gráfico de pH versus atividade enzimática do extrato de maxixe.

5.3 Determinação da Massa Molecular da PMX com Coluna de Sílica Sephadex®

Foram realizadas cromatografia de exclusão molecular para a determinação aproximada da massa molecular da PMX. Os resultados são mostrados na Figura 23.

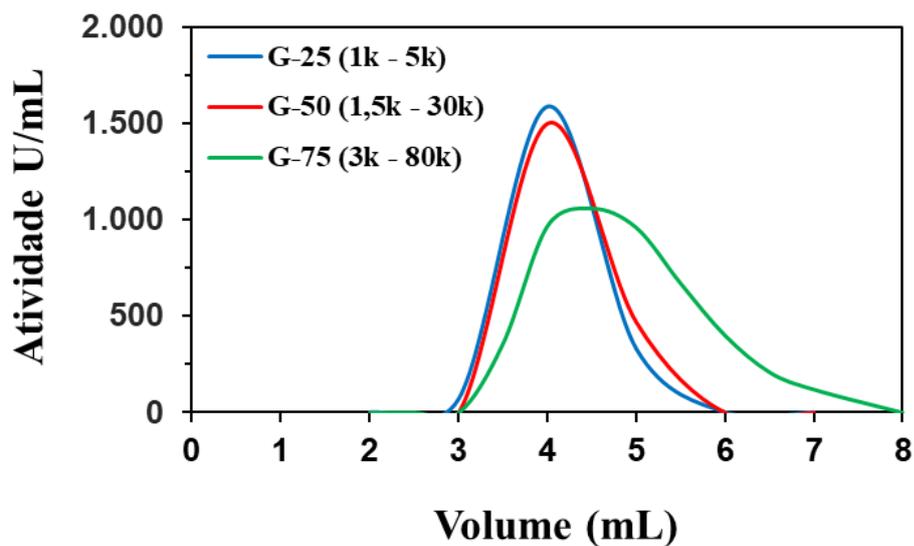


Figura 23. Atividades das alíquotas das eluições em diferentes colunas de sílica-gel.

Como pode ser observado, nas colunas G-25 e G-50 a peroxidase possui o mesmo comportamento de eluição. Porém, na coluna G-75, ocorre um atraso na passagem da PMX pela coluna, indicando que a peroxidase fica “presa” dentro dos poros dessa coluna. Além disso, não foi verificado um pico de atividade no volume de 4,0 mL, apenas uma estabilização até o volume de 5,0 mL. Com esses dados, é possível concluir que a PMX possui uma massa maior que 30.000 Da (limite superior da sílica-gel G-50) e menor que 80.000 Da (limite superior da sílica-gel G-75). Este resultado está de acordo com os valores relatados na literatura para algumas peroxidase obtidas de vegetais. Santos (2019) conclui que a peroxidase de abobrinha (*Cucurbita pepo*) apresenta massa entre 50 e 60 kDa. A HRP comercial possui massa molecular próxima a esses valores, de 44 kD (MERCK, 2024).

Na revisão elaborada por Pandey *et al.* (2017), é apresentada uma tabela com dezoito trabalhos que mediram a massa de peroxidase obtidas de plantas, onde em quinze deles a peroxidase estudada possui entre 30 e 80 kDa de massa molecular. Souza (2020) apresenta em seu trabalho uma tabela com várias referências de diferentes fontes de peroxidase e suas respectivas massas moleculares encontradas. De trinta e seis referências que apresentam esses valores, apenas em seis trabalhos a massa molecular da peroxidase não está dentro da faixa de 30 a 80 kDa.

5.4 Caracterização dos extratos EMX-R e EMX-F

O EMX preparado foi empregado na construção dos dois primeiros biossensores construídos: NTTP e NPMP. Para os biossensores NTTP-R e NTTP-F, o EMX foi centrifugado em um filtro Centripep[®] com uma massa de corte de 3.000 Da. Após isso, foram obtidos dois extratos: EMX-R, referente ao extrato retido pelo filtro e o EMX-F, referente ao extrato que passou pelo filtro,

Para essa filtração, 5 mL de EMX foi colocado no filtro e centrifugado por cerca de 30 min. O volume obtido do EMX-R e do EMX-F foram aproximadamente iguais. A Figura 24 mostra as atividades obtidas para os três extratos. Como esperado, o EMX-F possui menor atividade enzimática do que o EMX-R, uma vez que a massa da peroxidase é superior a 3.000 Da, (massa de corte da membrana do concentrador empregado), como mostrado nas análises com a coluna de Sephadex, a enzima se concentra na porção retida do concentrador.

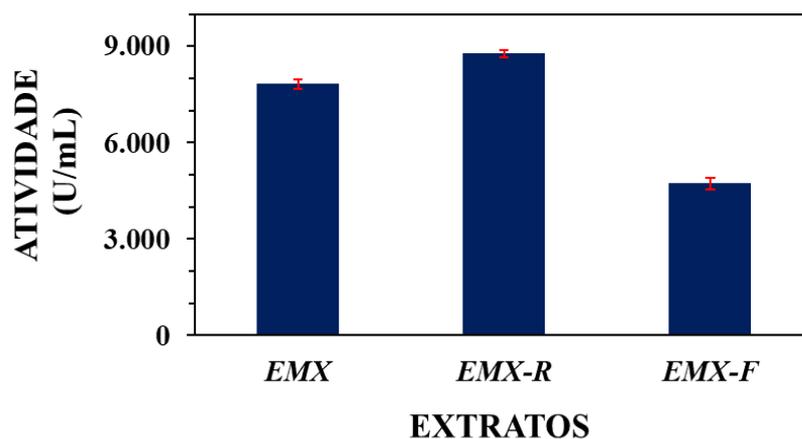


Figura 24. Atividades enzimáticas da peroxidase nos extratos antes e depois da concentração com filtro Centripep®.

Posteriormente, foram realizados os testes em gel de eletroforese, conforme apresentado na Figura 25. O resultado apresenta uma grande concentração de proteínas em ambos os extratos, porém de modo maior no EMX-R, como esperado devido a massa de corte de 3.000 Da. Por isso, não foi possível concluir qual das bandas é relativa a PMX.

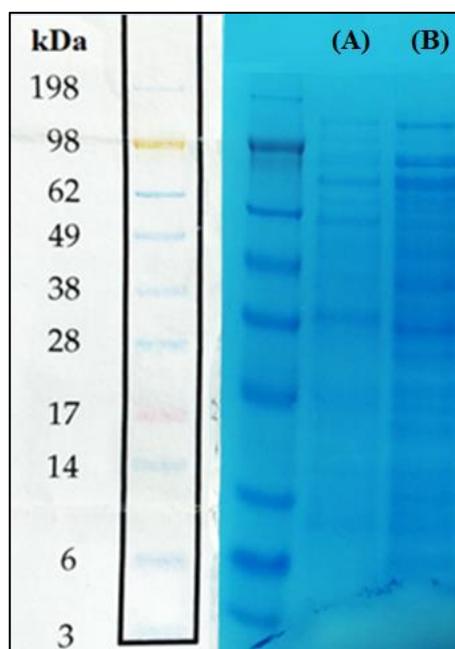


Figura 25. Eletroforese dos extratos (A) EMX-F e (B) EMX-R.

5.5 Estabilidade dos Extratos de Maxixe

A estabilidade dos extratos de maxixe EMX-R e EMX-F, assim como a da solução de HRP (0,032 mg/mL), foram testadas por 27 dias. A solução de HRP foi preparada de forma a apresentar uma atividade similar aos outros dois extratos. Nesse período, as amostras foram armazenadas a -6 °C.

A Figura 26 e a Figura 27 mostram como variou a atividade desses extratos durante esse período. Como esperado, o EMX-F possui menor atividade enzimática do que o EMX-R, uma vez que a massa da peroxidase é superior a 3.000 Da, (massa de corte da membrana do concentrador empregado) fazendo com que a enzima se concentre na porção retida do concentrador.

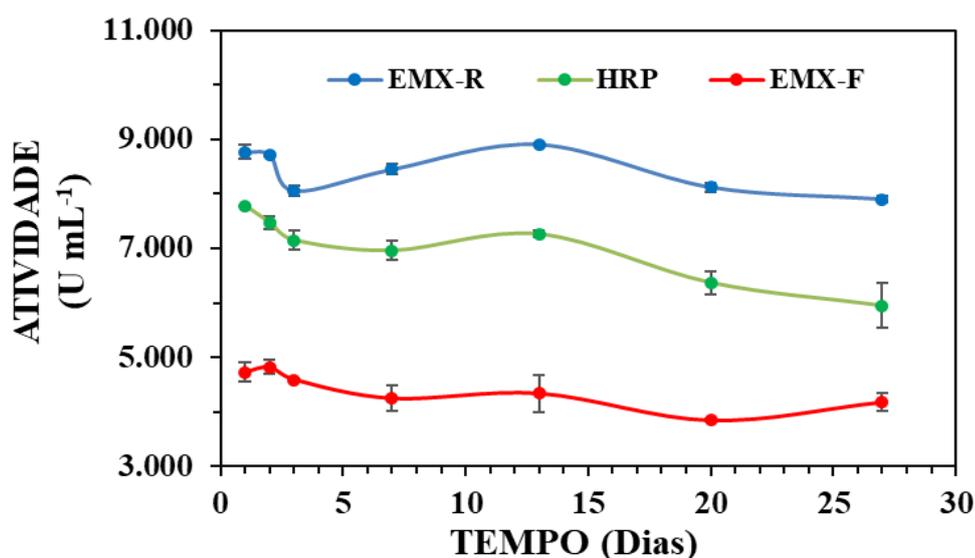


Figura 26. Estabilidade dos extratos de maxixe e da solução de HRP em termos de atividade (U mL⁻¹).

Ao final do período de análise, a perda da atividade é de cerca de 10% para os extratos EMX-R e EMX-F. No entanto, os extratos ainda apresentam uma considerável atividade, o que possibilita sua aplicação na construção de biossensores como fonte da enzima peroxidase. Pode-se observar em trabalhos científicos que desenvolveram biossensores empregando extrato de vegetais como fonte da peroxidase que a atividade variou de 2000 a 6000 U mL⁻¹ (RIBEIRO *et al.*, 2013; FRITZEN-GARCIA *et al.*, 2009; OLIVEIRA, 2007). A solução de HRP apresentou

estabilidade um pouco menor, com o valor do 27º dia sendo cerca de 75% da atividade inicial. Isto pode ser devido à menor estabilidade apresentada por enzimas purificadas, que, por não estarem em seu ambiente celular com proteínas protetivas, tornam-se mais propícias a se desnaturarem e a perderem atividade (ROSA *et al.*, 2020).

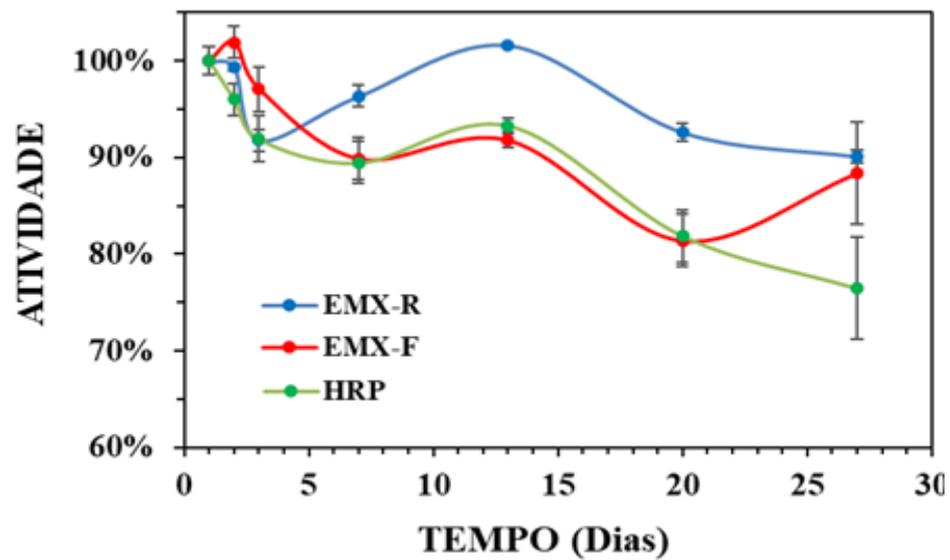


Figura 27. Estabilidade dos extratos de maxixe e da solução de HRP em termos de atividade relativa (%).

CAPÍTULO 6. IMOBILIZAÇÃO DA PEROXIDASE NOS NANOMATERIAIS

6.1 FTIR dos NTT

Os NTT foram funcionalizados em 2 etapas. A Figura 28 apresenta os FTIR dos NTT em todas as etapas da funcionalização. A primeira, com APTMS, insere grupos $-NH_2$ na superfície dos NTT (NTT-A). A segunda, com glutaraldeído, acopla o grupo $-CHO$ (NTT-AG), que reage com os grupos $-NH_2$ da peroxidase, criando uma ligação covalente entre a enzima e os nanotubos (SASSOLAS *et al.*, 2012; NICOLINI *et al.*, 2015). Os resultados da FTIR para os NTT foram correspondentes com os dados presentes na literatura e comprovam o resultado positivo da funcionalização e da imobilização enzimática da peroxidase nos NTT (NICOLINI *et al.*, 2015).

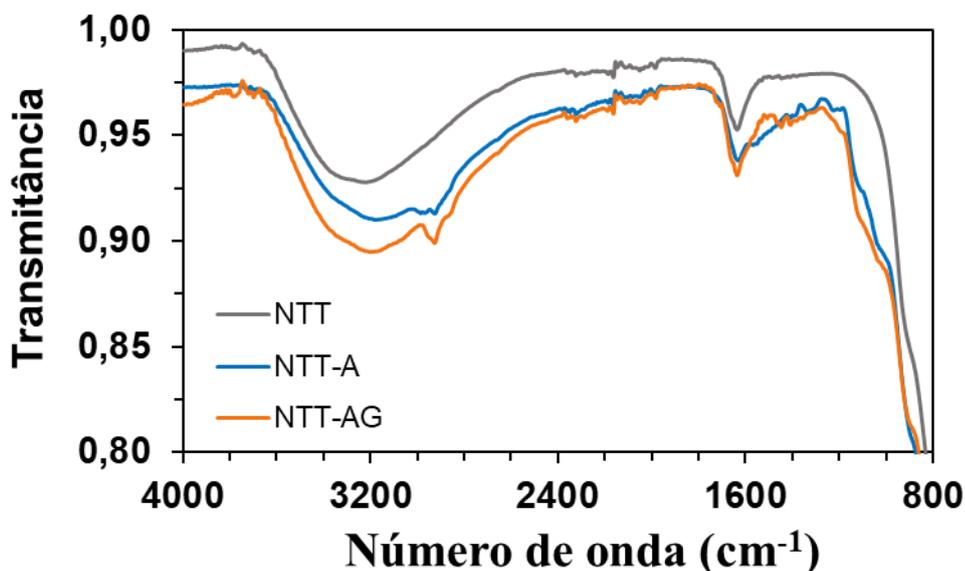


Figura 28. FTIR dos NTT: (cinza) sem funcionalização, (azul) funcionalizados com APTMS e (laranja) funcionalizados com APTMS e glutaraldeído.

O espectro dos NTT originais mostra uma grande banda entre 3000 e 3500 cm^{-1} devido à presença de grupos $-OH$ na superfície dos nanotubos e em 1630 cm^{-1} devido à deformação angular de moléculas de água. A primeira etapa da funcionalização, com APTMS, acrescenta

os grupos Si–O–Ti, Si–O–Si e Si–OH à superfície dos NTT, em 1030, 1120 e 907 cm^{-1} , respectivamente, além de diversos picos entre 1200 e 1600 cm^{-1} . Após a etapa com o glutaraldeído, esses picos menores desaparecem, porém há o incremento em 1640 cm^{-1} , atribuídos aos grupos –CONH₂, 1060 cm^{-1} (álcool primário) e entre 3000 e 3500 cm^{-1} (NICOLINI *et al.*, 2015).

Para a comprovação da ligação covalente entre os NTT e a peroxidase, foram realizadas análises de FTIR após a imobilização dos extratos e da solução de HRP nos NTT funcionalizados com APTMS e glutaraldeído (NTT-AG) e nos NTT originais (sem funcionalização). Os resultados do FTIR desses dois experimentos são mostrados na Figura 29. Como pode ser observado, os resultados são muito diferentes. Com a imobilização nos NTT sem funcionalização, não há praticamente mudança nos espectros de absorbância de todas as nanopartículas (NTT/EMX-F, NTT/EMX-R e NTT/HRP).

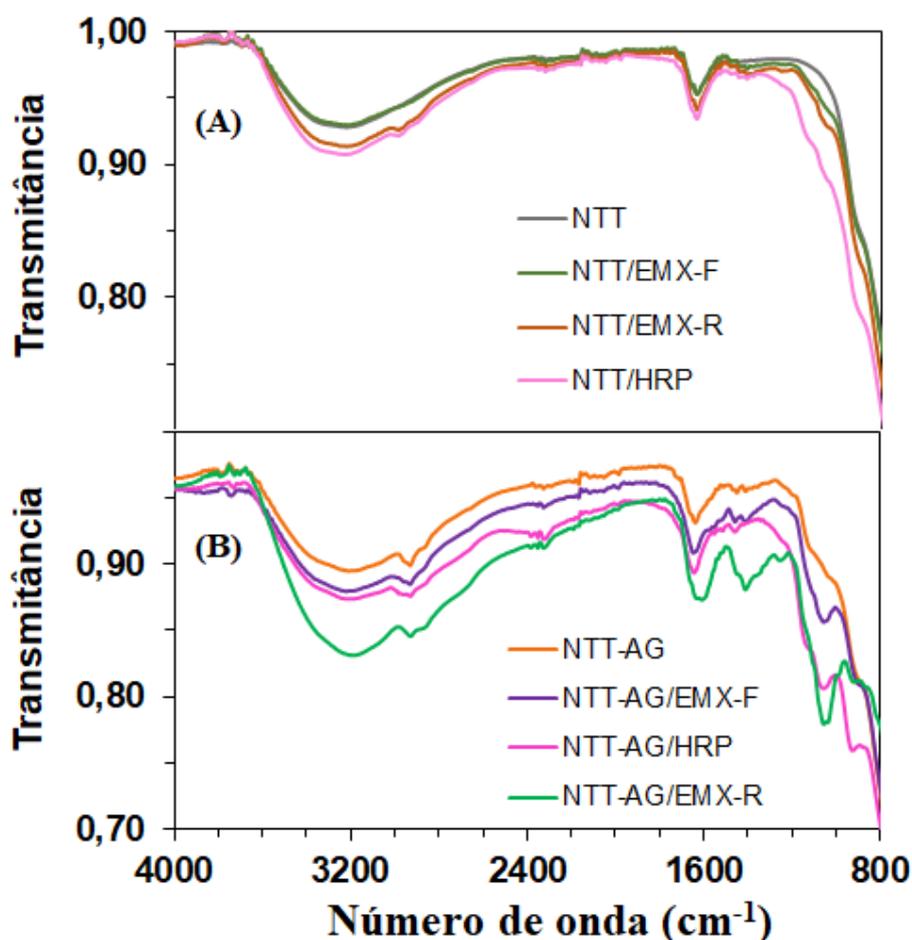


Figura 29. FTIR dos NTT (A) sem funcionalização e (B) funcionalizados com a imobilização de EMX-R, EMX-F e solução de HRP.

Entretanto, empregando-se os NTT com funcionalização (NTT-AG), a absorvância aumenta em toda a faixa do espectro das três nanopartículas empregadas (NTT-AG/EMX-R, NTT-AG/EMX-F e NTT/HRP). Destaca-se os picos em 1060 cm^{-1} , correspondente a um álcool primário ou ao estiramento da ligação -C-O-C-, o de 3280 cm^{-1} referente a moléculas de água, 1641 cm^{-1} referente ao grupo -CONH₂ (NICOLINI *et al.*, 2015).

A Figura 30 compara os espectros da HRP liofilizada e do NTT-AG/HRP e a Tabela 6 mostra os principais picos encontrados no espectro de FTIR da HRP. Pode-se observar que os picos em comum dos dois espectros são o de 3280 cm^{-1} referente a moléculas de água, 1641 cm^{-1} referente ao grupo -CONH₂ e 1016 cm^{-1} referente ao grupo -C-O-C-.

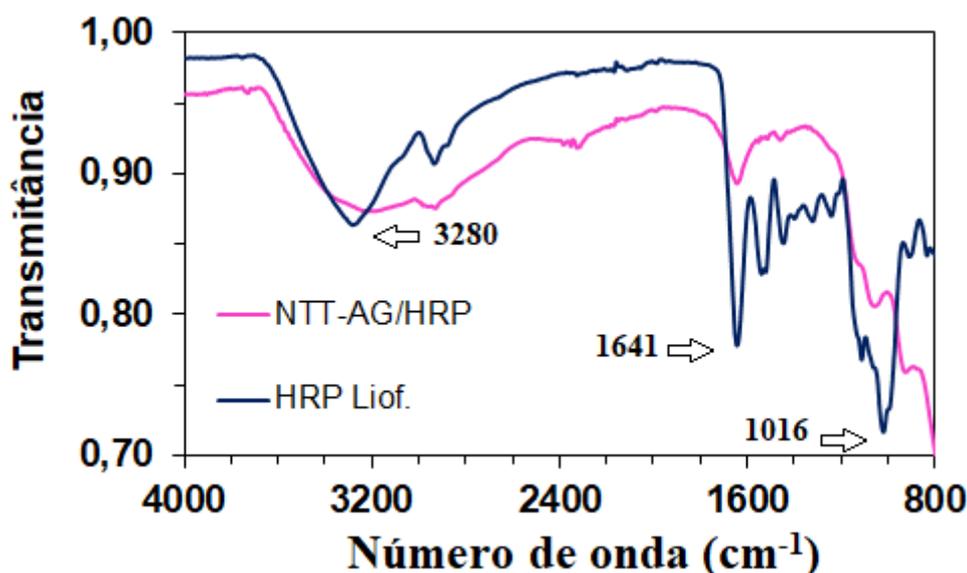


Figura 30. FTIR dos NTT-AG depois da imobilização com HRP e da HRP liofilizada.

Tabela 6. Principais picos de absorção no espectro de FTIR da HRP liofilizada.

GRUPO	$1/\lambda\text{ (cm}^{-1}\text{)}$	GRUPO	$1/\lambda\text{ (cm}^{-1}\text{)}$
-C-O-C-	1016	-CONH-R	1537
-CH ₃	1343	-CONH ₂	1641
-C=N-	1443	-O-CH ₃	2933
-NH-	1518	-OH	3280

6.2 FTIR das NPM

A Figura 31 apresenta os FTIR das NPM sem e com EMX depositado sobre elas.

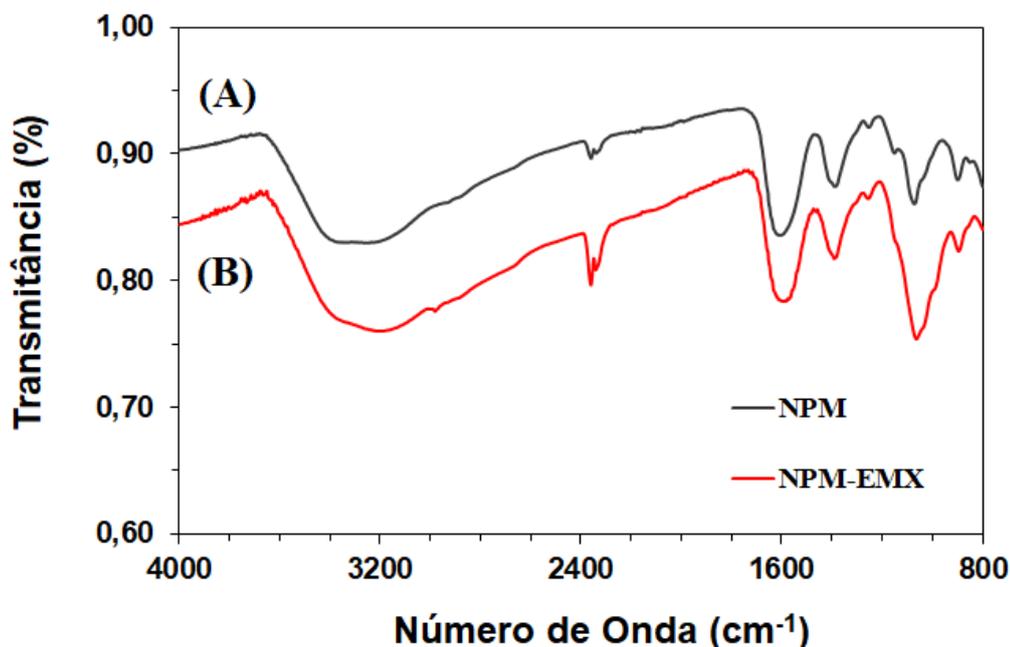


Figura 31. FTIR das NPM: (A) sem modificação e (B) com peroxidase de maxixe imobilizada.

As diferenças nos espectros com e sem o EMX depositado estão em 1070 cm^{-1} referente à ligação C-O-C da glicose β proveniente da quitosana e dois picos menores em torno de 2350 cm^{-1} relacionados à amino compostos (NANDIYANTO, 2019). Não houve uma grande mudança nos espectros após a imobilização como ocorreu nos NTT funcionalizados. Dessa forma, conclui-se que a imobilização covalente ocorreu nos NTT-AG e apenas uma ligação por adsorção nas NPM.

6.3 Potencial Zeta dos Nanomateriais

A Tabela 7 mostra os valores obtidos para o potencial zeta das NPM antes e após o contato com o extrato EMX. As NPM possuem o potencial zeta de $+3,2\text{ mV}$ inicialmente e, após a deposição, cai para $-14,8\text{ mV}$. Deve-se considerar que essas NPM não foram lavadas

após a etapa de imobilização e que o extrato de maxixe EMX não passou pelo filtro Centriprep. Portanto, essa carga é devida a todos os componentes do extrato.

Tabela 7. Valores de Potencial Zeta (mV) para as NPM antes e após a deposição do EMX.

<i>Nanomaterial</i>	NPM	NPM-EMX
<i>Potencial Zeta (mV)</i>	+3,2 ± 0,3	-14,8 ± 1,2

Na Tabela 8, estão os valores para os NTT obtidos antes e depois das etapas de funcionalização. Os NTT possuem carga superficial de -44,7 mV devido a presença do grupo -OH⁻ e, com a etapa de funcionalização com o APTMS, o nanomaterial (NTT-A) passa a possuir uma carga superficial mais elevada (+4,3 mV) devido à adição de grupos -NH₂ (NICOLINI *et al.*, 2015b). A última etapa da funcionalização, com glutaraldeído, faz com que o nanomaterial tenha carga superficial negativa novamente, devido a inserção de grupos -CHO nos NTT.

Tabela 8. Valores de Potencial Zeta (mV) para os NTT antes e após as etapas de funcionalização.

<i>Nanomaterial</i>	NTT	NTT-A	NTT-AG
<i>Potencial Zeta (mV)</i>	-44,7 ± 0,8	+4,3 ± 0,8	-17,8 ± 0,9

A Tabela 9 mostra os valores de potencial zeta depois da deposição dos extratos EMX-R e EMX-F, e da HRP, seguidas de lavagem dos NTT. A HRP possui um ponto isoelétrico de 7,2 (FRITZEN-GARCIA *et al.*, 2009), portanto ela está negativa no valor de pH empregado nesse trabalho (pH 7,0), o que é comprovado no potencial zeta negativo um pouco menor no NTT-AG/HRP (-19,8mV) do que no NTT-AG sem enzima (-17,8 mV). Os valores para os NTT com extratos diferem entre si. O extrato EMX-F aumentou a carga superficial, mas não o suficiente para esta deixar de ser negativa (-13,1 mV). Enquanto o extrato EMX-R diminui um pouco mais a carga do NTT (-22,2 mV). Considerando que a quantidade de PMX colocada em cada porção de NTT para esses experimentos foram iguais (medidas pela atividade enzimática), essa diferença de carga

não é devido à PMX e sim aos outros componentes dos extratos, que talvez possuam carga diferentes em cada extratos ou pode ser devido a uma maior ou menor quantidade de proteínas que foi adsorvida de cada extrato.

A Figura 29 com os espectros de FTIR mostram que houve mais absorção na seguinte ordem NTT-AG/EMX-F < NTT-AG/HRP < NTT-AG/EMX-R. Analisando os dados de Potencial Zeta dos NTT e das NPM e do experimento de eletroforese, podemos concluir que essas proteínas possuem carga negativa e que mais proteínas foram imobilizadas na partículas NTT-AG/EMX-R, por isso a menor carga em relação ao NTT-AG/EMX-F.

Tabela 9. Valores de Potencial Zeta (mV) para os NTT funcionalizados após as deposições dos extratos de maxixe ou solução de HRP.

<i>Nanomaterial</i>	NTT-AG/ EMX-F	NTT-AG/ EMX-R	NTT-AG/ HRP
<i>Potencial Zeta (mV)</i>	-13,1 ± 0,7	-22,2 ± 1,0	-19,8 ± 0,5

CAPÍTULO 7. BIOSSENSORES NPMP e NTTP

Neste capítulo serão apresentados os resultados de caracterização dos biossensores empregando o extrato EMX imobilizado nas nanopartículas magnéticas (NPM) e nanotubos de titanato (NTT).

7.1 Otimização dos parâmetros da voltametria de onda quadrada

Os valores de Δi das otimizações para a VOQ são apresentados nas Figuras 32 a 34. A otimização dos parâmetros voltamétricos visam maximizar as respostas de corrente, buscando maior sensibilidade, para o desenvolvimento de um procedimento analítico para a VOQ. A Figura 32 mostra a dependência da Δi com a amplitude, com frequência fixa de 100 Hz para o NTTP e 100 Hz para o NPMP. Observa-se uma dependência linear da Δi em função da amplitude, para ambos os biossensores. Desta forma, foi selecionada a amplitude de 100 mV. A Figura 33 apresenta a variação da Δi em função da frequência, com amplitude fixa de 100 mV sendo observada um aumento da intensidade até 60 Hz para o Biossensor NTTP. A partir deste valor os valores de Δi tornam-se quase constante deixando de interferir significativamente na sensibilidade para o método proposto. Embora os valores de 80 e 100 Hz sejam quase os mesmos, a frequência escolhida foi de 100 Hz, pois apresentou um desvio padrão menor no Biossensor NTTP. Para o Biossensor NPMP houve um aumento linear da Δi em função da frequência até a amplitude analisada de 100 HZ.

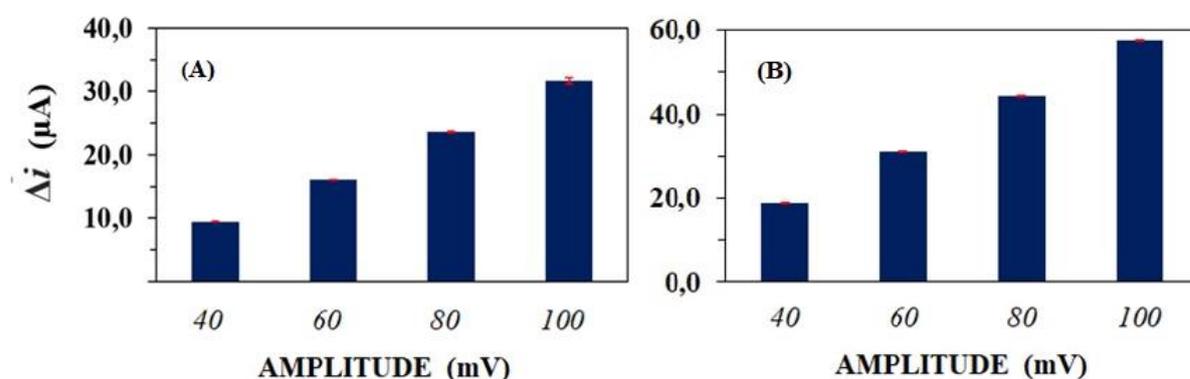


Figura 32. Estudo do efeito da amplitude da VOQ empregando os biossensores (A) NPMP e (B) NTTP. Solução de dopamina $2,00 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ e peróxido de hidrogênio de $2,00 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em PBS pH 7,0 em diferentes valores de amplitudes de onda quadrada, frequência de 100 Hz e incremento de potencial de 5 mV.

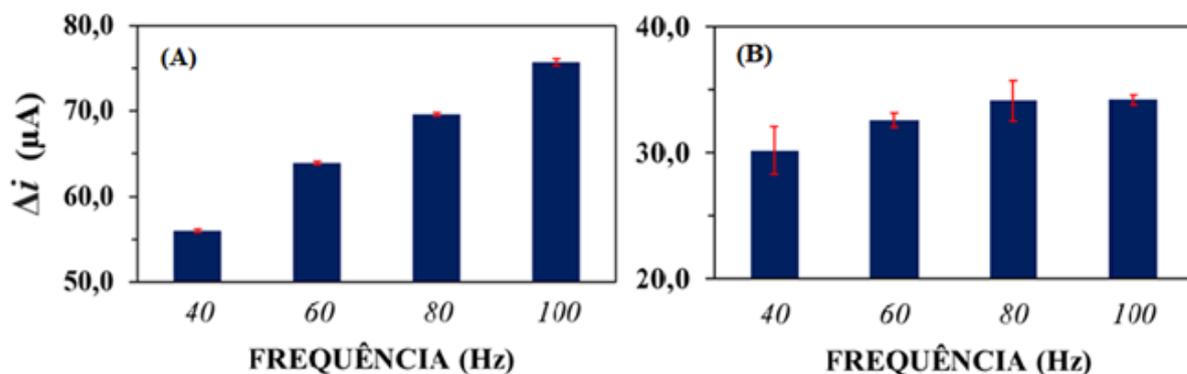


Figura 33. Estudo do efeito da frequência da VOQ empregando os biossensores (A) NPMP e (B) NTTP. Solução de dopamina $2,00 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ e peróxido de hidrogênio de $2,00 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹ em PBS pH 7,0 em diferentes valores de frequência, amplitude de 100 mV e incremento de potencial de 5 mV.

A Figura 34 apresenta os valores de Δi para a variação de pH em frequências e amplitudes fixas para os biossensores NPMP e NTTP. O valor de pH com maior valor de Δi foi o pH 6,0 e de 7,0 para os biossensores NPMP e NTTP, respectivamente. Os valores de pH entre 6,0 e 7,0 para a solução tampão estão compatíveis com os valores de maior atividade para enzimas do tipo peroxidase na construção de biossensores semelhantes onde existiu uma otimização para essa variável (DECARLI *et al.*, 2022; KONG *et al.*, 2018; FRITZEN-GARCIA *et al.*, 2009; RIBEIRO *et al.*, 2013). As diferenças observadas podem ser devido ao método de imobilização da peroxidase nas NPM e NTT: nas NPM foi empregado o método de adsorção física e nos NTT foi empregado o método de ligação covalente. A ligação covalente pode dar mais estabilidade à enzima e consequentemente o pH ótimo para o biossensor não difere do pH ótimo para a enzima livre no extrato. Os valores otimizados para a VOQ na detecção da dopamina pelo biossensor NTTP estão resumidos na Tabela 11.

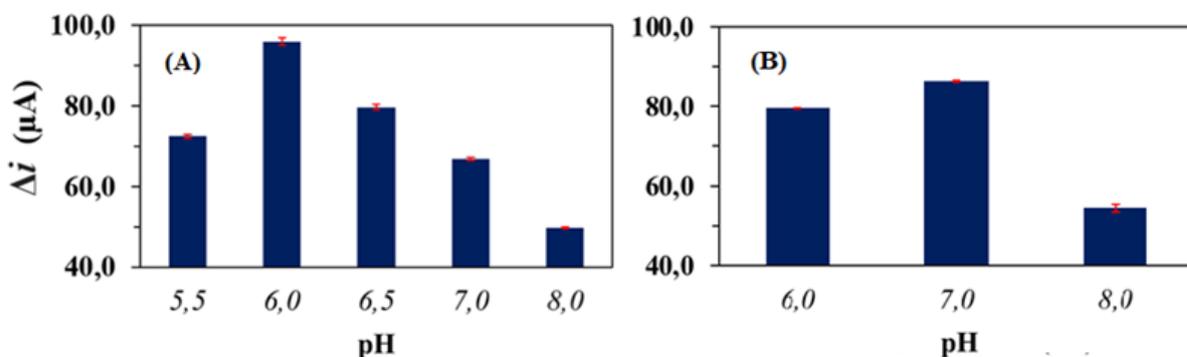


Figura 34. Estudo do efeito do pH da solução tampão empregando os biossensores (A) NPMP e (B) NTTP. Solução de dopamina $2,00 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ e peróxido de hidrogênio de $2,00 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹ em diferentes valores de pH da solução tampão de fosfato, frequência de 100 Hz, amplitude de 100 mV e incremento de potencial de 5 mV.

Tabela 10. Valores ótimos das variáveis experimentais para os biossensores NPMP e NTTP.

Biossensor	pH	Amplitude (mV)	Frequência (Hz)
NPMP	6,0	100	100
NTTP	7,0	100	100

7.2 Caracterização eletroquímica com voltametria cíclica

As características eletroquímicas dos biossensores NPMP e NTTP foram investigadas por voltametria cíclica usando o par redox $\text{Fe}(\text{CN})_6^{-3/4}$. Como comparação, também foram realizadas as medidas para o sensor de pasta de carbono com os nanomateriais sem enzima (ENTT) e do eletrodo de pasta de carbono pura (EPC). As medidas foram realizados em uma solução de $\text{Fe}(\text{CN})_6^{-3}$ 5 mmol L⁻¹ em 0,1 mol L⁻¹ KCl.

Para o biossensor NPMP, a Figura 35 apresenta os voltamogramas cíclicos para os eletrodos na velocidade de varredura de 150 mV s⁻¹. É possível verificar que o biossensor NPMP apresentou maiores correntes de pico anódico (I_{pa}) e catódico (I_{pc}).

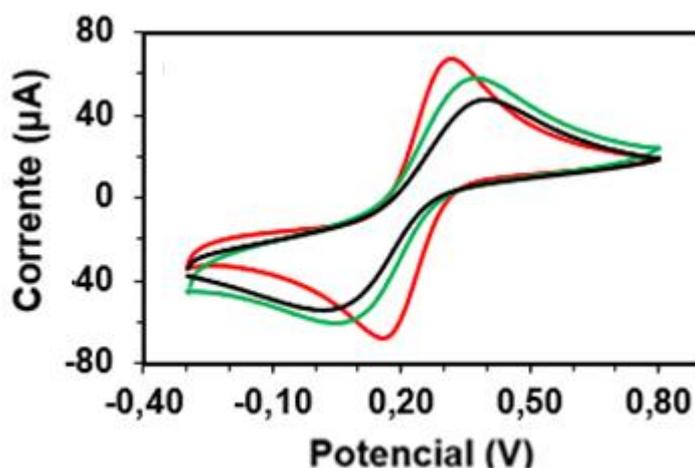
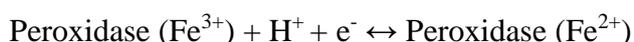


Figura 35. Voltamogramas cíclicos do biossensor NPMP (curva vermelha), sensor ENPM (curva verde) e sensor EPC (curva preta) na solução $\text{Fe}(\text{CN})_6^{-3}$ 5 mmol L⁻¹ em 0,1 mol L⁻¹ KCl e uma velocidade de varredura de 150 mV s⁻¹.

Em relação à separação de picos (ΔE_p), o biossensor apresentou 161 mV para o par redox $\text{Fe}(\text{CN})_6^{-3/4}$, enquanto o ENPM e o EPC apresentaram uma ΔE_p de 315 e 371 mV,

respectivamente. Isso mostra que a peroxidase expressivamente a sensibilidade (maiores valores de I_{pa} e I_{pc}) como a reversibilidade do sistema (menores ΔE_p) quando comparado com a pasta de carbono. Este resultado é atribuído às características redox dos centros eletroativos da peroxidase imobilizada, indicando maior transferência de elétrons entre a peroxidase e o eletrodo. Parece que as NPM fornecem um ambiente biocompatível para peroxidase, e que as nanopartículas magnéticas atuam como mediadores de elétrons, acelerando a transferência de elétrons. Com a aplicação do potencial, o sítio ativo da enzima peroxidase imobilizada nas NPM reduz e oxida conforme reação:



A Figura 36A apresenta os voltamogramas cíclicos do biossensor NPMP em função da velocidade de varredura. O mesmo foi feito para o ENPM (Figura 36B) e o EPC (Figura 36C). A dependência linear de I_{pc} ($r = 0,9987$) e I_{pa} ($r = 0,9997$) com respeito à raiz quadrada da velocidade de varredura na Figura 36D indica um processo eletroquímico controlado por difusão de acordo com a equação de Randles-Sevick: (BERTANA *et al.*, 2020):

$$i_p = (2.69 \times 10^5) n^{\frac{3}{2}} A D^{\frac{1}{2}} C v^{\frac{1}{2}} \quad \text{Equação 4}$$

onde n é o número de elétrons, A é a área superficial do eletrodo (cm^2), D é o coeficiente de difusão ($\text{cm}^2 \text{ s}^{-1}$), C é a concentração da espécie eletroativa na solução (mol mL^{-1}) e v é a velocidade de varredura (V s^{-1}).

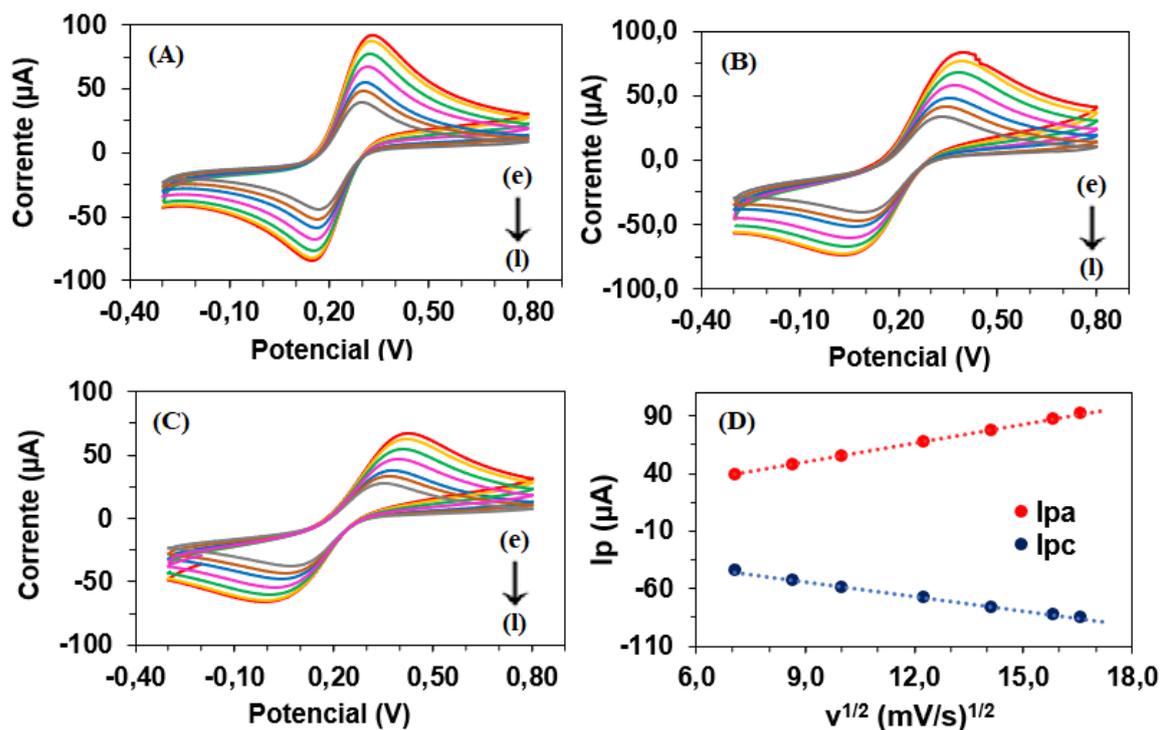


Figura 36. Voltamogramas cíclicos (A) do biossensor NPMP, (B) do ENPM e (C) do EPC em $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ $5,0 \text{ mmol L}^{-1}$ em solução $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de KCl a uma velocidade de varredura de (e) 275; (f) 250; (g) 200; (h) 150; (i) 100; (j) 75 e (k) 50 mV s^{-1} e (D) relação linear entre valores de pico anódico (I_{pa}) e pico catódico (I_{pc}) em função da raiz quadrada das taxas de varredura.

Para o biossensor NTPP, a Figura 37 apresenta os voltamogramas cíclicos para os eletrodos na velocidade de varredura de 150 mV s^{-1} . É possível verificar que o biossensor NTPP apresentou maiores correntes de pico anódico (I_{pa}) e catódico (I_{pc}).

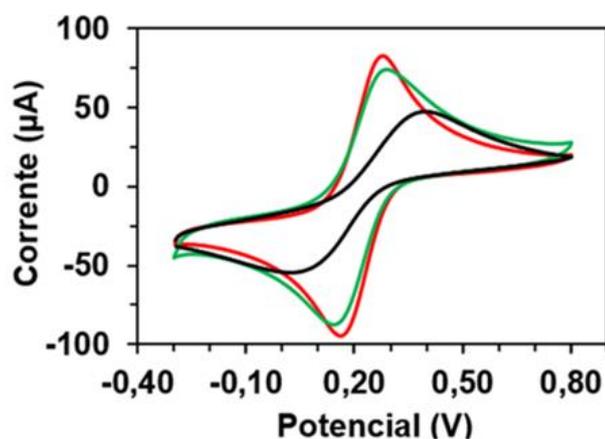


Figura 37. Voltamogramas cíclicos do biossensor NTPP (linha vermelha), sensor ENT (linha verde) e sensor EPC (linha preta) na solução $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ 5 mmol L^{-1} em $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ KCl e uma velocidade de varredura de 150 mV s^{-1} .

Os picos de oxidação e redução estão presentes nas curvas de todos os eletrodos, com separação pico a pico ($\Delta E_p = E_{pa} - E_{pc}$) de 371, 146 e 115 V, para EPC, ENTT e NTTP, respectivamente, conforme Figura 38. Os resultados indicam um processo redox quase reversível. Picos redox bem definidos e quase reversíveis com potenciais de pico formais aparentes foram observados para todos os sensores. A reversibilidade aumentada é importante uma vez que a técnica empregada é a voltametria de onda quadrada, onde existe a oxidação seguida de redução em cada ponto do voltamograma. A presença dos NTT melhora o desempenho dos sensores, devido ao aumento da condutividade elétrica. É relatado na literatura que nanoestruturas com Ti, aceleram a transferência de elétrons significativamente (WANG, 2018). Além disso, a presença de sódio na estrutura dos nanotubos de titanato desempenham um papel crucial no aumento da condutividade (HU *et al.*, 2009; GAO *et al.*, 2018). Resultados similares foram observados por Zhang *et al.* (2017) em que a HRP foi imobilizada em nanofolhas de titanato e empregada na modificação de eletrodo de carbono vítreo, para detecção de peróxido de hidrogênio. Zhao *et al.* (2015) desenvolveu um biossensor para detecção de glicose, em que a glucose oxidase foi imobilizada em nanotubos de titanato decorados com nanopartículas de ouro. Em todos os estudos as nanoestruturas de titanato melhoraram a transferência direta de elétrons.

A peroxidase imobilizada aumentou a reversibilidade do sistema, quando comparado ao EPC.

A Figura 38A apresenta os voltamogramas cíclicos do biossensor NTTP em função da velocidade de varredura. O mesmo experimento foi realizado para o ENTT (Figura 38B) e para o EPC (Figura 38C). A dependência linear de I_{pc} ($r = 0,9964$) e I_{pa} ($r = 0,9983$) com respeito à raiz quadrada da velocidade de varredura na Figura 38D indica um processo eletroquímico controlado por difusão de acordo com a equação de Randles-Sevick (Equação 4).

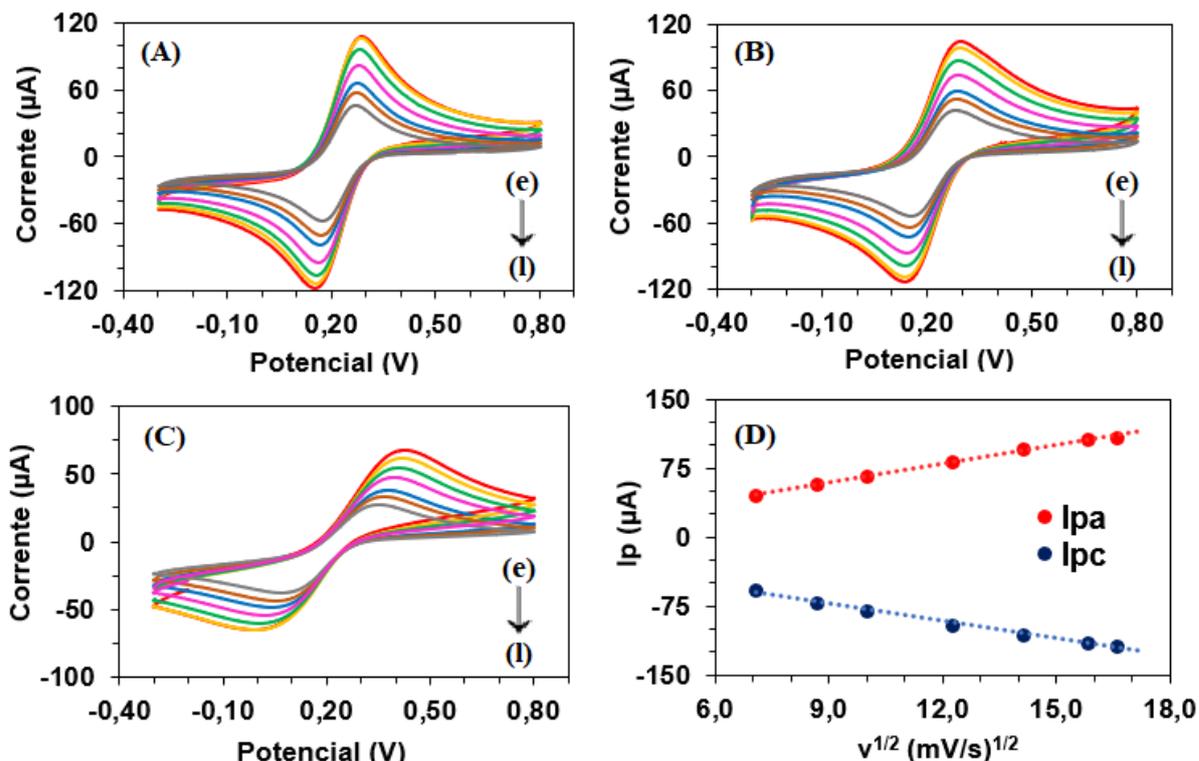


Figura 38. Voltamogramas cíclicos (A) do biossensor NTTP, (B) do ENT e (C) do EPC em $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ $5,0 \text{ mmol L}^{-1}$ em solução $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ de KCl a uma velocidade de varredura de (e) 275; (f) 250; (g) 200; (h) 150; (i) 100; (j) 75 e (k) 50 mV s^{-1} e (D) relação linear entre valores de pico anódico (I_{pa}) e pico catódico (I_{pc}) em função da raiz quadrada das taxas de varredura.

Pacheco *et al.* (2013) relataram que existem três meios de ocorrer transporte de massa: difusão, migração e convecção. Na voltametria, as condições são reguladas para apenas a difusão existir. A convecção não ocorre pois não existe agitação da solução no momento da varredura. A migração, que é o movimento dos íons através da solução causada pela atração ou repulsão entre as espécies em solução e o eletrodo de trabalho, é suprimida pelos eletrólitos da solução tampão, que estão em uma concentração muito maior que a do analito. Assim, o resultado acima mostra que a detecção eletroquímica do biossensor NTTP ocorrer a partir da difusão das espécies em solução para a superfície do eletrodo.

A área efetiva do biossensor foi calculada a partir do coeficiente angular encontrado para a equação de Randles-Sevick (Equação 4) empregando os picos anódicos (Figura 38B), onde: $n = 1$ elétron, $D = 7,6 \times 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{s}$ e $C = 5,0 \times 10^{-6} \text{ mol/mL}$. A área efetiva para o eletrodo de pasta de carbono pura foi de $0,0375 \text{ cm}^2$, para o eletrodo de NTT de $0,0557 \text{ cm}^2$ e para o biossensor NTTP foi de $0,0570 \text{ cm}^2$. Ou seja, os NTT aumentam bastante a área efetiva do eletrodo. A área efetiva do biossensor NPMP foi calculada assim como para o biossensor NTTP.

A área efetiva para o eletrodo de pasta de carbono pura foi de $0,0375 \text{ cm}^2$, para o eletrodo de NPM foi de $0,0443 \text{ cm}^2$ e para o biossensor NPMP foi de $0,0470 \text{ cm}^2$.

Desses testes eletroquímicos, podemos concluir que os NTT são um nanomaterial mais condutor do que as NPM. A Δi , altura do pico anódico, do ENPM na Figura 38 (Curva verde) é de $60,0 \mu\text{A}$. O i_{pa} do ENTT na Figura 40 (Curva verde) é de $70,0 \mu\text{A}$. Ambos os eletrodos não possuem peroxidase imobilizada, ou seja, suas diferenças de sinal analítico é puramente devido aos nanomateriais presente na pasta de carbono.

7.3 Método para Dessorção da Analito na Superfície do Biossensor

Em todos os biossensores, ao realizar medidas usando voltametria de onda quadrada, observou-se um processo de adsorção do analito na superfície do biossensor, como consequência, uma diminuição do sinal analítico nas varreduras subsequentes. Para eliminar este efeito, foi aplicado um potencial de $-0,30 \text{ V}$ por 5 s antes de cada varredura de VOQ nas curvas de calibração e nas adições de padrão. (ALVARÉZ *et al.*, 2016) A Figura 32 e a Figura 33 mostram a diferença entre os voltamogramas de varreduras sucessivas com e sem a aplicação do potencial usando os biossensores NTTP e NPMP.

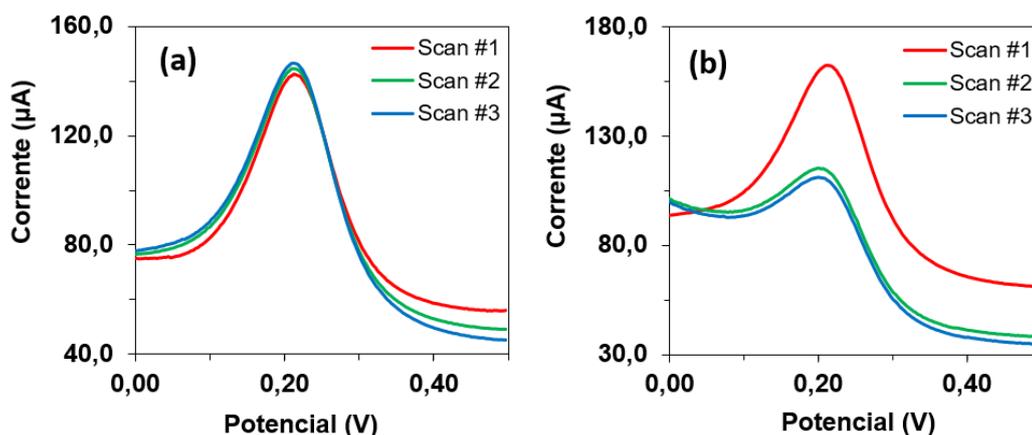


Figura 39. Voltamogramas de onda quadrada de uma solução de dopamina $1,00 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ em tampão pH 6,0 empregando o biossensor NPMP, onde: (a) foi aplicado o potencial de $-0,30 \text{ V}$ antes de cada varredura e (b) não houve aplicação do potencial entre as varreduras. Frequência de 100 Hz , amplitude de 100 mV e incremento de 3 mV .

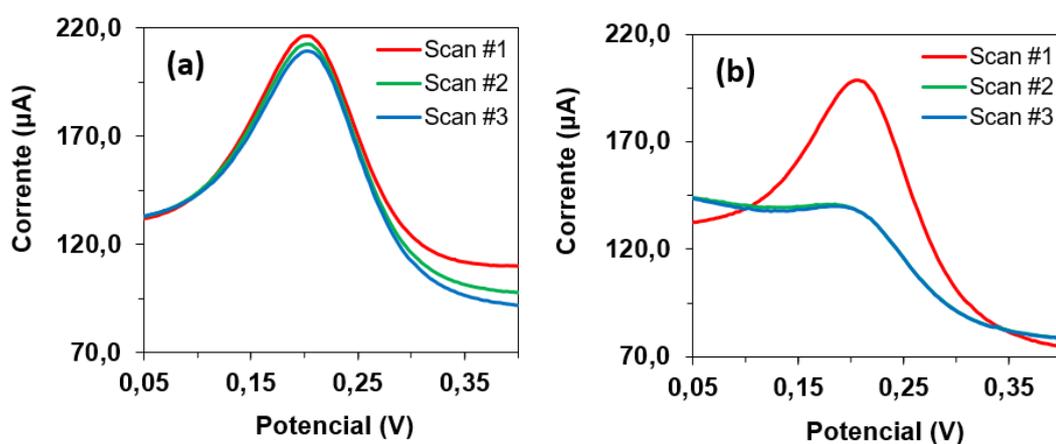


Figura 40. Voltamogramas de onda quadrada de uma solução de dopamina $1,00 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ em tampão pH 7,0 empregando o biossensor NTTP, onde: (a) foi aplicado o potencial de -0,30 V antes de cada varredura e (b) não houve aplicação do potencial entre as varreduras. Frequência de 100 Hz, amplitude de 100 mV e incremento de 3 mV.

A aplicação desse potencial também foi realizada nos experimentos dos outros três biossensores construídos posteriormente: NTTP-F, NTTP-R e NTT-HRP.

7.4 Repetitividade, reprodutibilidade e estabilidade

Para o teste de repetitividade (Tabela 12), foram realizadas 5 varreduras de VOQ com o mesmo biossensor em uma solução de dopamina $1,00 \times 10^{-4}$ mol/L em PBS pH 7,0. Para o biossensor NPMP, foi empregado o tampão PBS 6,0. O Biossensor NTTP apresentou uma excelente repetitividade, uma vez que houve pequena variação nas leituras, gerando um DPR de 1,5%, diferente do biossensor NPMP que apresentou um DPR de 6,1%.

Tabela 11. Teste de repetitividade do biossensor NTTP e NPMP.

Biossensor	Δi (μA)	DPR (%)
NTTP	$101,3 \pm 1,5$	1,5
NPMP	84 ± 5	6,1

Para o teste de reprodutibilidade (Tabela 13), foram empregados 3 biossensores e realizadas 5 varreduras de VOQ com cada um deles em uma solução de dopamina $1,00 \times 10^{-4}$ mol/L em PBS pH 7,0. Para o biossensor NPMP, foi empregado o tampão PBS 6,0. A reprodutibilidade do biossensor NTTP se mostrou satisfatória, indicando uma produção homogênea desses biossensores, com variação de leitura de 4%. O biossensor NPMP não apresentou um resultado aceitável, com DPR de 17%. Esse resultado provavelmente também seja devido a fraca ligação da peroxidase com as NPM.

Tabela 12. Teste de reprodutibilidade do biossensor NTTP.

Biossensor	Δi (μA)	DPR (%)
NTTP	104 ± 4	4,0
NPMP	62 ± 10	17

Para o teste de estabilidade, foram realizadas varreduras de voltametria cíclica nos dias 1º, 15º e 30º do biossensor ser construído, empregando-o em uma solução de dopamina $1,00 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ em PBS pH 7,0, que era preparada no dia do experimento. Os resultados são mostrados na Figura 42 e na Figura 43. Para o biossensor NPMP, foi empregado o tampão PBS 6,0. Para o biossensor NPMP, houve uma perda do sinal de corrente de pico na medição do 15º

dia de 9%. No 30º dia, o sinal cai para 86% do original. Li *et al.* (2012) também imobilizaram peroxidase em NPM por adsorção e, ao final de 30 dias, o eletrodo mantinha 85% do sinal inicial. Darwesh *et al.* (2019) imobilizaram peroxidase em NPM covalentemente para degradação de corante em rejeitos químicos. Após 120 dias, a enzima imobilizada apresentava perto de 100% da sua atividade inicial. Çevik *et al.* (2012) construíram um biossensor de peroxidase para detectar fenóis imobilizando a enzima de forma covalente às NPM-poliacrilato que, após 30 dias, apresentava mais de 90% do sinal inicial. Como pode ser observado nesses trabalhos, a imobilização covalente aumenta a durabilidade do biossensor.

Para o biossensor NTTP, houve uma perda no sinal de corrente de pico na medição do 15º dia de cerca de 17%. No 30º dia, o sinal cai para apenas 79% do sinal original. No trabalho de Nicolini *et al.* (2016), onde peroxidase comercial foi imobilizada em NTT para detecção de H₂O₂, o biossensor manteve 91% do sinal em 30 dias. Sović *et al.* (2011) realizaram um trabalho semelhante ao de Nicolini *et al.* (2016), em seu trabalho, o biossensor apresentava menos de 65% de sinal ao final de 30 dias de preparo para aqueles biossensores que estavam sendo utilizados durante esse período e 10% para biossensores que foram usados pela primeira vez no 30º dia.

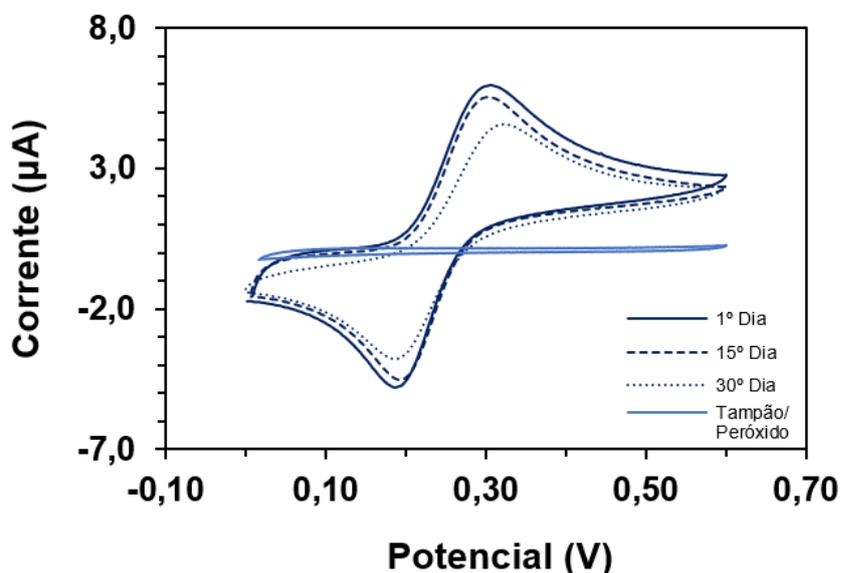


Figura 41. Voltamogramas cíclicos para o biossensores NPMP em uma solução de dopamina $1,00 \times 10^{-4}$ mol/L em PBS pH 6,0 e velocidade de varredura de 200 mV/s, em diferentes dias.

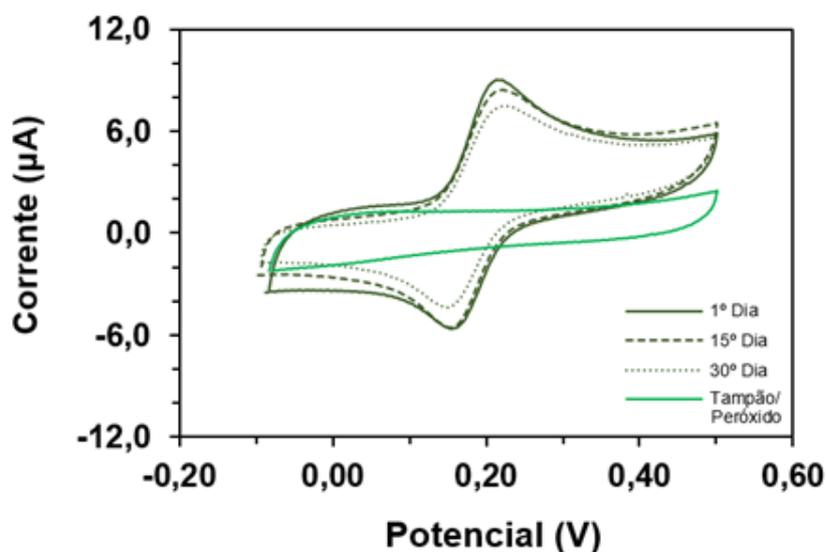


Figura 42. Voltamogramas cíclicos para o biossensores NTTP em uma solução de dopamina $1,00 \times 10^{-4}$ mol/L em PBS pH 7,0 e velocidade de varredura de 200 mV/s, em diferentes dias.

7.5 Curva de calibração

As Figuras 44 e na Figura 45 apresentam as curvas de calibração para a dopamina empregando os biossensores NPMP e NTTP. A faixa linear da curva de calibração para o biossensor NPMP foi de $4,98 \times 10^{-6}$ a $65,4 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ e a equação da reta ajustada é $\Delta i = 0,891 \times [\text{DOP}] - 0,224$ ($r = 0,9982$), com [DOP] em $\mu\text{mol L}^{-1}$ e Δi em μA . Para o biossensor NTTP, a faixa linear da curva de calibração foi de $4,98 \times 10^{-6}$ a $6,54 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ e a equação da reta ajustada é $\Delta i = 1,05 \times [\text{DOP}] - 2,30$ ($r = 0,9975$), com [DOP] em $\mu\text{mol L}^{-1}$ e Δi em μA . Cada ponto da reta corresponde à média de três medidas.

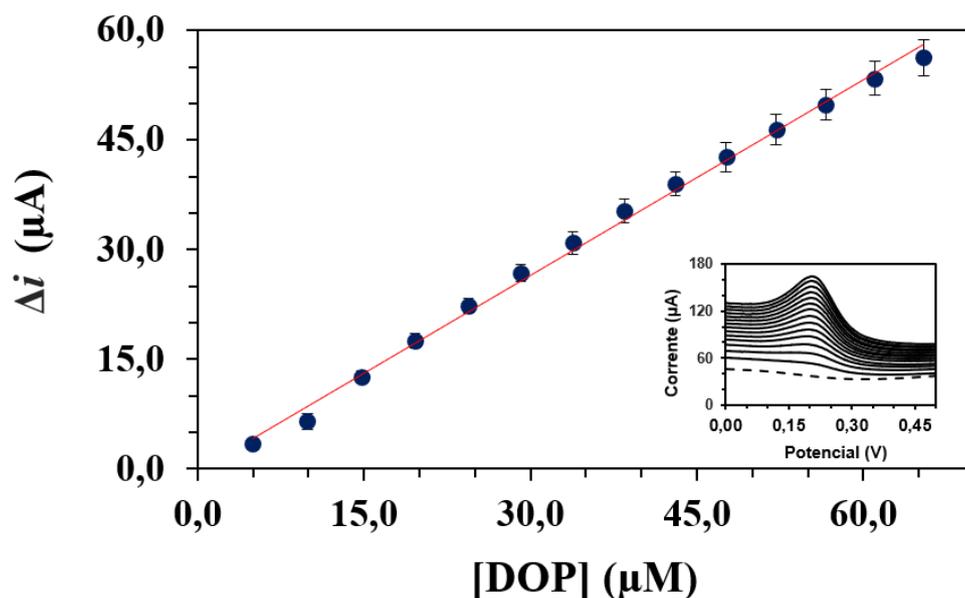


Figura 43. Curva de calibração da dopamina empregando o biossensor NPMP construído, PBS pH 6,0. Parâmetros da VOQ: frequência de 100 Hz, amplitude de 100 mV, incremento de 3 mV. Inserção: voltamogramas de cada ponto da curva analítica; linha tracejada = solução tampão.

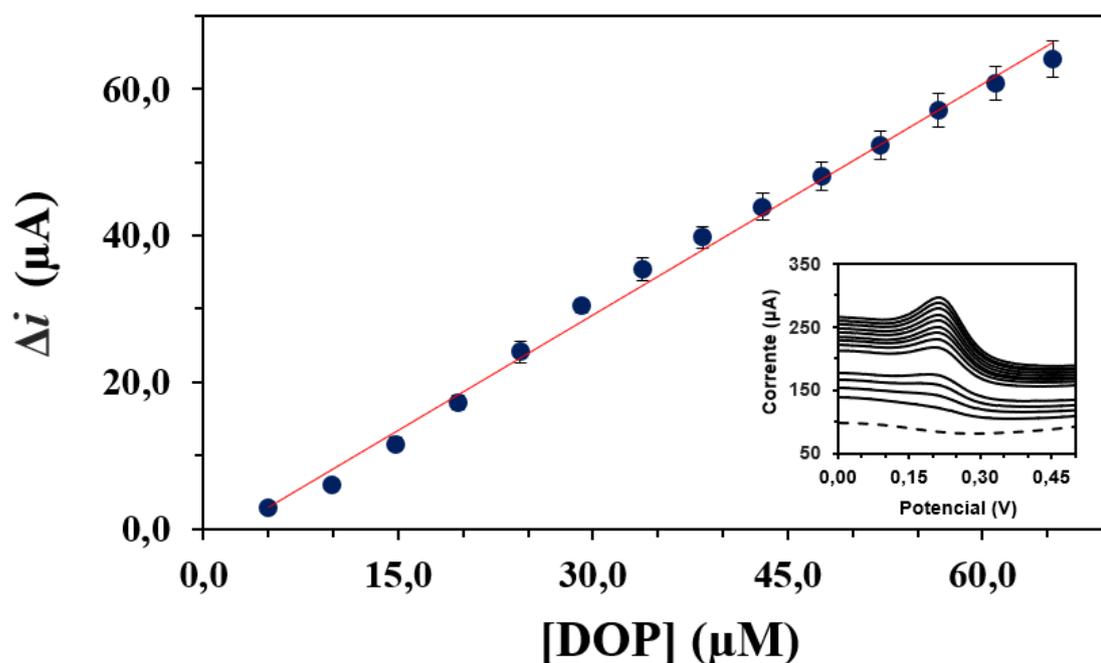


Figura 44. Curva de calibração da dopamina empregando o biossensor NTTTP construído, em PBS pH 7,0. Inserção: voltamogramas de cada ponto da curva analítica; linha tracejada = solução tampão.

7.6 Método Comparativo Espectrofotométrico

Foi construída uma curva analítica usando solução padrão de dopamina e a faixa linear da curva de calibração foi de $1,07 \times 10^{-5}$ a $6,86 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ e a equação da reta ajustada é $ABS = 2,38 \times 10^{-3}[DOP] + 1,15 \times 10^{-3}$, com $r = 0,99998$. Cada ponto da reta corresponde à média de três medidas (Figura 34).

A amostra diluída em água (Fator de diluição de 100) teve sua absorbância medida e este valor foi aplicado à equação da reta ajustada para a obtenção da concentração de dopamina.

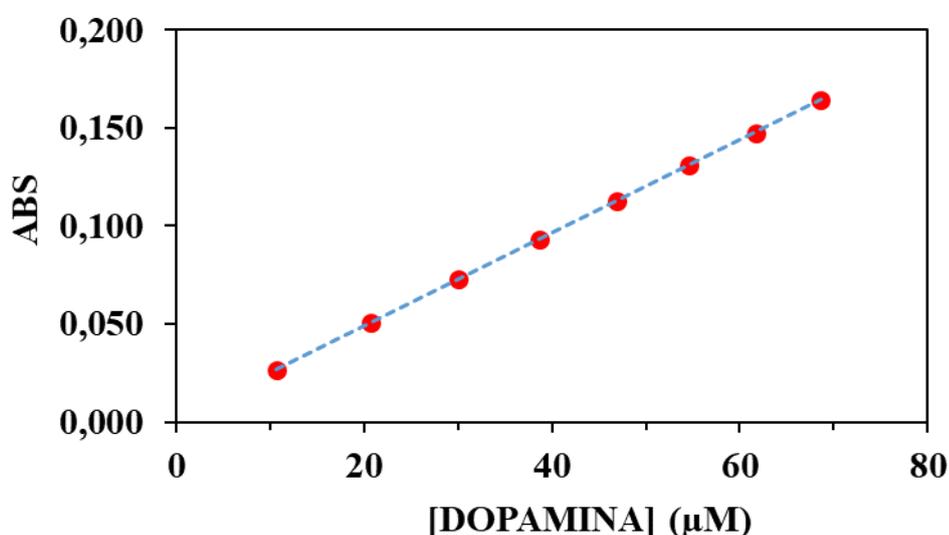


Figura 45. Gráfico da curva analítica da concentração de dopamina versus absorbância. Solução de dopamina preparada em água e $\lambda = 278$ nm.

A Tabela 10 apresenta os resultados do método comparativo. A concentração de dopamina na amostra comercial, com nível de confiança de 95%, foi de $4,97 \pm 0,06$ mg mL⁻¹. A amostra comercial é vendida na concentração de 5,00 mg mL⁻¹.

Tabela 13. Concentração da amostra comercial encontrada pelo método comparativo de espectrofotometria por UV.

Amostra Comercial	[Dopamina] (mg mL ⁻¹)	ER ¹ (%)
Alíquota 1	5,01	0,2%
Alíquota 2	4,95	1,0%
Alíquota 3	4,95	1,0%
Média	4,97	0,6%

¹ER = Erro relativo ao valor rotulado

7.7 Adição de padrão

As Figuras 46 e a Figura 47 apresentam os gráficos da adição de padrão de dopamina à amostra comercial.

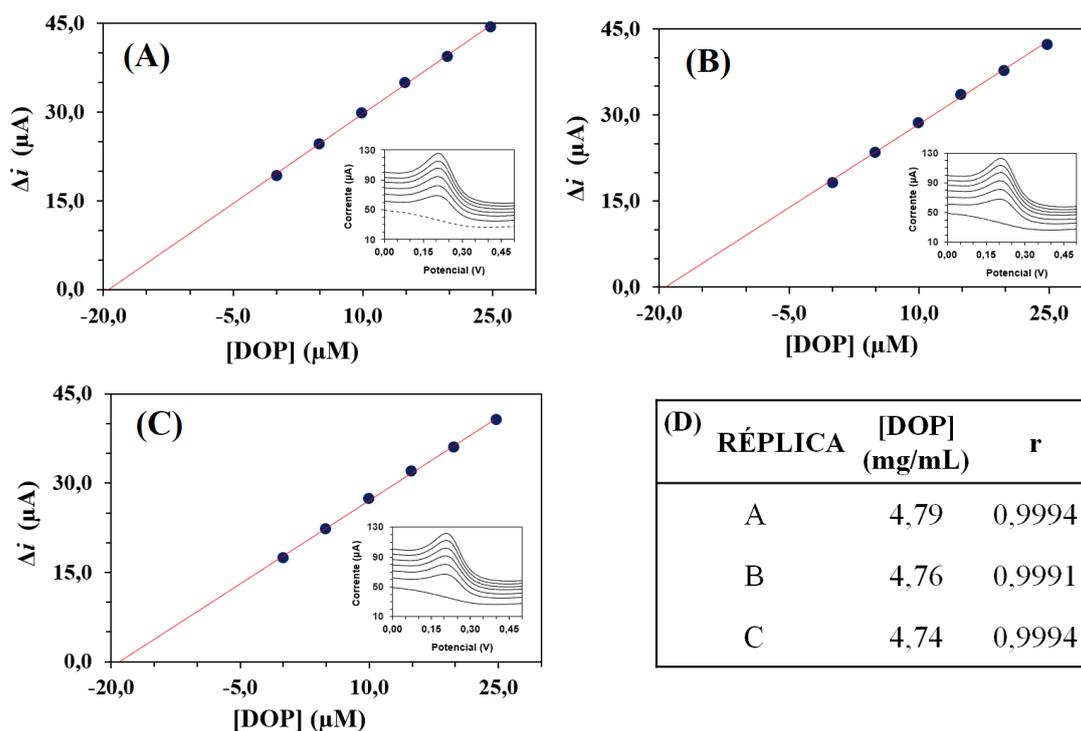


Figura 46. (A, B, C) Gráficos da adição de padrão em amostra comercial, em triplicata, empregando o biossensor NPMP. (D) Tabela com o valor encontrado da concentração de dopamina na amostra comercial em cada réplica e seus respectivos coeficientes de determinação (r). Inserção: voltamogramas de cada ponto da adição de padrão; linha tracejada = branco.

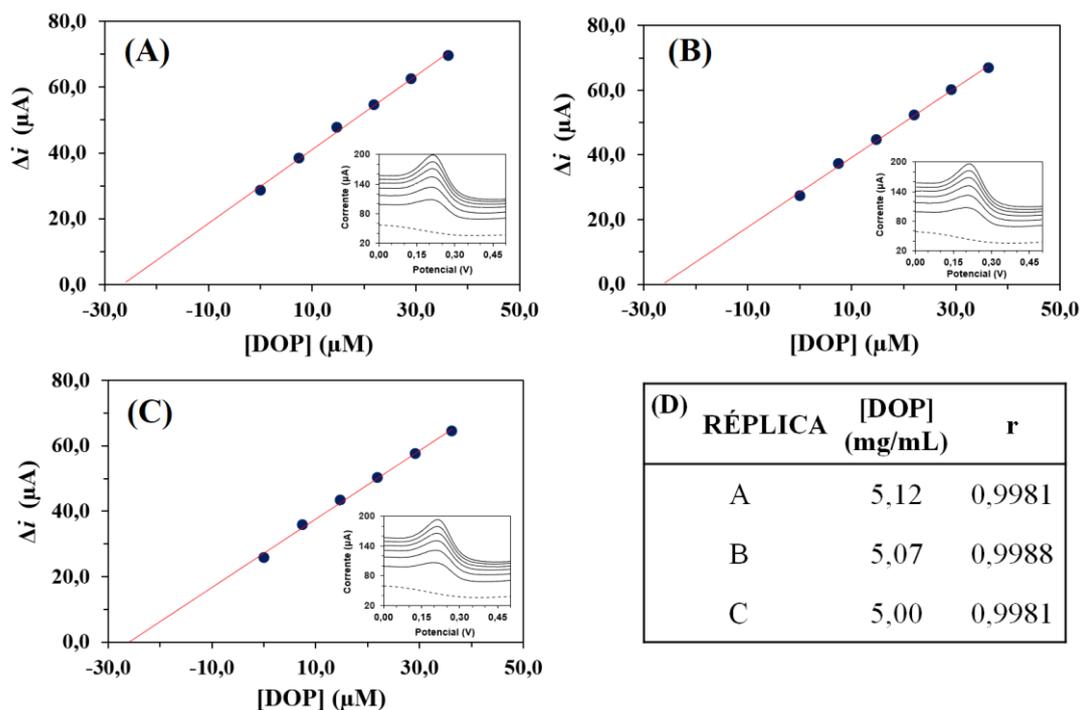


Figura 47. (A, B, C) Gráficos da adição de padrão em amostra comercial, em triplicata, empregando o biossensor NTTP. (D) Tabela com o valor encontrado da concentração de dopamina na amostra comercial em cada réplica e seus respectivos coeficientes de determinação (r). Inserção: voltamogramas de cada ponto da adição de padrão; linha tracejada = branco.

A Tabela 14 apresenta os valores encontrados para a determinação de dopamina na ampola comercial empregando os dois métodos: biossensores construídos e espectrofotométrico.

Tabela 14. Determinação de dopamina em amostra comercial empregando os biossensores NPMP e NTTP e o método comparativo.

Valor Rotulado	DOPAMINA (mg mL ⁻¹)			ERRO RELATIVO (%)			
	Método Comparativo	NTTP	NPMP	ER ₁	ER ₂	ER ₃	ER ₄
5,00	4,97 ± 0,04	5,04 ± 0,11	4,76 ± 0,04	1,2	1,8	4,8	4,2

n = 3; nível de confiança de 95%; ER₁ = biossensor NTTP *versus* valor rotulado; ER₂ = biossensor NTTP *versus* método comparativo. ER₃ = biossensor NPMP *versus* valor rotulado; ER₄ = biossensor NPMP *versus* método comparativo.

7.8 Comparação entre os biossensores NTTP e NPMP

As otimizações de amplitude e frequência visaram a obtenção de maiores valores de Δi para os biossensores NTTP e NPMP. Esses valores foram os mesmos dos obtidos para os dois biossensores: 100 mV e 100 Hz. O que pode indicar que a reação de oxirredução é a mesma na superfície dos dois eletrodos. As variações nos pHs ótimos para a atividade da peroxidase nas NPM e nos NTT podem ser atribuídas às distintas formas de ligação e às características superficiais únicas de cada nanomaterial. A presença de quitosana na superfície das NPM, com sua carga positiva, influencia as interações eletrostáticas, promovendo uma estabilização específica em pH mais baixos. Em contraste, nas NTT com ligação covalente, a estabilidade em pH neutro pode ser resultado da ancoragem robusta da enzima. Essas diferenças na ligação e composição superficial explicam as preferências de pH distintas para a atividade enzimática.

Em ambos os biossensores, a reação de oxirredução é controlada por difusão, de acordo com a equação de Randles-Sevick (Equação 4).

Para os eletrodos sem enzima imobilizada, ENT e ENPM, os aumentos da área efetiva, em comparação ao eletrodo de pasta de carbono não modificada, foram de 0,0182 cm² e 0,0057 cm², respectivamente. Esse resultado mostra que os NTT são melhores amplificadores de sinal que as NPM.

Para ambos os biossensores foi possível a construção de uma curva analítica de praticamente a mesma faixa linear de detecção, com o NTTP sendo 7% maior. O LD conseguido com o NPMP foi um pouco menor, 1,92 μmol L⁻¹ contra 2,46 μmol L⁻¹ do NTTP. Isso pode ser devido ao melhor coeficiente de determinação da reta ajustada da faixa linear obtida, uma vez que o limite inferior desta faixa foi igual para os dois biossensores e a incerteza do coeficiente linear é empregado para o cálculo do LD (Equação 2).

O biossensor NPMP não mostrou resultados tão bons quanto o biossensor NTTP, principalmente nos testes de repetitividade e reprodutibilidade. Isso pode ser devido à metodologia de funcionalização dos NTT. Na adição de padrão à amostra comercial, o erro do biossensor NPMP, em comparação ao valor rotulado, foi 4x maior. Comparado ao método de referência, foi cerca 2x maior. Entretanto, os erros mostrados na Tabela 14 são aceitáveis.

A Figura 48 mostra a comparação dos voltamogramas cíclicos do estudo de estabilidade dos biossensores. Neste teste, o biossensor NPMP apresentou um melhor resultado que o biossensor NTTP. Isto pode ser devido a uma possível melhor biocompatibilidade da

quitosana com a enzima em comparação aos NTT. Em outra consideração, a ligação covalente da peroxidase com o NTT (que contribuiu para uma boa repetitividade e reprodutibilidade). Apesar da estabilidade do biossensor NTTP ser um pouco menor que a do biossensor NPMP no 30º dia (79% e 86% do sinal original, respectivamente), o sinal do biossensor NTTP foi superior no 30º dia ao sinal do biossensor NPMP no 1º dia. Isso pode ser explicado pelo fato de os NTT serem um nanomaterial com maior condutividade do que as NPM.

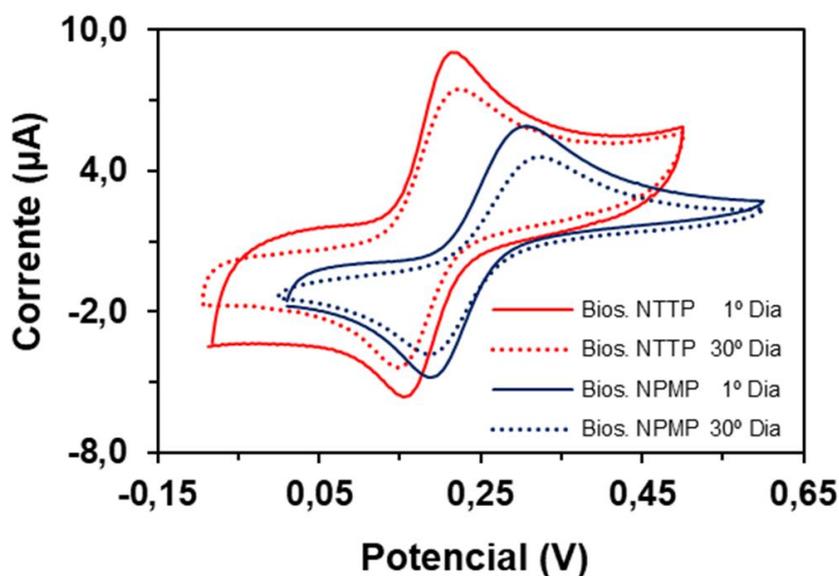


Figura 48. Comparação dos biossensores NTTP (PBS pH 7,0) e NPMP (PBS pH 6,0) em uma solução de dopamina $1,00 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$.

Por esses motivos apresentados acima, os demais 3 biossensores construídos nesta tese empregam apenas os NTT como material de suporte para a imobilização da peroxidase e consequente construção dos três biossensores posteriores.

CAPÍTULO 8. BIOSSENSORES NTTP-F e NTTP-R

Neste capítulo serão apresentados os resultados de caracterização dos biossensores empregando o extrato EMX-F e EMX-R imobilizado nos nanotubos de titanato (NTT). Os parâmetros voltamétricos otimizados foram os mesmos empregados para os biossensores NTTP, apresentados no Capítulo 7.

8.1 Repetitividade, reprodutibilidade e estabilidade

Para o teste de repetitividade, foram realizadas 5 varreduras de VOQ com o mesmo biossensor em uma solução de dopamina $5,00 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ em PBS pH 7,0. Os resultados são mostrados na Tabela 15. O biossensores apresentaram um bom resultado, com um valor 2,2% e 2,4 de desvio padrão relativo (DPR), respectivamente para os biossensores NTTP-F e NTTP-R.

Tabela 15. Teste de repetitividade do biossensor NTTP-F, NTTP-R e NTTP.

Biossensor	Δi (μA)	DPR (%)
NTTP-F	$32,4 \pm 0,7$	2,2
NTTP-R	$32,7 \pm 0,8$	2,4
NTTP	$101,3 \pm 1,5$	1,5

Para o teste de reprodutibilidade, foram empregados 3 biossensores e realizadas 5 varreduras de VOQ com cada um deles nas mesmas condições do teste de repetitividade. Os resultados são mostrados na Tabela 16.

Tabela 16. Teste de reprodutibilidade dos biossensor NTTP-F, NTTP-R e NTTP.

Biossensor	Δi (μA)	DPR (%)
NTTP-F	$32,4 \pm 1,6$	5,0
NTTP-R	$31,2 \pm 1,4$	4,3
NTTP	104 ± 4	4,0

O biossensor NTTP apresentou resultados de repetibilidade e reprodutibilidade melhores do que os biossensores NTTP-F e NTTP-R. Isso provavelmente é devido ao método de imobilização do biossensor NTTP que não empregou a lavagem dos NTT após a imobilização. Ressalta-se que os três biossensores apresentaram boas repetibilidade e reprodutibilidade. Decarli *et al.* (2022) construíram um biossensor de lacase para determinar dopamina e obtiveram repetitividade e reprodutibilidade de 8,5% e 5,3%, respectivamente.

Para o teste de estabilidade, foram realizadas varreduras de VOQ por 30 dias empregando o biossensor construído, empregando-o em uma solução de dopamina $5,00 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ em PBS pH 7,0, que era preparada no dia do experimento. Os valores de Δi obtidos em cada dia são mostrados na Figura 49. Cada medida foi realizada em triplicata.

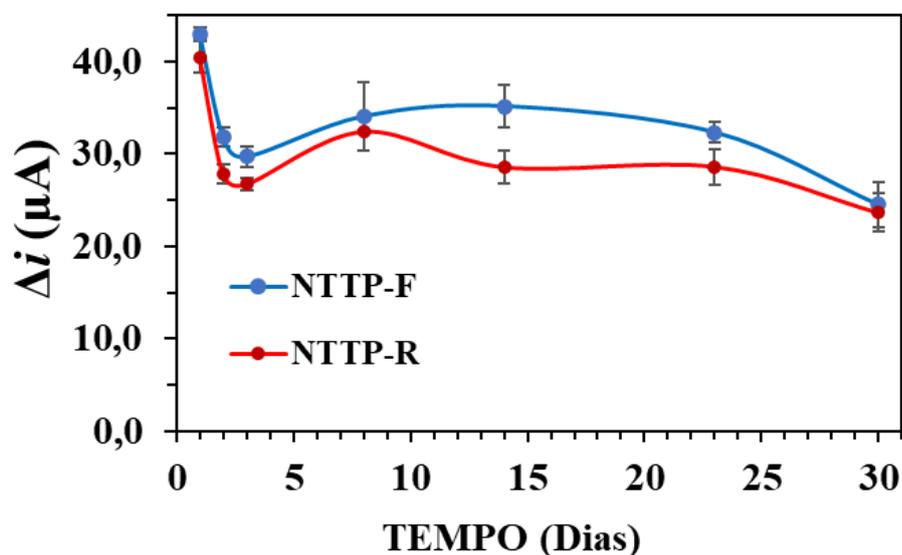


Figura 49. Gráfico da estabilidade dos biossensor NTTP-F e NTTP-R. Valores de Δi da VOQ em uma solução de dopamina $5,00 \times 10^{-5}$ e peróxido de hidrogênio $2,00 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹ em PBS pH 7,0 em diferentes dias. Parâmetros da VOQ: frequência 100 Hz, amplitude 100 mV e incremento de potencial de 5 mV

Para ambos os biossensores, o valor de Δi teve uma queda grande do primeiro para o segundo dia e no terceiro. Para o biossensor NTTP-F, apresentou um leve aumento nos valores, provavelmente devido à incerteza das medidas, por cerca de 2 semanas. O biossensor NTTP-R, também apresentou aumento a partir do oitavo dia, provavelmente à incerteza das medidas, e voltando para um valor próximo dos dias 2 e 3, mantendo-se assim até o fim da terceira semana. Em ambos os eletrodos, o sinal caiu para 58% do valor inicial. Considerando que ambos os

biossensores utilizaram a mesma técnica de imobilização enzimática, não é surpreendente que tenham alcançado resultados semelhantes em termos de estabilidade.

8.2 Curva de calibração

As Figuras 50 e 51 apresentam as curvas de calibração para a dopamina empregando os biossensores NTTP-F e NTTP-R. Para o biossensor NTTP-F, a faixa linear da curva de calibração foi de $4,98 \times 10^{-6}$ a $5,66 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ e a equação da reta ajustada é $\Delta i = 0,656 \times [\text{DOP}] - 2,92$ ($r = 0,9997$), com [DOP] em $\mu\text{mol L}^{-1}$ e Δi em μA . Cada ponto da reta corresponde à média de três medidas. O LD calculado foi 1,20 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e o LQ de 3,99 $\mu\text{mol L}^{-1}$. O biossensor NTTP-R apresentou a mesma faixa linear da curva de calibração e a equação da reta ajustada é $\Delta i = 0,771 \times [\text{DOP}] - 2,13$ ($r = 0,9998$), com [DOP] em $\mu\text{mol L}^{-1}$ e Δi em μA . Cada ponto da reta corresponde à média de três medidas. O LD calculado foi 1,04 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e o LQ de 3,45 $\mu\text{mol L}^{-1}$.

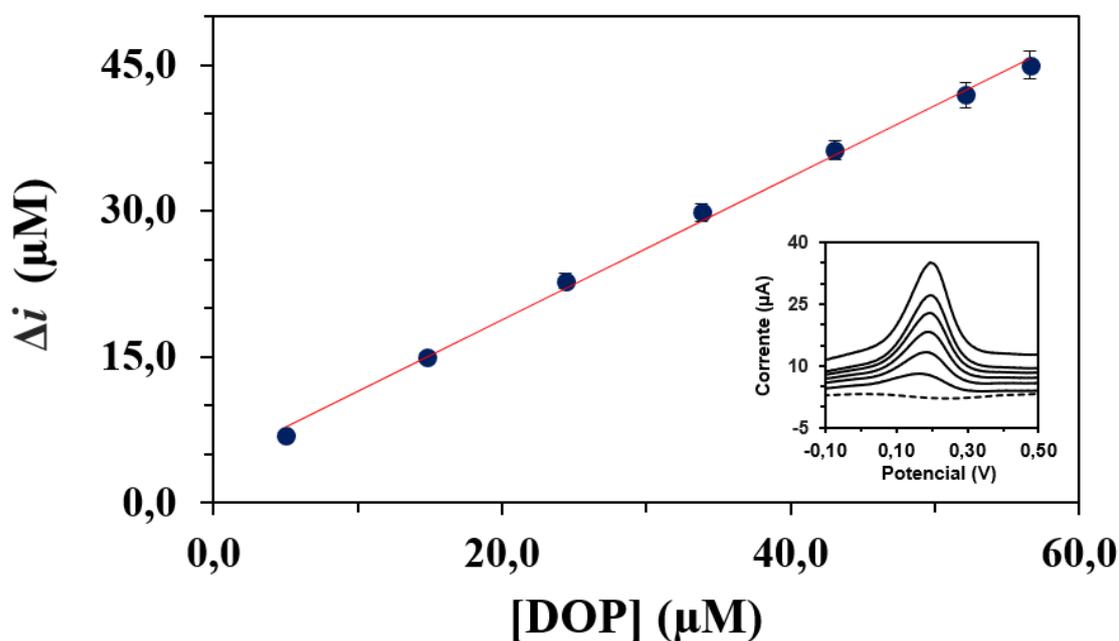


Figura 50. Curva de calibração da dopamina empregando o biossensor NTTP-F construído. Inserção: voltamogramas de cada ponto da curva analítica; linha tracejada = branco.

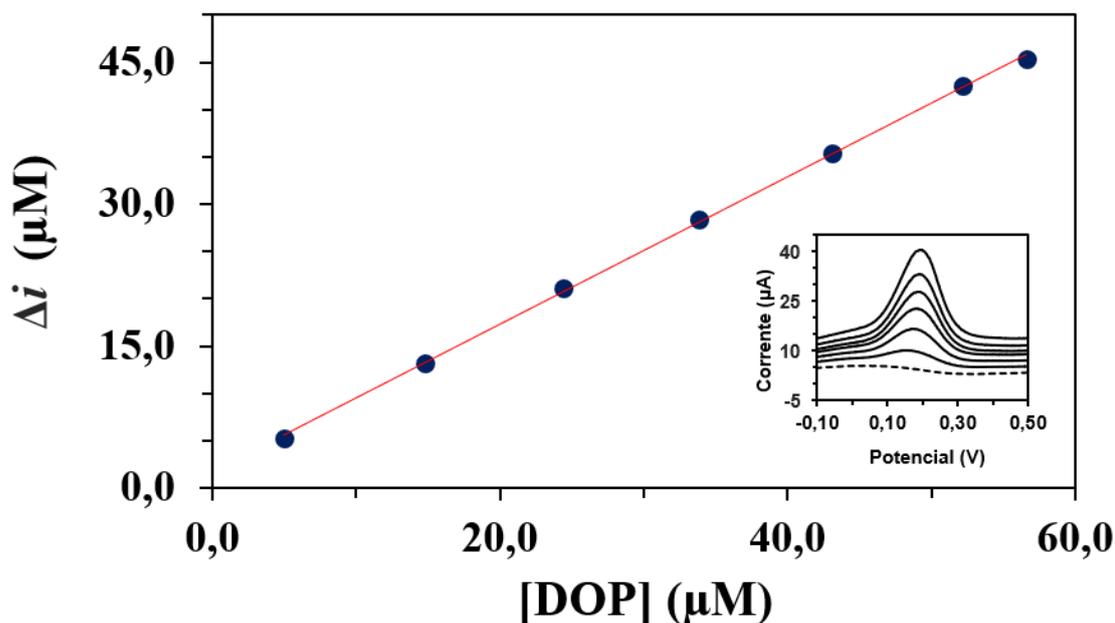


Figura 51. Curva de calibração da dopamina empregando o biossensor NTTP-R construído. Inserção: voltamogramas de cada ponto da curva analítica; linha tracejada = branco.

8.3 Adição de padrão

As Figuras 52 e 53 apresentam os gráficos da adição de padrão de dopamina realizada à amostra comercial e a Tabela 17 compara os resultados obtidos nesses testes.

O biossensor NTTP-F apresentou medidas fora do limite de confiança de 5%, não sendo possível alcançar um valor de concentração próximo do real (5,00 mg/mL). Já o biossensor NTTP-R conseguiu um bom resultado, com a determinação tendo um erro de apenas -0,2% em relação ao valor rotulado. Uma possível explicação é a maior estabilidade da enzima no extrato com mais componentes naturais – EMX-R.

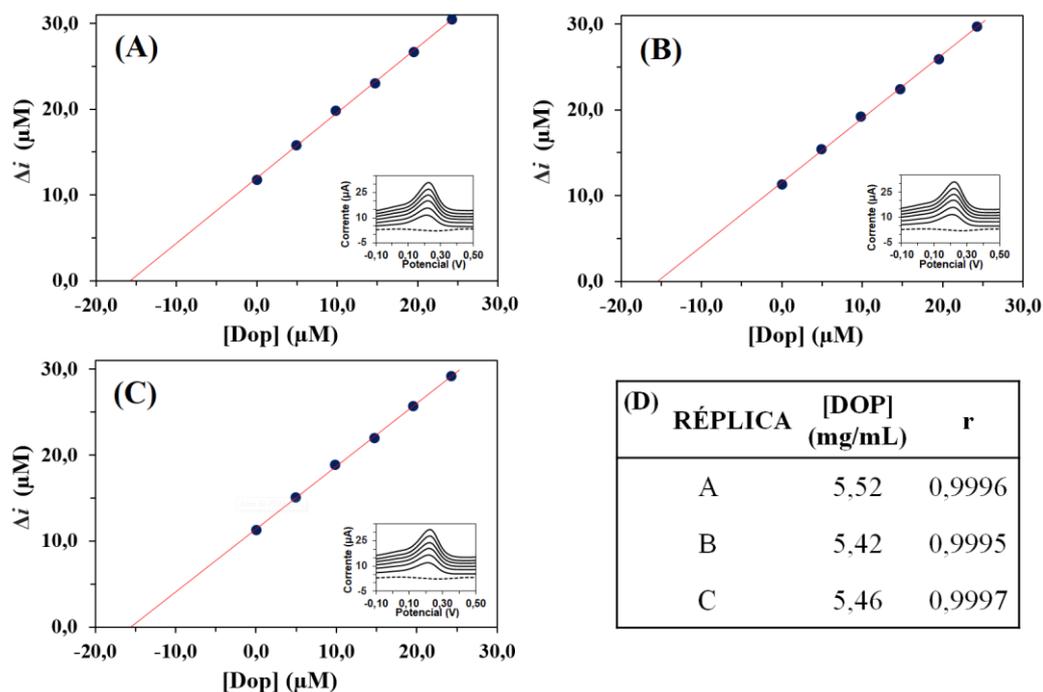


Figura 52. Gráficos da adição de padrão em amostra comercial para cada réplica (A, B, C) empregando o biossensor construído de NTTP-F. (D) Tabela com o valor encontrado da concentração de dopamina na amostra comercial em cada réplica e seus respectivos coeficientes de determinação (r). Inserção: voltamogramas de cada ponto da adição de padrão; linha tracejada = branco.

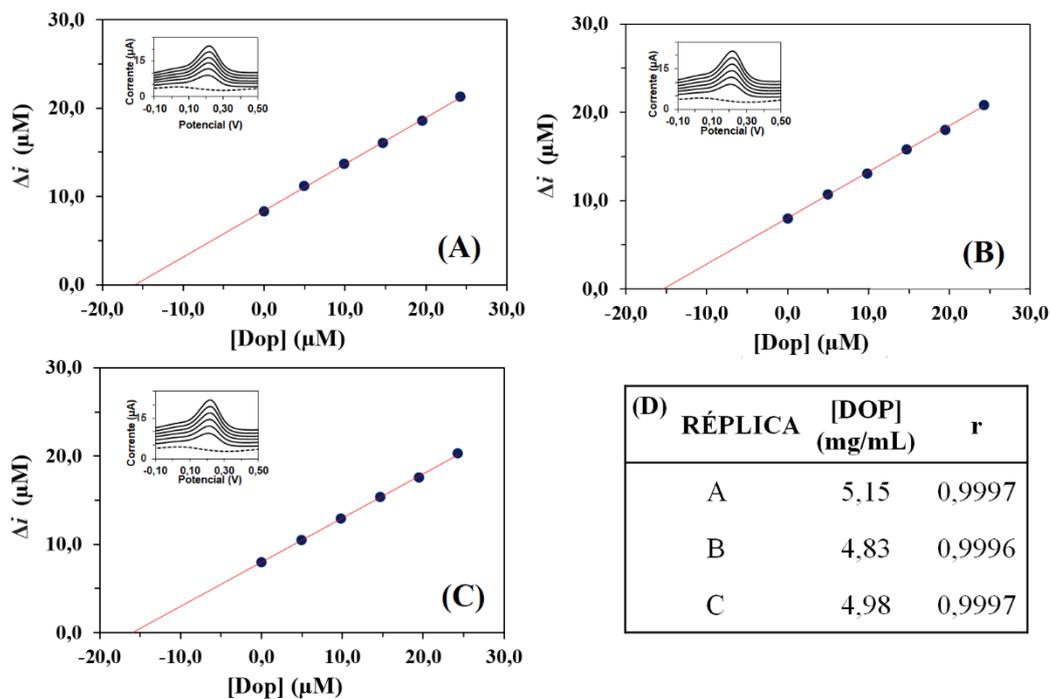


Figura 53. Gráficos da adição de padrão em amostra comercial, em triplicata, empregando o biossensor construído de NTTP-R. (D) Tabela com o valor encontrado da concentração de dopamina na amostra comercial em cada réplica e seus respectivos coeficientes de determinação (r). Inserção: voltamogramas de cada ponto da adição de padrão; linha tracejada = branco.

Tabela 17. Determinação de dopamina em amostra comercial empregando os biossensores NTTP-R e NTTP-F e o método comparativo.

DOPAMINA (mg mL ⁻¹)				ERRO RELATIVO (%)			
Valor Rotulado	Método Comparativo	NTTP-F	NTTP-R	ER ₁	ER ₂	ER ₃	ER ₄
5,00	4,97 ± 0,04	5,47 ± 0,09	4,99 ± 0,40	9,4	10,0	0,2	0,4

n = 3; nível de confiança de 95%; ER₁ = biossensor NTTP-F *versus* valor rotulado; ER₂ = biossensor NTTP-F *versus* método comparativo; ER₃ = biossensor NTTP-R *versus* valor rotulado; ER₄ = biossensor NTTP-R *versus* método comparativo.

CAPÍTULO 9. BIOSSENSOR NTT-HRP

Neste capítulo serão discutidos os resultados da caracterização eletroquímica do biossensor preparado com a enzima HRP comercial imobilizada nos NTT (NTT-HRP).

9.1 Otimização dos parâmetros experimentais da voltametria de onda quadrada

Os valores de Δi das otimizações do biossensor NTT-HRP são apresentados nas Figuras 54 a 56.

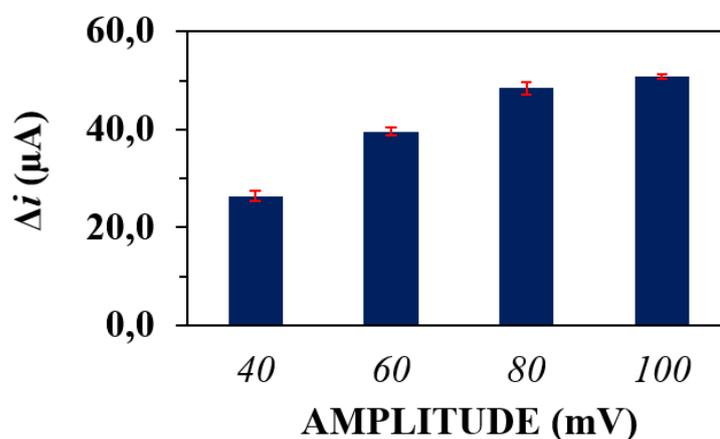


Figura 54. Estudo do efeito da amplitude da VOQ empregando o biossensor NTT-HRP. Solução de dopamina $2,00 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ em PBS pH 7,0 com diferentes amplitudes de onda quadrada e frequência de 100 Hz.

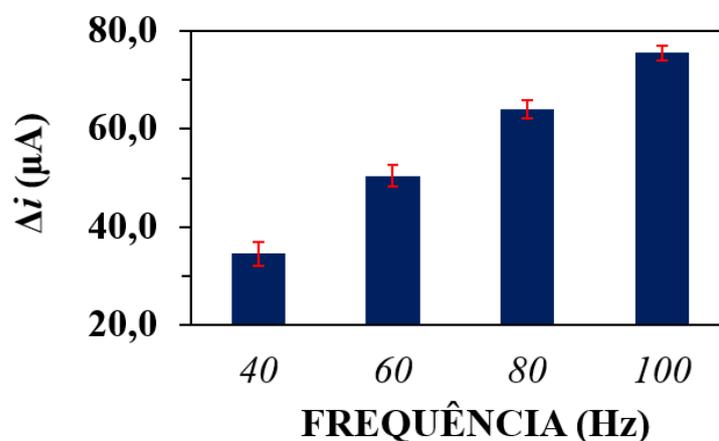


Figura 55. Estudo do efeito da frequência da VOQ empregando o biossensor NTT-HRP. Solução de dopamina $2,00 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ em PBS pH 7,0 com diferentes frequências e amplitude de 100 mV.

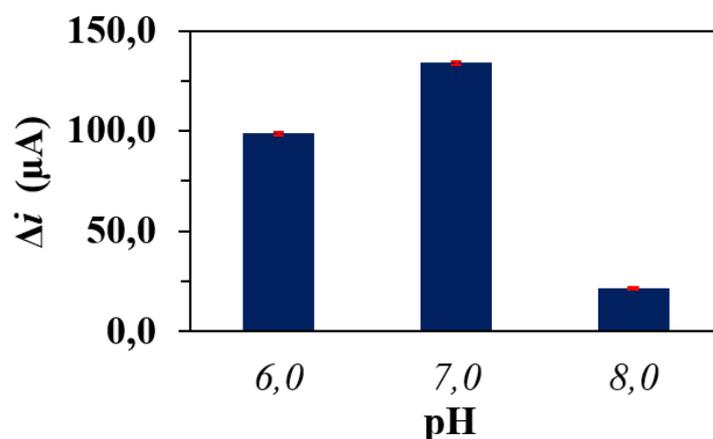


Figura 56. Estudo do efeito do pH da solução tampão empregando o biossensor NTT-HRP. Soluções de dopamina $2,00 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ em PBS com diferentes valores de pH. Parâmetros da VOQ: frequências de 100 Hz e amplitude de 100 mV.

Dessa forma, os valores ótimos dos parâmetros estudados são apresentados na Tabela 18. Estes valores são os mesmos encontrados para o biossensor NTTP, preparado com extrato de maxixe EMX.

Tabela 18. Valores ótimos das variáveis experimentais para o biossensor NTT-HRP.

pH	Amplitude (mV)	Frequência (Hz)
7,0	100	100

9.2 Repetitividade, reprodutibilidade e estabilidade

Para o teste de repetitividade, foram realizadas 5 varreduras de VOQ com o mesmo biossensor em uma solução de dopamina $5,00 \times 10^{-5}$ mol/L em PBS pH 7,0. Os resultados são mostrados na Tabela 19. O biossensor apresentou um resultado bom, com um valor de desvio padrão relativo (DPR) igual a 3,8%.

Tabela 19. Teste de repetitividade do biossensor NTT-HRP.

n	Δi (μA)	DPR (%)
5	$33,7 \pm 1,3$	3,8

Para o teste de reprodutibilidade, foram empregados 3 biossensores e realizadas 5 varreduras de VOQ com cada um deles nas mesmas condições do teste de repetitividade. Os resultados são mostrados na Tabela 20. O biossensor não apresentou um resultado aceitável, com o desvio padrão relativo acima de 5,0%.

Tabela 20. Teste de reprodutibilidade do biossensor NTT-HRP.

n	Δi (μA)	DPR (%)
15	$35,6 \pm 3,0$	8,4

Para o teste de estabilidade, foram realizadas varreduras de VOQ por 30 dias empregando o biossensor construído, empregando-o em uma solução de dopamina $5,00 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ em PBS pH 7,0, que era preparada no dia do experimento. Os valores de Δi obtidos em cada dia são mostrados na Figura 57. Cada medida foi realizada em duplicata.

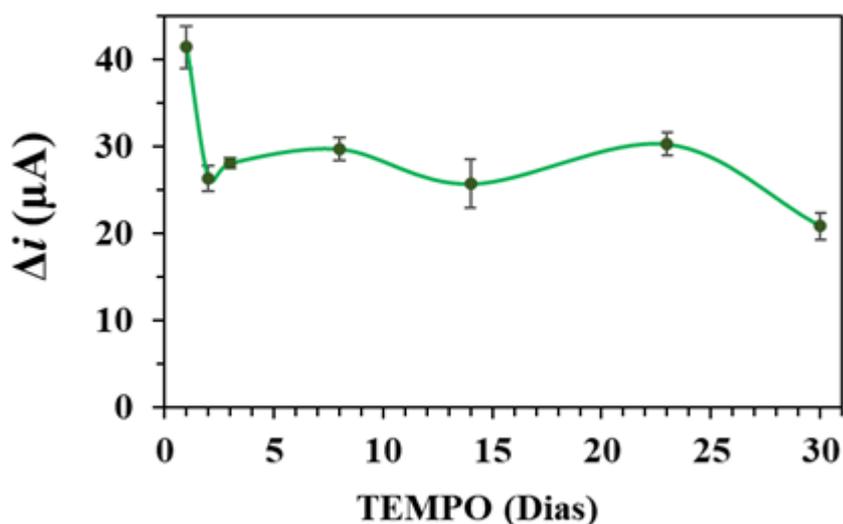


Figura 57. Gráfico da estabilidade do biossensor NTT-HRP. Valores de Δi da VOQ em uma solução de dopamina $5,00 \times 10^{-5}$ e peróxido de hidrogênio $2,00 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹ em PBS pH 7,0 em diferentes dias. Parâmetros da VOQ: frequência 100 Hz, amplitude 100 mV e incremento de potencial de 5 mV

Assim como nos biossensor NTTP-F e de NTTP-R, o valor de Δi teve uma queda grande do primeiro para o segundo dia, mantendo-se relativamente estável (considerando as incertezas) por cerca de 3 semanas. Por fim, caiu para 50% do valor inicial.

9.3 Curva de calibração

A Figura 58 apresenta a curva de calibração para a dopamina. A faixa linear da curva de calibração foi de $4,98 \times 10^{-6}$ a $5,66 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ e a equação da reta ajustada é $\Delta i = 0,488 \times [\text{DOP}] - 1,62$ ($r = 0,9994$), com [DOP] em $\mu\text{mol L}^{-1}$ e Δi em μA . Cada ponto da reta corresponde à média de três medidas. O LD calculado foi $1,83 \mu\text{mol L}^{-1}$ e o LQ de $6,10 \mu\text{mol L}^{-1}$.

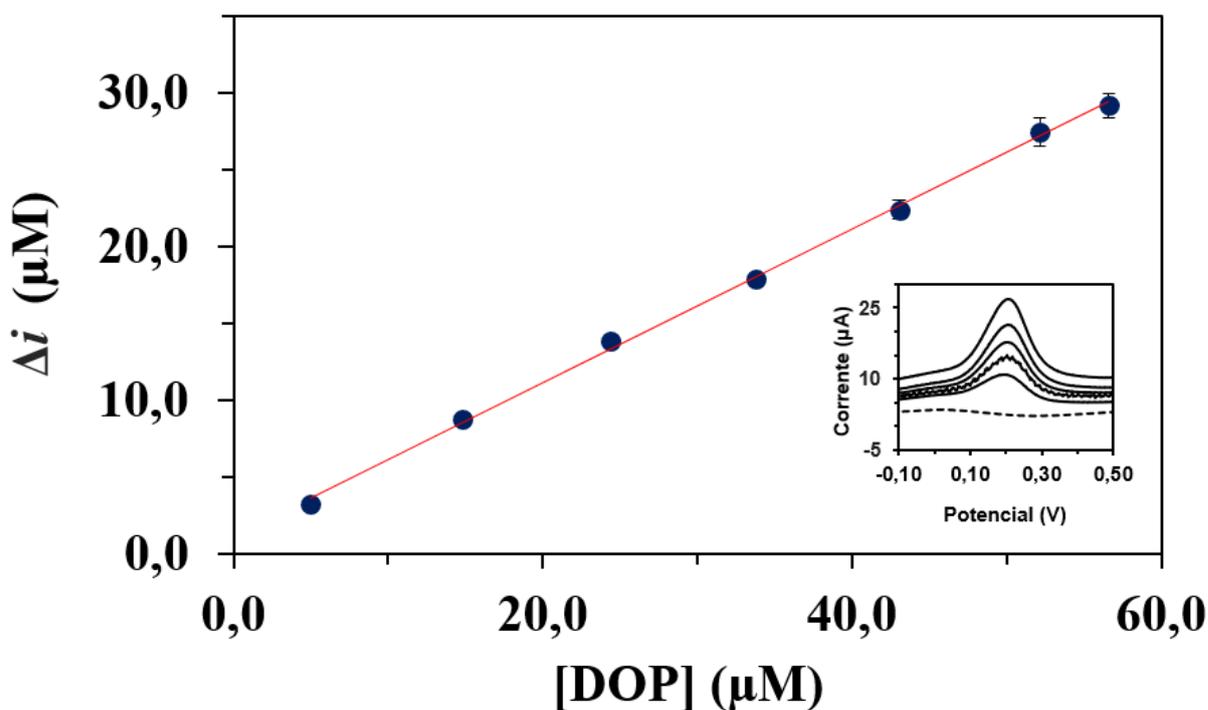


Figura 58. Curva de calibração da dopamina empregando o biossensor NTT-HRP construído. Inserção: voltamogramas de cada ponto da curva analítica; linha tracejada = branco.

9.4 Adição de padrão

A Figura 59 apresenta os gráficos da adição de padrão de dopamina à amostra comercial e a Tabela 21 compara os resultados obtidos com o valor rotulado e com o método de comparação.

Assim como biossensor NTTP-R, o biossensor NTT-HRP conseguiu um bom resultado, com a determinação tendo um erro de apenas -0,2% em relação ao valor rotulado.

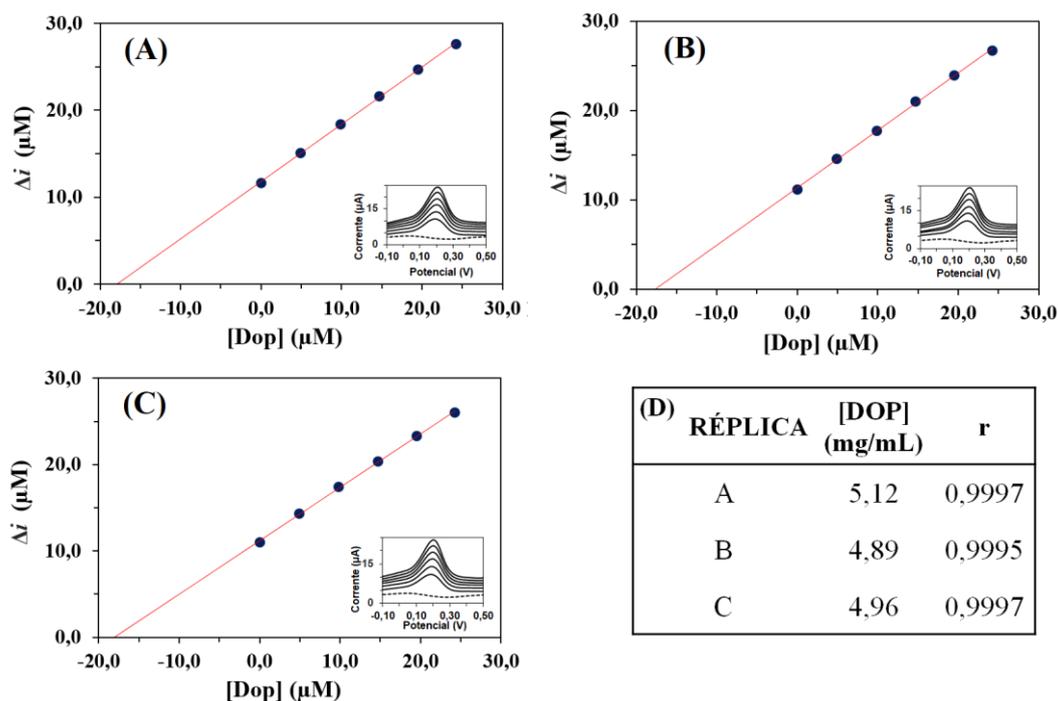


Figura 59. (A, B, C) Gráficos da adição de padrão em amostra comercial, em triplicata, empregando o biossensor construído de NTT-HRP. (D) Tabela com o valor encontrado da concentração de dopamina na amostra comercial em cada réplica e seus respectivos coeficientes de determinação (r). Inserção: voltamogramas de cada ponto da adição de padrão; linha tracejada = branco.

Tabela 21. Determinação de dopamina em amostra comercial empregando o biossensor NTT-HRP construído e o método comparativo.

DOPAMINA (mg mL ⁻¹)			ERRO RELATIVO (%)	
Valor Rotulado	Método Comparativo	Biossensor de NTT-HRP	ER ₁	ER ₂
5,00	4,97 ± 0,04	4,99 ± 0,22	0,2	0,4

n = 3; nível de confiança de 95%; ER₁ = biossensor NTT-HRP *versus* valor rotulado; ER₂ = biossensor NTT-HRP *versus* método comparativo.

CAPÍTULO 10. COMPARAÇÃO DOS BIOSSENSORES NPMP, NTTP, NTTP-R, NTTP-F E NTT-HRP

Neste capítulo serão discutidos os resultados da caracterização eletroquímica do biossensor preparado com a enzima HRP comercial imobilizada nos NTT (NTTP-HRP).

Após isso, os resultados serão comparados com os resultados dos biossensores que empregaram o extrato de maxixe: NTTP, NTTP-F e NTTP-R.

Em relação aos experimentos de repetitividade e reprodutibilidade, os biossensores NTTP-R e NTTP-F apresentaram resultados semelhantes e bons. O biossensor NTT-HRP também apresentou bons resultados, mas não tanto quanto os dois que empregaram o extrato de maxixe. Isto pode ser devido à melhor estabilidade da enzima no extrato natural. Frequentemente, extratos enzimáticos apresentam maior estabilidade em comparação com enzimas purificadas devido à presença de uma combinação de componentes que oferecem proteção contra oxidação e desnaturação (ROSA *et al.*, 2020, OLIVEIRA, 2007; OLIVEIRA *et al.*, 2012). Por fim, destaca-se que o biossensor NTTP obteve as melhores reprodutibilidade e repetitividade dos 4 biossensores de NTT construídos, possivelmente devido à metodologia de não lavagem dos NTT. Existem algumas hipóteses do que esta lavagem do nanomaterial pode ter acarretado:

- Durante a lavagem, é possível que alguns componentes essenciais do extrato de maxixe tenham sido removidos;
- A lavagem da nanopartícula pode ter causado mudanças no ambiente microscópico ao redor das enzimas imobilizadas, afetando sua estrutura tridimensional e sua capacidade de interação com os substratos.

A estabilidade apresentada pelos biossensores NTT-HRP, NTTP-F e NTTP-R (e mostrada na Figura 60) é muito baixa (média de 55% do sinal inicial) comparada à apresentada nos biossensores de NTTP, que ficou em cerca de 80% depois de 30 dias. Isto pode ser devido à lavagem das nanopartículas, que não foi realizada nos 2 primeiros biossensores (NTTP e NPMP). Comparando a estabilidade dos biossensores NTT-HRP, NTTP-F e NTTP-R entre eles, não foi verificada alguma diferença relevante, apenas uma leve tendência do biossensor NTTP-F ter apresentado um sinal maior em todos os dias. Porém, ele apresentou a mesma intensidade do sinal dos outros dois biossensores ao final dos 30 dias, considerando-se o desvio-

padrão. Gaspar *et al.* (2000) também obteve estabilidade semelhante de biossensores construído com HRP e com extratos de batata-doce e de tabaco.

Assim como nos biossensor NTTP-F e NTTP-R, o valor de Δi teve uma queda grande do primeiro para o segundo dia, mantendo-se relativamente estável (considerando as incertezas) por cerca de 3 semanas. Por fim, caiu para 50% do valor inicial.

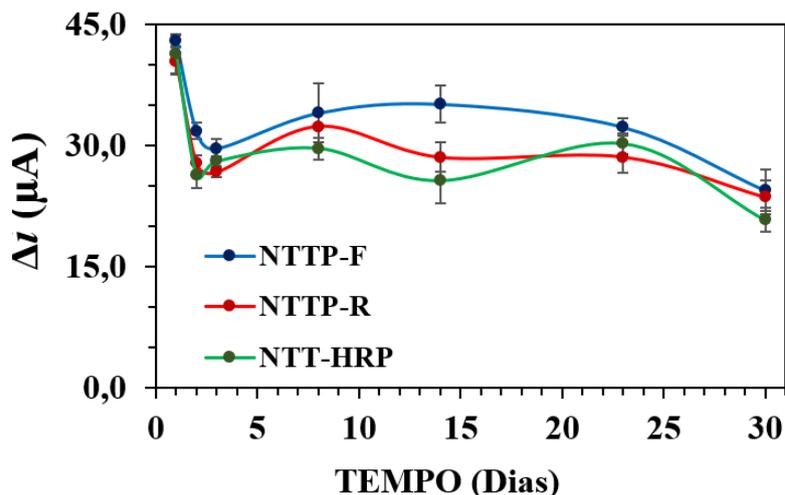


Figura 60. Gráfico da estabilidade dos biossensores de NTTP-F, de NTTP-R e de NTT-HRP. Valores de Δi da VOQ em uma solução de dopamina $5,00 \times 10^{-5}$ e peróxido de hidrogênio $2,00 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em PBS pH 7,0 em diferentes dias. Parâmetros da VOQ: frequência 100 Hz, amplitude 100 mV e incremento de potencial de 5 mV

A Tabela 22 apresenta com alguns trabalhos presentes na literatura para a determinação de dopamina.

Tabela 22. Comparação de biossensores para determinação dopamina.

Eletrodo	Faixa Linear ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	LD ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Referência
PC / Lacase / Surfactantes zwitteriônicos	0,99 – 67,8	0,252	Decarli <i>et al.</i> , 2022
PC / Peroxidase de <i>Araucaria Angustifolia</i> / NPP	9,9 - 1600	0,90	Fritzen-Garcia <i>et al.</i> , 2009
PC / HRP / NPP	17 - 1900	0,20	Fritzen-Garcia <i>et al.</i> , 2013
PC / Catalase / ZnO	5,0 - 31	3,0	Fooladsaz <i>et al.</i> , 2012
Eletrodo de Ouro / Tirosinase / Porfirina - Co (II)	2,0 - 30	0,43	Florescu e David, 2017
PC / Tecido de banana / NTCPM	10 - 30	2,09	Raof <i>et al.</i> , 2011

LD = Limite de Detecção; PC = pasta de carbono; NPP = nanopartículas peguilladas de poliuretano; HRP = peroxidase de *Armoracia rusticana*; NTCPM = nanotubos de carbono de paredes múltiplas

Apesar de não apresentar os melhores valores de faixa linear e LD, todos os biossensores deste trabalho mostraram resultados aceitáveis para a curva analítica e valores de LD, sendo melhores que alguns trabalhos presentes na literatura, e foram capazes de determinar a concentração de dopamina na amostra comercial.

Os três últimos biossensores da tese (NTTP-F, NTTP-R e NTT-HRP) apresentaram um melhor LD embora uma faixa linear ligeiramente menor em relação aos dois primeiros biossensores (NTTP e NPMP). Embora esses 3 biossensores possuam o mesmo limite inferior da faixa linear, o coeficiente angular ficou na ordem NTT-HRP < NTTP-F < NTTP-R, que é a mesma ordem dos LD. Portanto, o biossensor NTTP-R é um pouco mais sensível que os outros, o que refletiu no menor LD.

Na adição de padrão à amostra comercial, o desempenho dos biossensores NTTP-R e NTT-HRP foram semelhantes, com ambos tendo um pequeno erro (-0,2%) na determinação da concentração de dopamina na amostra comercial (ampola). Já o biossensor NTTP-F apresentou um erro grande, de +9,4%.

Como o analito desta tese foi a dopamina, que é uma molécula de interesse clínico e uma das amostras reais possíveis é a urina, foi feito um teste de interferente com os três biossensores na presença de ureia na concentração de 10 g/L, que é a concentração média dessa substância na urina humana. A Figura 61 mostra os resultados desse teste. O biossensor NTTP-R apresentou um resultado muito melhor em relação aos outros dois, que foram semelhantes. Isso pode ser devido à melhor estabilidade da PMX no EMX-R, que possui a maioria dos componentes do extrato que foram retidas no concentrador. Como relatado anteriormente, enzimas geralmente apresentam maior estabilidade em contato com os componentes naturais presentes nos extratos brutos devido a proteínas de proteção e outras substâncias que auxiliam na catálise e na manutenção da estrutura enzimática (ROSA *et al.*, 2020, OLIVEIRA, 2007; OLIVEIRA *et al.*, 2012).

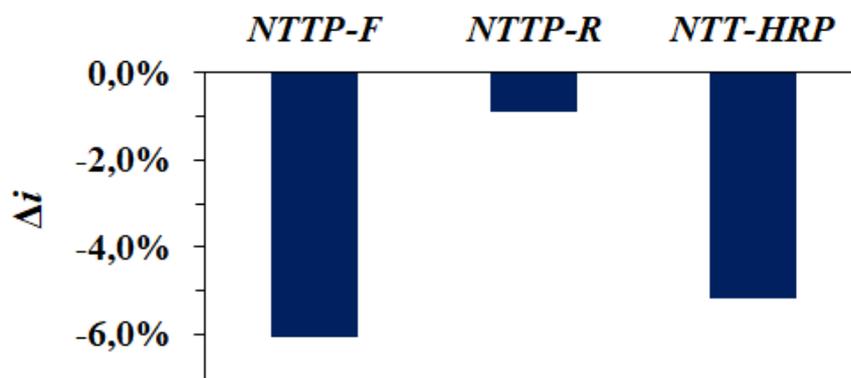


Figura 61. Valores de Δi no emprego dos biossensores em uma solução de dopamina $5,00 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ com ureia 10 g L^{-1} em PBS pH 7,0 em comparação com uma solução sem o interferente.

Em termos gerais, os quatro biossensores de NTT exibiram comportamentos semelhantes nos ensaios conduzidos, conforme evidenciado pelas Tabela 22 e 23. Contudo, destaca-se que o biossensor NTTP-R demonstrou desempenho superior em comparação aos demais construídos com a mesma metodologia (NTTP-F e NTT-HRP), exceto no quesito estabilidade, o qual foi inadequado para os três biossensores. O biossensor NTTP-R não apresentou qualquer outro resultado desfavorável, ao contrário dos dois biossensores restantes. Portanto, conclui-se que o biossensor empregando extrato de maxixe concentrado, designado como NTTP-R, exibiu resultados levemente superiores em relação ao biossensor construído com a enzima comercial purificada, denominada NTT-HRP e ao biossensor NTTP-F.

Na Tabela 24, é mostrada a comparação entre os biossensores NTTP e NTTP-R. É observado que o biossensor NTTP apresentou resultados superiores, com exceção da estabilidade, que foi muito maior para esse biossensor. Esse melhor desempenho provavelmente é devido ao procedimento de lavagem das nanopartículas após a imobilização e não à concentração de enzima no extrato EMX-R, uma vez que os biossensores NTTP-F e NTT-HRP apresentaram resultados semelhantes ao NTTP-R.

A Tabela 25 resume todos os resultados obtidos com os biossensores construídos nessa tese.

Tabela 23. Comparação dos biossensores NTTP-F, NTTP-R e NTT-HRP nos testes realizados. (Símbolo verde) bom resultado, (Símbolo vermelho) mau resultado.

EXPERIMENTOS	NTTP-F	NTTP-R	NTT-HRP
<i>REPETITIVIDADE</i>	✓	✓	✓
<i>REPRODUTIVIDADE</i>	✓	✓	✗
<i>FAIXA LINEAR</i>	-	-	-
<i>LD</i>	-	✓	-
<i>ADIÇÃO DE PADRÃO</i>	✗	✓	✓
<i>ESTABILIDADE</i>	✗	✗	✗
<i>UREIA</i>	✗	✓	✗

Tabela 24. Comparação dos biossensores NTTP e NTTP-R nos testes realizados. (Símbolo verde) bom resultado, (Símbolo vermelho) mau resultado.

EXPERIMENTOS	NTTP	NTTP-R
<i>REPETITIVIDADE</i>	✓	-
<i>REPRODUTIVIDADE</i>	✓	-
<i>FAIXA LINEAR</i>	✓	-
<i>LD</i>	-	✓
<i>ADIÇÃO DE PADRÃO</i>	-	-
<i>ESTABILIDADE</i>	✓	✗

Tabela 25. Resumo dos resultados obtidos com os biossensores construídos.

EXPERIMENTOS	NPMP	NTTP	NTTP-F	NTTP-R	NTT-HRP
<i>Fonte de Peroxidase</i>	EMX	EMX	EMX-F	EMX-R	HRP
<i>Lavagem do Nanomaterial</i>	✗	✗	✓	✓	✓
<i>Faixa Linear (μM)</i>	4,98 – 65,4	4,98 – 65,4	4,98 – 56,6	4,98 – 56,6	4,98 – 56,6
<i>LD (μM)</i>	2,11	2,46	1,20	1,04	1,83
<i>Repetitividade (DPR)</i>	6,1	1,5	2,2	2,4	3,8
<i>Reprodutibilidade (DPR)</i>	17,0	4,0	5,0	4,3	8,4
<i>Estabilidade (%)</i>	86	79	57	58	50
<i>Adição de Padrão (mg/mL)</i>	4,76 ± 0,04	5,04 ± 0,11	5,47 ± 0,09	4,99 ± 0,40	4,99 ± 0,22
<i>Teste com Ureia (% Δi)</i>	-	-	-6,1	-0,9	-5,2

LD = Limite de Detecção; DPR = Desvio Padrão Relativo

Neste estudo, foi conduzido um teste estatístico utilizando o método do teste t de Student para avaliar a precisão na medição da concentração de dopamina em amostras com um valor fixo de 5,00 mg/mL por cada biossensor. O objetivo principal foi determinar a adequação e confiabilidade dos biossensores para essa aplicação específica. O teste t de Student foi escolhido devido à sua capacidade estabelecida de comparar as medições de um único grupo com um valor de referência fixo e identificar se há uma diferença estatisticamente significativa entre eles. A Tabela 26 mostra os resultados obtidos para o teste realizado empregando a Equação 5.

$$t_{calc} = \frac{\bar{x} - \mu}{\frac{s}{\sqrt{n}}} \quad \text{Equação 5}$$

Onde:

t_{calc} = valor de t calculado para cada biossensor

\bar{x} = média dos valores encontrados para a concentração e dopamina por cada biossensor

μ = 5,00 mg/mL

S = desvio padrão dos valores encontrados para a concentração e dopamina por cada biossensor

n = 3

Tabela 26. Resultados obtidos para o teste t de Student para os biossensores construídos.

	NPMP	NTTP	NTTP-F	NTTP-R	NTT-HRP
<i>Réplica #1</i>	4,79	5,12	5,52	5,15	5,12
<i>Réplica #2</i>	4,76	5,07	5,42	4,83	4,89
<i>Réplica #3</i>	4,74	5,00	5,46	4,98	4,96
<i>X</i>	4,76	5,06	5,47	4,99	4,99
<i>S</i>	0,000633	0,00363	0,00253	0,025	0,0139
<i>/ t_{calc} /</i>	16,3	1,82	16,1	0,14	0,15
*	✓	✗	✓	✗	✗

* = existe uma diferença significativa com índice de confiança de 95% (n = 3; t_{crítico} = 4,303) entre as medidas dos biossensores e o valor padrão (5,00 mg/mL)

Com esse teste, é possível afirmar estatisticamente que os biossensores NPMP e NTTP-F não foram aptos para determinar a concentração de dopamina na amostra comercial, havendo uma diferença estatística entre suas médias e o valor rotulado de 5,00 mg/mL.

10.1 Perspectivas para Próximos Trabalhos

Recomenda-se os seguintes pontos para próximos estudos nesta linha de pesquisa:

- Purificação da PMX do extrato de maxixe para comparação com este trabalho;
- Outra metodologia de imobilização nas NPM, preferencialmente uma que promova ligação covalente entre a PMX e às nanopartículas;
- Estudo da necessidade ou não da lavagem do nanomaterial após a imobilização, considerando a possível perda de sinal analítico e estabilidade dos biossensores;
- Emprego dos NTT em outras plataformas além da pasta de carbono, como *Screen Printed Electrodes* e eletrodos 3D.

CAPÍTULO 11. CONCLUSÕES

O maxixe (*Cucumis anguria* L.) foi selecionado e usado como fonte da enzima peroxidase para a imobilização em nanotubos de titânio (NTT) e nanopartículas magnéticas de óxido de ferro (NPM) a fim de construir biossensores de pasta de carbono para detecção de dopamina.

A melhor condição para extração da peroxidase do maxixe foi obtida em PBS 0,1 mol L⁻¹ pH 7,0. Recomenda-se que a imobilização da peroxidase seja realizada no mesmo dia da extração, uma vez que a atividade diminui a partir do segundo ou terceiro dia, mesmo sendo mantida sob refrigeração. Entretanto, é plenamente possível que a imobilização ocorra após o primeiro dia. Como observado no experimento de estabilidade dos extratos, após 27 dias, a perda é de apenas 10% da atividade.

Para a determinação de dopamina em ampolas comerciais (5,00 mg mL⁻¹), o método comparativo empregado foi o espectrofotométrico ($\lambda = 278$ nm) e o valor encontrado foi de 4,97 \pm 0,06 mg mL⁻¹.

No emprego dos cinco biossensores construídos, foi necessário a aplicação de um potencial de -0,30 V por 5 s antes de cada varredura de VOQ para dessorção do analito da superfície do biossensor.

Os resultados dos biossensores NTTP e NPMP foram comparados, pois foram construídos com a mesma metodologia (sem a lavagem do nanomaterial e sem a etapa de filtragem do extrato de maxixe). O biossensor NTTP apresentou melhores resultados quando comparado ao biossensor NPMP. Ele apresentou um sinal analítico maior, uma boa repetitividade, curva de calibração um pouco mais ampla e maior exatidão no experimento de adição de padrão. Isto é devido imobilização da peroxidase por ligação covalente entre os NTT e a PMX.

Comparando-se a primeira parte da tese com a segunda, as modificações foram em relação à lavagem dos NTT após a deposição do extrato e a concentração da PMX empregando o filtro Centripep. Além da comparação com o biossensor construído com HPR. A lavagem acarretou em uma menor de repetitividade, de reprodutibilidade e de estabilidade dos biossensores com NTT. A faixa linear também foi um pouco menor, entretanto os LDs obtidos pelos 3 últimos biossensores da tese foram menores. Isso pode ser explicado pela melhor

definição do pico nos voltamogramas (que estão inseridos nas Figuras das curvas analíticas). Com um pico mais definido, foi possível a melhor leitura do Δi e os valores dos coeficientes de correlação das curvas ficaram mais próximos de 1. Uma vez que os LD são calculados pela Equação 2 e a incerteza da reta ajustada é considerada, quanto mais lineares forem os pontos experimentais, menor será o LD. A partir da lavagem das nanopartículas de NTT contendo peroxidase imobilizada foi obtida uma curva analítica com maior linearidade.

Considerando os três últimos biossensores da tese (NTTP-R, NTTP-F, NTT-HRP), o biossensor NTTP-R alcançou melhor desempenho, o que pode mostrar que a peroxidase na presença dos componentes celulares do extrato tenha um desempenho no eletrodo melhor do que se ela estiver totalmente purificada. Principalmente quando o biossensor entra em contato com outras substâncias, como no teste de adição na amostra real e com ureia.

Os resultados obtidos neste trabalho usando os biossensores de NTT e NPM viabilizam o uso da PMX na construção de biossensores de pasta de carbono para determinação de dopamina. Além de indicar a possibilidade de serem empregados para pesquisas envolvendo outros compostos fenólicos, como já amplamente descrito na literatura para biossensores de peroxidase.

As NPM recobertas com quitosana necessitam de mais estudos, principalmente com um método de imobilização mais eficiente usando agentes reticulantes para fixar de forma mais efetiva a PMX ao suporte. Sendo nanopartículas de fácil obtenção e com propriedades magnéticas, não podem ser descartadas como boa plataforma para biossensores.

CAPÍTULO 12. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AL-DHABI, N. A.; ESMAIL, G. A.; ARASU, M. V. Effective degradation of tetracycline by manganese peroxidase producing *Bacillus velezensis* strain Al-Dhabi 140 from Saudi Arabia using fibrous-bed reactor. **Chemosphere**, v. 268, n. 128726, p. 1-11, 2021.
- AMBAYE, A. D.; KEFENI, K. K.; MISHRA, S. B.; NXUMALO, E. N.; NTSENDWANA, B. Recent developments in nanotechnology-based printing electrode systems for electrochemical sensors. **Talanta**, v. 225, n. 121951, 2021,
- AMINI, N.; SHAMSIPUR, M. Impedimetric mechanism study of horseradish peroxidase at low and high concentrations of hydrogen peroxide based on graphene/sol-gel/horseradish peroxidase. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 123, p. 677-681, 2019.
- AN, E. S.; CHO, D. H.; CHOI, J. W.; KIM, Y. H.; SONG, B. K. Peroxidase-catalyzed copolymerization of syringaldehyde and bisphenol A. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 46, p. 287-291, 2010.
- ANSARI, S. A.; HUSAIN, Q. Potential applications of enzymes immobilized on/in nano materials: A review. **Biotechnology Advances**, v. 30, p. 512-523, 2012.
- ARIF, S.; QUDSIA, S.; UROOJ, S.; CHAUDRY, N.; ARSHAD, A.; ANDLEEB, S. Blueprint of quartz crystal microbalance biosensor for early detection of breast cancer through salivary autoantibodies against ATP6AP1. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 65, p. 62-70, 2015.
- ATTIQUE, S.A.; AIN, Q. U.; HUSSAIN, N.; BILAL, M.; IQBAL, H. M. N. Chapter 3 - Enzyme immobilization approaches. In: María Luján Ferreira (Editor), *Foundations and Frontiers in Enzymology, Biocatalyst Immobilization*. Academic Press, p. 37-54, 2013.
- AZEVEDO, A. M.; MARTINS, V. C.; PRAZERES, D. M.F.; VOJINOVIC, V.; CABRAL, J. M.S.; FONSECA, L. P. Horseradish peroxidase: a valuable tool in biotechnology. **Biotechnology Annual Review**, v. 9, p. 199-249, 2003.
- BABADOSTU, A.; GULDU, O. K.; DEMIRKOL, D. O.; MEDINE, E. I.; UNAK, P.; TIMUR, S. Affinity Based Laccase Immobilization on Modified Magnetic Nanoparticles: Biosensing Platform for the Monitoring of Phenolic Compounds. **International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials**, v. 64, n. 5, p. 260-266, 2014.
- BAHADIR, E. B.; SEZGINTÜRK, M.K. Applications of commercial biosensors in clinical, food, environmental, and biothreat/biowarfare analyses. **Analytical Biochemistry**, v. 478, p. 107-120, 2015.
- BARBOSA, C.; SILVEIRA, C. M.; SILVA, D.; BRISSOS, V.; HILDEBRANDT, P.; MARTINS, L. O.; TODOROVIC, S. Immobilized dye-decolorizing peroxidase (DyP) and directed Evolution variants for hydrogen peroxide biosensing. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 153, n. 112055, p. 1-8, 2020.

BATOOL, R.; RHOATI, A.; NAWAZ, M.H.; HAYAT, A.; MARTY, J.L. A Review of the Construction of Nano-Hybrids for Electrochemical Biosensing of Glucose. **Biosensors**, v. 9, p. 46, 2019.

BAYRAMOGLU, G.; DOZ, T.; OZALP, V.C.; ARICA, M.Y. Improvement stability and performance of invertase via immobilization on to silanized and polymer brush grafted magnetic nanoparticles. **Food chemistry**, v. 221, p. 1442–1450, 2017.

BEREPIKI, A., KENT, R., MACHADO, L.F.M., DIXON, N. Development of high-performance whole-cell biosensors aided by statistical modeling. **ACS Synth. Biol.** 2020; v. 9, p. 576–589.

BERTANA, V.; SCORDO, G.; PARMEGGIANI, M.; SCALTRITO, L.; FERRERO, S.; GOMEZ, M.; MATTEO COCUZZA, M.; VURRO, D.; D'ANGELO, P.; IANNOTTA, S.; PIRRI, C. F.; MARASSO, S. L. Rapid prototyping of 3D Organic Electrochemical Transistors by composite photocurable resin. **Scientific Reports**, v. 10, n. 13335, p. 1-11, 2020.

BHAKTA, S. A.; EVANS, E.; BENAVIDEZ, T. E.; GARCIA, C. D. Protein adsorption onto nanomaterials for the development of biosensors and analytical devices: A review. **Analytica Chimica Acta**, v. 872, p. 7-25, 2015.

BHALLA, N.; JOLLY, P.; FORMISANO, N.; ESTRELA, P. Introduction to biosensors. **Essays in Biochemistry**, v. 60, p. 1-8, 2016.

BIOCHEMICAL NOMENCLATURE COMMITTEES - Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology (NC-IUBMB). Disponível em: <<https://www.qmul.ac.uk/sbcs/iubmb/nomenclature>>. Acesso em: 05 de jan. 2021.

BODUR, O.C.; DİNÇ, S.; OZMEN, M.; ARSLAN, F. A sensitive amperometric detection of neurotransmitter acetylcholine using carbon dot-modified carbon paste electrode. **International Union of Biochemistry and Molecular Biology, Inc.**, v. 68, p. 20–29, 2021.

BOLLELLA, P.; MEDICI, L.; TESSEMA, M.; POLOZNIKOV, A. A.; HUSHPULIAN, D. M.; TISHKOV, V. I.; ANDREU, R.; LEECH, D.; MEGERSA, N.; MARCACCIO, M.; GORTON, L.; ANTIOCHI, R. Highly sensitive, stable and selective hydrogen peroxide amperometric biosensors based on peroxidases from different sources wired by Ospolymer: A comparative study. **Solid State Ionics**, v. 314, p. 178-186, 2018.

BRANCO, A. Maxixe tem alguma RELAÇÃO COM DIABETES? Faz bem? Como usar? Disponível em:<<https://www.greenme.com.br/alimentar-se/alimentacao/5251-maxixe-relacao-com-diabetes>>. Acesso em: 05 de jan. 2021.

CAMARGO, J. R.; BACCARIN, M.; RAYMUNDO-PEREIRA, P. A.; CAMPOS, A. M.; OLIVEIRA, G. G.; FATIBELLO-FILHO, O.; OLIVEIRA JR., O. N.; JANEGITZ, B. C. Electrochemical biosensor made with tyrosinase immobilized in a matrix of nanodiamonds and potato starch for detecting phenolic compounds. **Analytica Chimica Acta**, v. 1034, p. 137-143, 2018.

CARVALHO, N. B.; LIMA, A. S.; SOARES, C. F. Uso de sílicas modificadas para imobilização de lipases. **Química Nova**, v. 38, p. 399-409, 2015.

CENTENO, D. A.; SOLANO, X. H.; CASTILLO, J. J. A new peroxidase from leaves of guinea grass (*Panicum maximum*): A potential biocatalyst to build amperometric biosensors. **Bioelectrochemistry**, v. 116, p. 33-38, 2017.

ÇEVIK, E.; SENEL, M.; BAYKAL, A.; ABASIYANIK, M. F. A novel amperometric phenol biosensor based on immobilized HRP on poly(glycidylmethacrylate)-grafted iron oxide nanoparticles for the determination of phenol derivatives. **Sensors and Actuators B**, v. 173, p. 396-405, 2012.

CHANDRA, S.; ARORA, K.; BAHADUR, D. Impedimetric biosensor based on magnetic nanoparticles for electrochemical detection of dopamine. **Materials Science and Engineering B**, v. 177, p. 1531–1537, 2012.

CHEKIN, F.; GORTON, L.; TAPSOBEA, I. Direct and mediated electrochemistry of peroxidase and its electrocatalysis on a variety of screen-printed carbon electrodes: amperometric hydrogen peroxide and phenols biosensor. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 407, p. 439-446, 2015.

CHEN, A.; SHAH, B. Electrochemical sensing and biosensing based on square wave voltammetry. **Analytical Methods**, v. 5, p. 2158-2173, 2013.

CHEN, W.; ZHANG, J.; LU, G.; YUAN, Z.; WU, Q.; LI, J.; XU, G. HE, A.; ZHENG, J.; ZHANG, J. Development of an immunochromatographic lateral flow device for rapid diagnosis of *Vibrio cholerae* O1 serotype Ogawa. **Clinical Biochemistry**, v. 47, p. 448-454, 2014.

CHEN, Y.; REN, R.; PU, H.; GUO, X.; CHANG, J.; ZHOU, G.; MAO, S.; KRON, M.; CHEN, J. Field-Effect Transistor Biosensor for Rapid Detection of Ebola Antigen. **Scientific Reports**, v. 7, n.10974, p. 1-8, 2017.

CHEN, Y.; LIU, J.; YANG, Z.; WILKINSON, J. S.; ZHOU, X. Optical biosensors based on refractometric sensing schemes: A review. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 144, n. 111693, p. 1-14, 2019.

CHEN, H.; LUO, D.; SHANG, B.; CAO, C.; WEI, J.; CHEN, Q.; CHEN, J. Immunoassay-type biosensor based on magnetic nanoparticle capture and the fluorescence signal formed by horseradish peroxidase catalysis for tumor-related exosome determination. **Microchimica Acta**, v. 187, n. 282, p. 1-8, 2020.

CIPOLATTI, E.P.; SILVA, M.J.A.; KLEIN, M.; FEDDERN, V.; FELTES, M.M.C.; OLIVEIRA, J.V.; NINOW, J.L.; OLIVEIRA, D. Current status and trends in enzymatic nanoimmobilization. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 99, p. 56–67, 2014.

DALKIRAN, B. Amperometric determination of heavy metal using an HRP inhibition biosensor based on ITO nanoparticles-ruthenium (III) hexamine trichloride composite: Central composite design optimization. **Bioelectrochemistry**, v. 135, n. 107569, p. 1-12, 2020.

DAS, P.; DAS, M.; CHINNADAYYAL, S. R.; SINGHA, I. M.; GOSWAMI, P. Recent advances on developing 3rd generation enzyme electrode for biosensor applications. **Biosensors and Bioelectronics**, v.79, p. 386-397, 2016.

DARWESH, O.M.; MATTER, I.A.; EIDA, M.F. Development of peroxidase enzyme immobilized magnetic nanoparticles for bioremediation of textile wastewater dye. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 7, p. 1-7, 2019.

DECARLI, N. O.; ZAPP, E.; SOUZA, B. S.; SANTANA, E. R.; WINIARSKI, J. P.; VIEIRA, I. C. Biosensor based on laccase-halloysite nanotube and imidazolium zwitterionic surfactant for dopamine determination. *Biochemical Engineering Journal*, v. 186, n. 108565, p. 1-9, 2022.

DEVA, A. N.; ARUN, C.; ARTHANAREESWARAN, G.; SIVASHANMUGAM, P. Extraction of peroxidase from waste *Brassica oleracea* used for the treatment of aqueous phenol in synthetic wastewater. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 2, p. 1148-1154, 2014.

DHIMAN, A., KALRA, P., BANSAL, V., BRUNO, J.G., SHARMA, T.K. Aptamer-based point-of-care diagnostic platforms. **Sens. Actuators B Chem.**, v. 246, p. 535–553, 2017.

DING, L.; BOND, A.M.; ZHAI, J.; ZHANG, J. Utilização de rótulos de nanopartículas para amplificação de sinal em biossensores de afinidade eletroquímica ultrasensíveis: uma revisão. **Analytica Chimica Acta**, v. 797, p. 1–12, 2013.

ERTÜRK, G.; LOOD, R. Bacteriophages as biorecognition elements in capacitive biosensors: Phage and host bacteria detection. **Sensors and Actuators B**, v. 258, p. 535-543, 2018.

FABER, K. *Biotransformations in Organic Chemistry: A Textbook*. Springer; Berlin/Heidelberg, Germany: 2011. Disponível em: <https://link.springer.com/book/10.1007/978-3-642-18537-3>.

FABRI-FAJA, N.; CALVO-LOZANO, O.; DEY, P.; TERBORG, R. A.; ESTEVEZ, M. C.; BELUSHKIN, A.; YESILKOY, F.; DUEMPELMANN, L.; ALTUG, H.; PRUNERI, V.; LECHUGA L. M. Early sepsis diagnosis via protein and miRNA biomarkers using a novel point-of-care photonic biosensor. **Analytica Chimica Acta**, v. 1077, p. 232-242, 2019.

FARIA, H. A. M.; ZUCOLOTTO, V. Label-free electrochemical DNA biosensor for zika virus identification. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 131, p. 149-155, 2019.

FARZIN, M. A.; ABDOOS, H. A critical review on quantum dots: From synthesis toward applications in electrochemical biosensors for determination of disease-related biomolecules. **Talanta**, v. 224, n. 121828, p. 1-22, 2021.

FERNANDES, S. C.; SOUZA, F. D.; SOUZA, B. S.; NOME, F.; VIEIRA, I. C. Gold nanoparticles dispersed in zwitterionic surfactant for peroxidase immobilization in biosensor construction. **Sensors and Actuators B**, v. 173, p. 483-490, 2012.

FLORESCU, M.; DAVID, M. Tyrosinase-Based Biosensors for Selective Dopamine Detection. **Sensors**, v. 17, n. 1314, p. 1-16, 2017.

FOGUEL, M. V.; ULIANA, C. V.; TOMAZ, P. R. U.; MARQUES, P. R. B. O.; YAMANAKA, H.; FERREIRA, A. A. P. Avaliação da limpeza de CD trodo construídos a partir de CD de ouro gravável/fita adesiva de galvanoplastia. **Eclética Química**, v. 34, 2009.

FOOLADSAZ, K.; NEGAHDARY, M.; RAHIMI, G.; HABIBI-TAMIJANI, A.; PARSANIA, S.; AKBARI-DASTJERDI, H.; SAYAD, A.; JAMALEDDINI, A.; SALAH, F.; ASADI, A. Dopamine Determination with a Biosensor Based on Catalase and Modified Carbon Paste Electrode with Zinc Oxide Nanoparticles. **International Journal of Electrochemical Science**, v. 7, p. 9892-9908, 2012.

FRITZEN-GARCIA, M. B.; OLIVEIRA, I. R. W. Z.; SOLDI, V.; PASA, A. A.; FATIBELLO-FILHO, O.; CRECZYNSKI-PASA, T. B.; ZANETTI-RAMOS, B. G. Carbon paste electrode modified with pine kernel peroxidase immobilized on pegylated polyurethane nanoparticles. **Sensors and Actuators B**, v. 139, p. 570-575, 2009.

FRITZEN-GARCIA, M. B.; MONTEIRO, F. F.; CRISTOFOLINI, T.; ACUÑA, J. J. S.; ZANETTI-RAMOS, B. G.; OLIVEIRA, I. R. W. Z.; SOLDI, V.; PASA, A. A.; CRECZYNSKI-PASA, T. B. Characterization of horseradish peroxidase immobilized on PEGylated polyurethane nanoparticles and its application for dopamine detection. **Sensors and Actuators, B: Chemical**, v. 182, p. 264-272, 2013.

FRITZKE, W.; SALLA, E. G.; BAGATINI, M. D.; BONADIMAN, B. S. R.; SKORONSKI, E.; MORONI, L. S.; KEMPKA, A. P. Peroxidase of *Cedrela fissilis* leaves: Biochemical characterization and toxicity of enzymatically decolored solution of textile dye Brilliant Sky-Blue G. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 24, n. 101553, p. 1-10, 2020.

GAO, G.; JIANG, Y.; SUN, W.; WU, F. Fluorescent quantum dots for microbial imaging. **Chinese Chemical Letters**, v. 29, p. 1475-1485, 2018.

GARCIA, S. O.; FELTRIN, A. C. P.; GARDA-BUFFON, J. Zearalenone reduction by commercial peroxidase enzyme and peroxidases from soybean bran and rice bran. **Food Additives & Contaminants: Part A**, v. 35, p. 1819-1831, 2018.

GARG, S.; KUMAR, P.; SINGH, S.; YADAV, A.; DUMÉE, L. F.; SHARMA, R. S.; MISHRA, V. *Prosopis juliflora* peroxidases for phenol remediation from industrial wastewater — An innovative practice for environmental sustainability. **Environmental Technology & Innovation**, v. 19, n. 100865, p. 1-11, 2020.

GOLUNSKI, Simone Maria. Avaliação da atividade de peroxidases e lipases em diferentes sistemas reacionais. 88f. 2015. Dissertação (Mestrado), Universidade Federal Da Fronteira Sul – UFFS, Erechim. 2015.

GUISAN, J. M. Immobilization of enzymes and cells: Third edition, methods in molecular biology. **Springer Science**, v. 1051, p. 1–375, 2013.

HALDORAI, Y.; VILIAN, A. T. E.; RETHINASABAPATHY, M.; HUH, Y. S.; HAN, Y. K. Electrochemical determination of dopamine using a glassy carbon electrode modified with TiN-reduced graphene oxide nanocomposite. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 247, p. 61–69, 2017.

HALILOVIĆ, A.; MERDAN, E.; KOVAČEVIĆ, Z.; POKVIĆ, L. G. Review of Biosensors for Environmental Field Monitoring. 2019 8th Mediterranean Conference On Embedded Computing (MECO), p. 10-14, 2019, Budva, Montenegro.

HAMID, M.; KHALIL-UR-REHMAN. Potential applications of peroxidases. **Food Chemistry**, v. 115, p. 1177-1186, 2009.

HARRAD, L.; BOURAI, I.; MOHAMMADI, H.; AMINE, A. Recent advances in electrochemical biosensors based on enzyme inhibition for clinical and pharmaceutical applications. **Sensors**, v. 18, p. 1-25, 2018.

HAYAT, A.; CATANANTE, G.; MARTY, J. Current trends in nanomaterial-based amperometric biosensors. **Sensors**, v. 14, p. 23439–23461, 2014.

HEINEMAN, W. R.; JENSEN, W. B. Obituary Leland C. Clark Jr. (1918–2005). **Biosensors and Bioelectronics**, v. 21, p. 1403-1404, 2006.

HERNÁNDEZ-CANCEL, G.; SUAZO-DÁVILA, D.; MEDINA-GUZMÁN, J.; ROSADO-GONZÁLEZ, M.; DÍAZ-VÁZQUEZ, L. M.; GRIEBENOW, K. Chemically glycosylation improves the stability of an amperometric horseradish peroxidase biosensor. **Analytica Chimica Acta**, v. 854, p. 129-139, 2015.

HOSU, O.; SELVOLINI, G.; MARRAZZA, G. Recent advances of immunosensors for detecting food allergens. **Current Opinion in Electrochemistry**, v. 10, p. 149-156, 2018.

HU, H.; WANG, L.; XU, B.; WANG, P.; YUAN, J.; YU, Y.; WANG, Q. Construction of a composite hydrogel of silk sericin via horseradish peroxidase-catalyzed graft polymerization of poly-PEGDMA. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 108B, p. 2643-2655, 2020.

HWANG, D.; LEE, S.; SEO, M.; CHUNG, T. D. Recent advances in electrochemical non-enzymatic glucose sensors - A review. *Analytica Chimica Acta*, v. 1033, p. 1-34, 2018.

ICHI, S.; LIMAM, F.; MARZOUKI, M. N. Garlic peroxidase immobilized into chitosan matrix suitable for biosensors applications. **Materials Science and Engineering C**, v. 29, p. 1662-1667, 2009.

JESIONOWSKI, T.; ZDARTA, J.; KRAJEWSKA, B. Enzyme immobilization by adsorption: a review. **Adsorption**, v. 20, p. 801-821, 2014.

JIANG, L. Biomedical Diagnostics at Point-of-Care 2019-2029: Technologies, Applications, Forecasts. Disponível em: < <https://www.idtechex.com/en/research-report/biomedical-diagnostics-at-point-of-care-2019-2029-technologies-applications-forecasts/622>>. Acesso em: 05 de jan. 2021.

JIANG, T.; SUN, X.; WEI, L.; LI, M. Determination of hydrogen peroxide released from cancer cells by a Fe-Organic framework / horseradish peroxidase-modified electrode. **Analytica Chimica Acta**, v. 1135, p. 132-141, 2020.

JIN, W.; WANG, R.; HUANG, X. Horseradish peroxidase-catalyzed oxidative polymerization of aniline in bicontinuous microemulsion stabilized by AOT/SDS. **Journal of Molecular Liquids**, v. 302, n. 112529, p. 1-9, 2020.

JUN, L.Y.; MUBARAK, N.M.; YON, L.S. et al. Immobilization of Peroxidase on Functionalized MWCNTs-Buckypaper/Polyvinyl alcohol Nanocomposite Membrane. **Scientific Reports**, v. 9, p. 2215, 2019.

JUSTINO, C. I. L.; DUARTE, A. C.; ROCHA-SANTOS, T. A. P. Recent Progress in Biosensors for Environmental Monitoring: A Review. **Sensors**, v.17, p. 2918, 2017.

KATSELI, V.; ECONOMOU, A.; KOKKINOS, C. Single-step fabrication of an integrated 3D-printed device for electrochemical sensing applications. **Electrochem. Commun.**, v. 103, p. 100-103, 2019.

KATSELI, V.; THOMAIDIS, N.; ECONOMOU, A.; KOKKINOS, C. Miniature 3D-printed integrated electrochemical cell for trace voltammetric Hg (II) determination. **Sensors & Actuators: B. Chemical**, v. 308, N. 127715, 2020,

KOMATHI, S.; MUTHUCHAMY, N.; LEE, K.; GOPALAN, A. Fabrication of a novel dual mode cholesterol biosensor using titanium dioxide nanowire bridged 3D graphene nanostacks. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 84, p. 64–71, 2016.

KONG, D.; ZHUANG, Q.; HAN, Y.; XU, L.; WANG, Z.; JIANG, L.; SU, J.; LU, C.; CHI, Y.; Simultaneous voltammetry detection of dopamine and uric acid in human serum and urine with a poly(procaterol hydrochloride) modified glassy carbon electrode. **Talanta**, v. 185, p. 203-212, 2018.

KOZAN, J. V. B.; SILVA, R. P.; SERRANO, S. H. P.; LIMA, A. W. O.; ANGNES, L. Biosensing hydrogen peroxide utilizing carbon paste electrodes containing peroxidases naturally immobilized on coconut (*Cocos nucifera L.*) fibers. **Analytica Chimica Acta**, v. 591, p. 200-207, 2010.

KUMAR, V.; CHANDRA, R. Characterisation of manganese peroxidase and laccase producing bacteria capable for degradation of sucrose glutamic acid-Maillard reaction products at different nutritional and environmental conditions. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 34, n. 32, p. 1-18, 2018.

liu, M.; SARGENT, E. H.; KELLEY, S. O. Electrochemical methods for the analysis of clinically relevant biomolecules. **Chemical Reviews**, v. 116, p. 9001–9090, 2016.

LI, Y.; QIN, C.; CHENA, C.; FU, Y.; MA, M.; XIE, Q. Highly sensitive phenolic biosensor based on magnetic polydopamine-laccase-Fe₃O₄ bionanocomposite. **Sensors and Actuators B**, v. 168, p. 46- 53, 2012.

LI, X.; WU, X.; SHI, P.; YE, Z. Lead-Free Piezoelectric Diaphragm Biosensors Based on Micro-Machining Technology and Chemical Solution Deposition. **Sensors**, vol. 16, 2016.

LI, Y.; GU, Y.; ZHENG, B.; LUO, L.; LI, C.; YAN, X.; ZHANG, T.; LU, N.; ZHANG, Z. A novel electrochemical biomimetic sensor based on poly(Cu-AMT) with reduced graphene oxide for ultrasensitive detection of dopamine. **Talanta**, v. 162, p. 80–89, 2017.

LI, Z.; QIU, C.; GAO, J.; WANG, H.; YINGJUAN, F.; QIN, M. Improving lignin removal from pre-hydrolysis liquor by horseradish peroxidase-catalyzed polymerization. **Separation and Purification Technology**, v. 212, p. 273–279, 2019.

LIESE, A.; HILTERHAUS, L. Evaluation of immobilized enzymes for industrial applications. **Chemical Society Reviews**, v. 42, p. 6236-6249, 2013.

LIM, S.A.; AHMED, M.U. Introduction to food biosensors. In: AHMED, M.U.; ZOUROB, M.; TAMIYA, E. (Eds.). *Food Chemistry, Function and Analysis*. 1st ed. Cambridge, UK: Royal Society of Chemistry, 2016. p. 1–21.

LIU, X.; FENG, H.; ZHANG, J.; ZHAO, R.; LIU, X.; WONG, D.K.Y. Hydrogen peroxide detection at a horseradish peroxidase biosensor with a Au nanoparticle–dotted titanate nanotube/hydrophobic ionic liquid scaffold. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 32, p. 188-194, 2012.

LIU, Chunxiu. Enzyme Biosensors for Point-of-Care Testing. *In: MEMS Sensors - Design and Application*. Intechopen, 2018. p. 49-71.

LIU, Z.; JIN, M.; CAO, J.; NIU, R.; LI, P.; ZHOU, G.; YU, Y.; VAN DEN BERG, A.; SHUI, L. Electrochemical sensor integrated microfluidic device for sensitive and simultaneous quantification of dopamine and 5-hydroxytryptamine. **Sensors & Actuators: B. Chemical**, v. 273, p. 873–883, 2018.

LIU, R.; LI, Z.; HUANG, Z.; LI, K.; LV, Y. Biosensors for explosives: State of art and future trends. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 118, p. 123-137, 2019.

LIU, X.; LIU, J. Biosensors and sensors for dopamine detection. **View**, v. 2, n. 20200102. p. 1-16, 2021.

MALHOTRA, B.D.; ALI, M.A. Chapter 6 - Plasmonic Nanostructures: Fiber-Optic Biosensors. In: Malhotra, B.D.; Ali, Md. Azahar (Eds.). *Nanomaterials for Biosensors*. Micro and Nano Technologies. William Andrew Publishing, 2018. p. 161-181.

MALIK, S.; SINGH, J.; GOYAT, R.; SAHARAN, Y.; CHAUDHRY, V.; UMAR, A.; IBRAHIM, A. A.; AKBAR, S.; AMEEN, S.; BASKOUTAS, S. Nanomaterials-based biosensor and their applications: A review. **Heliyon**, v. 9, e19929, 2023.

MATTOS, Mônica Andrade de. **Bioprospecção do maxixe (*Cucumis anguria L.*): elaboração da farinha e apresentação de produto**. 168f. 2016. Dissertação (Mestrado), Universidade Federal de Campina Grande - UFCG, CUITÉ. 2016.

MELLO, L. D.; SOTOMAYOR, M. P. T.; KUBOTA, L. T. HRP-based amperometric biosensor for the polyphenols determination in vegetables extract. **Sensors and Actuators B**, v. 96, p. 636-645, 2003.

MERCK. Disponível em: <<https://www.sigmaaldrich.com/BR/pt/product/sigma/p2088>>. Acesso em: 31 de jan. 2014.

METKAR, S. K.; GIRIGOSWAMI, K. Diagnostic biosensors in medicine – A review. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 17, p. 271-283, 2019.

MIRCESKI, V.; SKRZYPEK, S.; STOJANOV, L. Square-wave voltammetry. **ChemTexts**, p. 4-17, 2018.

MIOCEVIC, O.; COLE, C. R.; LAUGHLIN, M. J.; BUCK, R. L.; SLOWEY, P. D.; SHIRTCLIFF, E. A. Quantitative Lateral Flow Assays for Salivary Biomarker Assessment: A Review. **Frontiers in Public Health**, v. 5, n. 133, p. 1-13, 2017.

MOCCELINI, S. K.; SPINELLI, A.; VIEIRA, I. C. Biosensors based on bean sprout homogenate immobilized in chitosan microspheres and silica for determination of chlorogenic acid. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 43, p. 381-387, 2008.

MOHAMAD, R., MARZUKI, H.C., BUANG, A., HUYOP, F., WAHAB, R.A. An overview of technologies for immobilization of enzymes and surface analysis techniques for immobilized enzymes. **Biotechnol. Biotechnol. Equip.**, v. 29, p. 205–220, 2015.

MOHAMED, S. A.; AL-HARBI, M. H.; ALMULAIKY, Y. Q.; IBRAHIM, I. H.; EL-SHISHTAWY, R. M. Immobilization of horseradish peroxidase on Fe₃O₄ magnetic nanoparticles. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 27, p. 84-90, 2017.

MORAWSKI F. M.; CAON N. B.; SOUSA K. A. P.; FAITA FL; PARIZE A. L.; JOST C. L. Hybrid chitosan-coated manganese ferrite nanoparticles for electrochemical sensing of bifenoX herbicide. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 9, p. 106298, 2021.

MOUSSAVI, G.; HADDAD, F. A. Bacterial peroxidase-mediated enhanced biodegradation and mineralization of bisphenol A in a batch bioreactor. **Chemosphere**, v. 222, p. 549-555, 2019.

NANDIYANTO, A. B. D.; OKTIANI, R.; RAGADHITA, R.; How to Read and Interpret FTIR Spectroscopy of Organic Material. **Journal of Science & Technology**, v. 4, p. 97-118, 2019.

NEELAM; CHHILLAR, A. K.; RANA, J. S. Enzyme nanoparticles and their biosensing applications: A review. **Analytical Biochemistry**, v. 581, p. 1-18, 2019.

NELSON, D. L.; FOX, M. M. **Princípio de bioquímicas de Lehninger**. 6ª ed. Porto Alegre: Artmed, 2014.

NEVES, M. M.; GONZÁLEZ-GARCÍA, M. B.; HERNÁNDEZ-SANTOS, D.; FANJUL-BOLADO, P. Future trends in the market for electrochemical biosensing. **Current Opinion in Electrochemistry**, v. 10, p. 107-111, 2018.

NICOLINI, J. V.; RESENDE, N. S.; FERRAZ, H. C. Adsorption of horseradish peroxidase onto titanate nanowires. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 90, p. 739–746, 2015.

NICOLINI, J. V.; RESENDE, N. S.; FERRAZ, H.C. Activity of Horseradish Peroxidase Adsorbed onto Titanate Nanowires. **Adsorption Science & Technology**, v. 33, p. 127–138, 2015.

NICOLINI, J. V.; FERRAZ, H. C.; RESENDE, N. S.; Immobilization of horseradish peroxidase on titanate nanowires for biosensing application. **Journal of Applied Electrochemistry**, v. 46, p. 17–25, 2016.

NOUREN, S.; BHATTI, H. N.; BHATTI, I. A.; ASGHER, M. Kinetic and thermal characterization of peroxidase from peels of *Citrus reticulata* var. Kinnow. **The Journal of Animal & Plant Sciences**, v. 23, p. 430-435, 2013.

OLIVEIRA, I. R. W. Z.; VIEIRA, I. C.; LUPETTI, K. O.; FATIBELLO-FILHO, O.; FÁVERE, V. T.; LARANJEIRA, M. C. M. Biosensor Based on Chitosan Biopolymer and Crude Extract of Ginger (*Zingiber officinales* Rosc.) for the Determination of Hydroquinone in Wastewater of Photographic Process. **Analytical Letters**, v. 37, n. 15, p. 3111-3127, 2004.

OLIVEIRA, I. R. W. Z.; VIEIRA, I. C. Construção e aplicação de biossensores usando diferentes procedimentos de imobilização da peroxidase de vegetal em matriz de quitosana. **Química Nova**, v. 29, No. 5, p. 932-939, 2006.

OLIVEIRA, Inês Rosane Welter Zwirtes de. **Desenvolvimento de biossensores e sensores biomiméticos para determinação de compostos fenólicos**. 174f. 2007. Tese (Doutorado), Universidade Federal de Santa Catarina - UFSC, Florianópolis. 2007.

OLIVEIRA, G.C.; MOCCELINI, S.K.; M. CASTILHO; TEREZO, A.J.; POSSAVATZ, J.; MAGALHÃES, M.R.L.; DORES, E.F.G.C. Biosensor based on atemoia peroxidase immobilized on modified nanoclay for glyphosate biomonitoring. **Talanta**, v. 98, p. 130-136, 2012.

OLIVEIRA, F.K.; SANTOS, L.O.; BUFFON, J.G. Mechanism of action, sources, and application of peroxidases. **Food Research International**, v. 143, p. 110266, 2021.

- OZTEKIN, A.; ALMAZ, Z.; GERNI, S.; EREL, D.; KOCAK, S. M.; SENGÜL, M. E.; OZDEMIR, H. Purification of peroxidase enzyme from radish species in fast and high yield with affinity chromatography technique. **Journal of Chromatography B**, v. 1114-1115, p. 86-92, 2019.
- PACHECO, W. F.; SEMAAN, F. S.; ALMEIDA, V. G. K.; RITTA, A. G. S. L.; AUCÉLIO, R. Q. Voltamétricas: Uma Breve Revisão Sobre os Conceitos. **Revista Virtual de Química**, v. 5, p. 516-537, 2013.
- PANDEY, V. P.; AWASTHI, M.; SINGH, S.; TIWARI, S.; DWIVEDI, U. N. A Comprehensive Review on Function and Application of Plant Peroxidases. **Biochemistry & Analytical Biochemistry**, 2017.
- POHANKA, M. The Piezoelectric Biosensors: Principles and Applications, a Review. **International Journal of Electrochemical Science**, v. 12, p. 496-506, 2017.
- POLESEL, D. N.; SINHORINI, A. L. C.; PERONE, C. A. S. Caracterização cinética da enzima catecolase (Polifenol oxidase) em extratos brutos da polpa e da casca de berinjela (*Solanum melongena L.*). **Journal of the Health Sciences Institute**, v. 28, p. 175-80, 2010.
- PISOCHI, A. M. Biosensors as bio-based materials in chemical analysis: a review. **Journal of Biobased Materials and Bioenergy**, v. 7, p. 19-38, 2013.
- PUTZBACH, W.; RONKAINEN, N. J. Immobilization Techniques in the Fabrication of Nanomaterial-Based Electrochemical Biosensors: A Review. **Sensors**, v. 13, p. 4811-4840, 2013.
- QAYYUM, S.; NASIR, A.; MIAN, A. H.; Rehman, S.; Qayum, S.; Siddiqui, M. F.; Kalsoom, U. Extraction of peroxidase enzyme from different vegetables for biodegradation of vat dyes. **Applied Nanoscience**, v. 10, p. 5191-5199, 2020.
- QUEIROZ, M. L. B.; CONCEIÇÃO, K. C.; MELO, M. N. Imobilização de peroxidase de raiz forte em bagaço de cana-de-açúcar. **Química Nova**, v. 41, n. 9, p. 1019-1024, 2018.
- RAMÍREZ, E. A.; GRANERO, A. M.; ZÓN, M. A.; FERNÁNDEZ, H. Development of an Amperometric Biosensor Based on Peroxidases from *Brassica napus* for the Determination of Ochratoxin a Content in Peanut Samples. **Biosensors & Bioelectronics**, 2011.
- RAOOF, J. B.; KIANI, A.; OJANI, R.; VALIOLLAHI, R. Electrochemical Determination of Dopamine Using Banana-MWCNTs Modified Carbon Paste Electrode. **Analytical and Bioanalytical Electrochemistry**, v. 3, n. 1, p. 59-66, 2011.
- RATHNAMSAMY, S.; SINGH, R.; AUXILIA, R.; VEDHAHARI, B.N. Extraction of peroxidase from various plant sources and its biodegradation studies on phenolic compounds. **Biotechnology**, v. 9, p. 160-165, 2014.
- REIS, A.; LIMA, M. F.; LOPES, C. A.; PINHEIRO, J. B. Principais Doenças do Maxixeiro no Brasil. Disponível em: < <https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/133683/1/CT-145-INTERNET.pdf>>. Acesso em: 05 de jan. 2021.

- RENGE, V. C.; KHEDKAR, S. V.; NANDURKAR, N. R. Enzyme synthesis by fermentation method: a review. **Scientific Reviews and Chemical Communications**, v. 2, n. 4, p. 585-590, 2012.
- RIBEIRO, F. A. S.; TARLEY, C. R. T.; BORGES, K. B.; PEREIRA, A. R. 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**, v. 185, p. 743-754, 2013.
- RON, E.Z., RISHPON, J. Electrochemical cell-based sensors. **Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology**, v. 117, p. 77-84, 2010.
- ROSA, G. P.; BARRETO, M. C.; PINTO, D. C. G. A.; SECA, A. M. L. A Green and Simple Protocol for Extraction and Application of a Peroxidase-Rich Enzymatic Extract. **Methods and protocols**, v. 3, p. 25, 2020.
- ROTARIU, L.; LAGARDE, F.; RENAULT, N. J.; BALA, C. Electrochemical biosensors for fast detection of food contaminants – trends and perspective. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 79, p. 80-87, 2016.
- ROZMYSLOWICZ, T.; SA, J.; LEC, R.; GAULTON, G. N. A Novel Point-of-Care BioNanoSensor for Rapid HIV Detection and Treatment Monitoring. **Journal of AIDS and Clinical Research**, vol. 6, p. 454, 2015.
- SANTOS, Emylle Thayssa Mendonça. **Caracterização bioquímica de peroxidase da abobrinha (*Cucurbita Pepo*)**. 73f. 2019. Dissertação (Mestrado), Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Diamantina. 2019.
- SASSOLAS, A.; BLUM, L.J.; LECA-BOUVIER, B. D. Immobilization strategies to develop enzymatic biosensors. **Biotechnology Advances**, v. 30, p. 489-511, 2012.
- SARROUH, B.; SANTOS, T. M.; MIYOSHI, A.; DIAS, R.; AZEVEDO, V. Up-To-Date Insight on Industrial Enzymes Applications and Global Market. **Journal of Bioprocessing & Biotechniques**, S4:002, 2012.
- SCHMIDT, Thaís Fernandes. **Estudo da interação da peroxidase de raiz forte em interfaces nanoestruturadas**. 151f. 2008. Dissertação (Mestrado), Universidade de São Paulo – USP, São Carlos, 2008.
- SCHROEDER, W.H.; CAVACINI, L. Structure and function of immunoglobulins. **J. Allergy Clin. Immunol.**, v. 125, p. S41-S52, 2010.
- SHUKLA, S.K.; GOVENDER, P.P.; TIWARI, A. Estruturas micelares poliméricas para tecnologia de biossensores. In: IGLIC, A.; KULKARNI, C.V.; RAPPOLT, M. (Eds.). *Avanços em Biomembranas e Automontagem Lipídica*. 1ª ed. Cambridge, MA, EUA: Imprensa Acadêmica, 2016.

SHABANI, R.; RIZI, Z. L.; MOOSAVI, R. Selective Potentiometric Sensor for Isoniazid Ultra-Trace Determination Based on Fe₃O₄ Nanoparticles Modified Carbon Paste Electrode (Fe₃O₄/CPE). *International Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, v. 14, n. 3, p. 241-249, 2018.

SILVA, M. C.; TORRES, J. A.; CORRÊA, A. D.; JUNQUEIRA, A. M. B.; AMORIM, M. T. P.; SANTOS, C. D. Obtention of plant peroxidase and its potential for the decolorization of the reactive dye Remazol Turquoise G 133%. *Water Science & Technology*, v. 65, p. 669-705, 2012.

SILVA, M.C.; CORRÊA, A.D.; AMORIM, M.T.S.P.; PARPOT, P.; TORRES, J.A.; CHAGAS, P.M.B. Decolorization of the phthalocyanine dye reactive blue 21 by turnip peroxidase and assessment of its oxidation products. *J. Mol. Catal. B Enzym.*, v. 77, p. 9–14, 2012.

SILVA, T. M.; SANTOS A. R.; CARAMORI, S. S. Peroxidase from green zucchini (*Cucurbita pepo* L.) immobilized on natural polymers removes phenolic compounds from water samples. *Revista Ambiente e Água*, v. 13, n. e2226, p. 1-12, 2018.

SILVA, Vinícius Carlos Costa. **Estudo eletroanalítico da dopamina utilizando eletrodo de pasta de carbono produzidos com pó de grafite recoberto por eletrodepósitos de ouro.** 54f. 2018. Dissertação (Mestrado), Universidade Federal de Goiás – UFGO, Jataí, 2018.

SINGH, R.S.; SINGH, T.; PANDEY, A. Microbial enzymes—An overview. In: SINGH, R.S.; SINGHANIA, R.R.; PANDEY, A.; LARROCHE, C. (Eds.). *Biomass, Biofuels and Biochemical: Advances in Enzyme Technology*. Elsevier; Amsterdam, Países Baixos. p. 1–40, 2019.

SOUZA, Erika fraga de. **Aplicação de proteases e amilases produzidas por bacillus sp. Smia-2 na remoção de manchas de tecidos.** 77f. 2012. Dissertação (Mestrado), Universidade estadual do norte fluminense – UENF, Campos dos Goytacazes, 2012.

SOUZA, Diego Hoefling. Extração, Purificação e Caracterização Bioquímica de Peroxidase de *Smallanthus sonchifolius* e Sua Aplicação na Bioconversão de Fenol. Tese (Mestrado em Ciências Ambientais), Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC), Lages, 2020.

SOVIĆ, D.; GAJOVIĆ, A.; IVEKOVIĆ, D. Bioelectrocatalytic and biosensing properties of horseradish peroxidase covalently immobilized on (3-aminopropyl)trimethoxysilane-modified titanate nanotubes. *Electrochimica Acta*, v. 56, p. 9953–9960, 2011.

SOLAIMUTHU, A., VIJAYAN, A.N., MURALI, P., KORRAPATI, P.S. Nano-biosensors and their relevance in tissue engineering. *Curr. Opin. Biomed. Eng.*, v. 13, p. 84–93, 2020.

SUHITO, I. R.; ANGELINE, N.; KIM, T. Nanomaterial-modified Hybrid Platforms for Precise Electrochemical Detection of Dopamine. *Biochip Journal*, v. 13, n. 1, p. 20-29, 2019.

SUMITHA, M. S.; XAVIER, T. S. Recent advances in electrochemical biosensors – A brief review. *Hybrid Advances*, v. 2, p. 100023, 2023.

ŠVANCARA, I.; KALCHER, K.; WALCARIUS, A.; VYTRAS, K. **Electroanalysis with carbone paste eletrodes**. 1^a ed. Boca Raton: CRC Press, 2012.

TANG, J.; WANG, Y.; LI, J.; DA, P.; GENGA, J.; ZHENG, G. Sensitive enzymatic glucose detection by TiO₂ nanowire photoelectrochemical biosensors. **Journal of Materials Chemistry A**, v. 2, p. 6153–6157, 2014.

TANG, M.; ZHOU, Z.; SHANGGUANA, L.; ZHAO, F.; LIU, S. Electrochemiluminescent detection of cardiac troponin I by using soybean peroxidase labeled-antibody as signal amplifier. **Talanta**, v. 180, p. 47-53, 2018.

THOMAS, J.; K, A.P.; THOMAS, T.; THOMAS, N. The influence of B-site cation in LaBO₃ (B = Fe, Co, Ni) perovskites on the nanomolar sensing of neurotransmitters. **Sensors & Actuators: B. Chemical**, v. 332, 129362, 2021.

TRAN, T. T.; MULCHANDANI, A. Carbon nanotubes and graphene nano field-effect transistor-based biosensors. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 79, p. 222-232, 2016.

USDA, Agricultural Research Service, National Plant Germplasm System. 2019. Germplasm Resources Information Network (GRIN-Taxonomy). Disponível em: < <https://npgsweb.ars-grin.gov/gringlobal/taxonomydetail.aspx?id=12546>>. Acesso em: 08 de set. 2019.

VASUKI, S.; VARSHA, V.; MITHRA; DHARSHNI, R. A.; ABINAYA, S.; DEVA, R.; DHARSHINI; SIVARAJASEKAR, N. Thermal biosensors and their applications. **American International Journal of Research in Science, Technology, Engineering & Mathematics**. p. 262- p. 264, 2019.

VETAL, M. D.; RATHOD, V. K. Three phase partitioning a novel technique for purification of peroxidase from orange peels (*Citrus sinenses*). **Food and bioproducts processing**, v. 94, p. 284-289, 2015.

VILIAN, A.T. A spick-and-span approach to the immobilization of horseradish peroxidase on Au nanospheres incorporated with a methionine/graphene biomatrix for the determination of endocrine disruptor bisphenol A. **Sensors and Actuators B**, v. 251, p. 804–812. 2017.

WAIFALKAR, P. P.; CHOUGALE, A. D.; KOLLU, P.; PATIL, P. S.; PATIL, P. B. Magnetic nanoparticle decorated graphene based electrochemical nanobiosensor for H₂O₂ sensing using HRP. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 167, p. 425–431, 2018.

WANG, L.; WU, A.; WEI, G. Graphene-based aptasensors: from molecule interface interactions to sensor design and biomedical diagnostics. **Analyst**, v. 143, p. 1526-1543, 2018.

WASITO, H.; FATONI, A.; HERMAWAN, D.; SUSILOWATI, S. S. Immobilized bacterial biosensor for rapid and effective monitoring of acute toxicity in water. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 170, p. 205-209, 2019.

WEI, X.; LIU, T.; LI, J.; CHEN, X. A Magnetic-Controlled Amperometric Biosensor Based on Composite Bio-Particulates Fe₃O₄ and Nano-Au With The Signal Enhancement by Increasing Loading of Horseradish Peroxidase. **International Journal of Electrochemical Science**, v. 6, 2011, p. 4953–4966.

WU, F.; XU, J.; TIAN, Y. Direct Electrochemistry of Horseradish Peroxidase on TiO₂ Nanotube Arrays via Seeded-growth Synthesis, **Biosensors & Bioelectronics**, v. 24, n. 2, p. 198-203, 2008.

WU, L. Enzymatic biosensor of horseradish peroxidase immobilized on Au-Pt nanotube/Au-graphene for the simultaneous determination of antioxidants. **Analytica Chimica Acta**, v. 933, p. 89-96, 2016.

WU, J.; LIU, H.; CHEN, W. Device integration of electrochemical biosensors. **Nature Reviews Bioengineering**, v. 1, p. 346–360, 2023.

XIAO, Y.; PATOLSKY, F.; KATZ, E.; HAINFELD, J.F.; WILLNER, I. “Plugging into enzymes”: Nanowiring of redox enzymes by a gold nanoparticle. **Science**, v. 299, p. 1877–1881, 2003.

XIAO, P.; ZHANG, Y.; CAO, G. Effect of Surface Defects on Biosensing Properties of TiO₂ Nanotube Arrays, **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 155, n. 1, p. 159-164, 2011.

XIE, L. Q.; ZHANG, Y. H.; GAO, F.; WU, Q. A.; XU, P. Y.; WANG, S. S.; GAO, N. N.; WANG, Q. X. A highly sensitive dopamine sensor based on a polyaniline/reduced graphene oxide/Nafion nanocomposite. **Chinese Chemical Letters**, v. 28, p. 41–48, 2017.

YADAV, M.; YADAV, H.S. Applications of ligninolytic enzymes to pollutants, wastewater, dyes, soil, coal, paper and polymers. **Environ. Chem. Lett.**, v. 13, p. 309–318, 2015.

YAKOVLEVA, M.; BHAND, S.; DANIELSSON, B. The enzyme thermistor – A realistic biosensor concept. A critical Review. **Analytica Chimica Acta**, v. 766, p. 1-12, 2013.

YALÇINER, F.; CEVIK, E.; SENEL, M.; BAYKAL, A. Development of an Amperometric Hydrogen Peroxide Biosensor based on the Immobilization of Horseradish Peroxidase onto Nickel Ferrite Nanoparticle-Chitosan Composite. **Nano-Micro Letters**, v. 3, n. 2, 2011, p. 91–98.

YANG, F.; MA, Y.; STANCIU, S. G.; WU, A. Chapter 2 - Transduction Process-Based Classification of Biosensors. In: Wu, A.; Khan, W.S. (Eds.). **Nanobiosensors: From Design to Applications**. 2020. DOI: 10.1002/9783527345137.

YÁÑEZ-SEDEÑO, P; AGÜÍ, L.; VILLALONGA, R.; PINGARRÓN, J.M. Biosensors in forensic analysis. A review. **Analytica Chimica Acta**, v. 823, p. 1-19, 2014.

ZDARTA, J.; MEYER, A. S.; JESIONOWSKI, T.; PINELO, M. Developments in support materials for immobilization of oxidoreductases: A comprehensive review. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 258, p. 1–20, 2018.

ZHANG, Y.; WEI, Q. The role of nanomaterials in electroanalytical biosensors: A mini review. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 781, p. 401-409, 2016.

ZHANG, N.; ZHANG, L.; RUAN, Y.; ZHAO, W.; XU, J.; CHEN, H. Quantum-dots-based photoelectrochemical bioanalysis highlighted with recent examples. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 94, p. 207-218, 2017.

ZHAO, R.; LIU, X.; ZHANG, J.; ZHU, J.; WONG, D. Enhancing direct electron transfer of glucose oxidase using a gold nanoparticle/titanate nanotube nanocomposite on a biosensor. **Electrochimica Acta**, v. 163, p.64–70, 2015.

ZHOU, Y.; FANG, Y.; RAMASAMY, R. P. Non-Covalent Functionalization of Carbon Nanotubes for Electrochemical Biosensor Development. **Sensor**, v. 392, p. 1-29, 2019.

CAPÍTULO 13. ANEXOS

Anexo I – Absorbâncias Médias e Atividades de Extratos de Diferentes Vegetais

Anexo II – Absorbâncias Médias e Atividades de Extrato de Maxixe em diferentes valores de pH

Anexo III – Absorbâncias Médias do EMX-R, EMX-F e HRP em Diferentes Dias

Anexo IV – Valores de Δi para os biossensores de NTTP-R, NTTP -F e NTT-HRP em Diferentes Dias

Anexo I – Absorbâncias Médias e Atividades de Extratos de Diferentes Vegetais

FEIJÃO VERDE		JILÓ		MAXIXE		COUVE-FLOR	
Atividade	4080	Atividade	5700	Atividade	5100	Atividade	3190
ΔABS	= 0,749 – 0,341	ΔABS	= 0,912 – 0,342	ΔABS	= 0,843 – 0,333	ΔABS	= 0,578 – 0,153
ΔT (s)	= 40 - 10	ΔT (s)	= 40 - 10	ΔT (s)	= 40 - 10	ΔT (s)	= 50 - 10
Tempo (s)	ABS	Tempo (s)	ABS	Tempo (s)	ABS	Tempo (s)	ABS
10	0,341	10	0,342	10	0,333	10	0,153
20	0,499	20	0,572	20	0,533	20	0,270
30	0,630	30	0,761	30	0,698	30	0,385
40	0,749	40	0,912	40	0,843	40	0,487
50	0,846	50	1,034	50	0,974	50	0,578
60	0,923	60	1,105	60	1,089	60	0,663
70	0,995	70	1,198	70	1,191	70	0,742
80	1,057	80	1,256	80	1,282	80	0,810
90	1,116	90	1,298	90	1,365	90	0,872
100	1,166	100	1,329	100	1,437	100	0,926
110	1,211	110	1,348	110	1,505	110	0,975
120	1,256	120	1,359	120	1,562	120	1,020

HORTELÃ P.		BOLDO		C. MARACUJÁ	
Atividade	30	Atividade	200	Atividade	502
ΔABS	= 0,031 – 0,020	ΔABS	= 0,104- 0,084	ΔABS	= 0,215 – 0,064
ΔT (s)	= 120-10	ΔT (s)	= 50 - 20	ΔT (s)	= 110-20
Tempo (s)	ABS	Tempo (s)	ABS	Tempo (s)	ABS
10	0,020	10	0,060	10	0,054
20	0,020	20	0,084	20	0,064
30	0,021	30	0,094	30	0,081
40	0,023	40	0,099	40	0,097
50	0,023	50	0,104	50	0,114
60	0,024	60	0,104	60	0,132
70	0,024	70	0,104	70	0,149
80	0,026	80	0,103	80	0,165
90	0,028	90	0,102	90	0,183
100	0,029	100	0,103	100	0,200
110	0,030	110	0,103	110	0,215
120	0,031	120	0,103	120	0,230

Anexo II – Absorbâncias Médias e Atividades de Extrato de Maxixe em diferentes valores de pH

pH 4,0		pH 4,5		pH 5,0		pH 5,5	
Atividade	320	Atividade	543	Atividade	1109	Atividade	1418
ΔABS	= 0,112 - 0,031	ΔABS	= 0,159 - 0,087	ΔABS	= 0,402 - 0,107	ΔABS	= 0,515 - 0,090
ΔT (s)	= 100 - 50	ΔT (s)	= 100 - 60	ΔT (s)	= 110 - 30	ΔT (s)	= 110 - 20
Tempo (s)	ABS	Tempo (s)	ABS	Tempo (s)	ABS	Tempo (s)	ABS
10	0,031	10	0,023	10	0,051	10	0,053
20	0,035	20	0,029	20	0,076	20	0,090
30	0,042	30	0,041	30	0,107	30	0,135
40	0,050	40	0,055	40	0,144	40	0,181
50	0,058	50	0,071	50	0,179	50	0,229
60	0,069	60	0,087	60	0,216	60	0,278
70	0,079	70	0,105	70	0,254	70	0,326
80	0,090	80	0,123	80	0,291	80	0,375
90	0,101	90	0,141	90	0,328	90	0,424
100	0,112	100	0,159	100	0,364	100	0,470
110	0,124	110	0,177	110	0,402	110	0,515
120	0,134	120	0,197	120	0,435	120	0,559

pH 6,0		pH 6,5		pH 6,8		pH 6,9	
Atividade	2887	Atividade	5090	Atividade	5483	Atividade	5597
ΔABS	= 0,469 - 0,180	ΔABS	= 0,784 - 0,275	ΔABS	= 0,837 - 0,289	ΔABS	= 0,899 - 0,339
ΔT (s)	= 40 - 10	ΔT (s)	= 40 - 10	ΔT (s)	= 40 - 10	ΔT (s)	= 40 - 10
Tempo (s)	ABS	Tempo (s)	ABS	Tempo (s)	ABS	Tempo (s)	ABS
10	0,180	10	0,275	10	0,289	10	0,339
20	0,276	20	0,482	20	0,531	20	0,587
30	0,375	30	0,648	30	0,705	30	0,766
40	0,469	40	0,784	40	0,837	40	0,899
50	0,560	50	0,904	50	0,943	50	1,008
60	0,644	60	1,000	60	1,035	60	1,103
70	0,721	70	1,081	70	1,112	70	1,183
80	0,791	80	1,151	80	1,179	80	1,249
90	0,852	90	1,211	90	1,234	90	1,305
100	0,908	100	1,262	100	1,281	100	1,348
110	0,958	110	1,305	110	1,319	110	1,384
120	1,003	120	1,335	120	1,350	120	1,411

pH 7,0		pH 7,1		pH 7,2		pH 7,5	
Atividade	5980	Atividade	5023	Atividade	4277	Atividade	3923
ΔABS	= 0,934 - 0,336	ΔABS	= 0,894 - 0,392	ΔABS	= 0,778 - 0,350	ΔABS	= 0,797 - 0,404
ΔT (s)	= 40 - 10	ΔT (s)	= 40 - 10	ΔT (s)	= 40 - 10	ΔT (s)	= 40 - 10
Tempo (s)	ABS	Tempo (s)	ABS	Tempo (s)	ABS	Tempo (s)	ABS
10	0,336	10	0,392	10	0,350	10	0,404
20	0,608	20	0,622	20	0,531	20	0,573
30	0,795	30	0,777	30	0,664	30	0,698
40	0,934	40	0,894	40	0,778	40	0,797
50	1,046	50	0,993	50	0,869	50	0,883
60	1,139	60	1,081	60	0,953	60	0,960
70	1,217	70	1,154	70	1,028	70	1,025
80	1,283	80	1,217	80	1,091	80	1,083
90	1,333	90	1,271	90	1,147	90	1,133
100	1,374	100	1,314	100	1,197	100	1,175
110	1,404	110	1,349	110	1,238	110	1,210
120	1,425	120	1,376	120	1,276	120	1,240

pH 8,0		pH 8,5		pH 9,0	
Atividade	3127	Atividade	2383	Atividade	2023
ΔABS	= 0,814 - 0,501	ΔABS	= 0,550 - 0,312	ΔABS	= 0,551 - 0,551
ΔT (s)	= 40 - 10	ΔT (s)	= 40 - 10	ΔT (s)	= 40 - 10
Tempo (s)	ABS	Tempo (s)	ABS	Tempo (s)	ABS
10	0,501	10	0,312	10	0,551
20	0,628	20	0,411	20	0,436
30	0,728	30	0,486	30	0,499
40	0,814	40	0,550	40	0,551
50	0,889	50	0,607	50	0,602
60	0,962	60	0,660	60	0,647
70	1,027	70	0,708	70	0,689
80	1,088	80	0,753	80	0,728
90	1,142	90	0,795	90	0,764
100	1,195	100	0,832	100	0,796
110	1,242	110	0,867	110	0,824
120	1,282	120	0,899	120	0,848

Anexo III – Absorbâncias Médias do EMX-R, EMX-F e HRP em Diferentes Dias

DIA	1			2			3		
EXTRATO	EMX-F	EMX-R	HRP	EMX-F	EMX-R	HRP	EMX-F	EMX-R	HRP
TEMPO (s)	ABS			ABS			ABS		
10	0,168	0,289	0,266	0,143	0,288	0,241	0,135	0,256	0,222
20	0,254	0,460	0,416	0,233	0,460	0,386	0,221	0,424	0,363
30	0,334	0,606	0,543	0,316	0,603	0,509	0,298	0,559	0,479
40	0,405	0,727	0,655	0,384	0,723	0,615	0,364	0,658	0,580
50	0,472	0,826	0,751	0,447	0,819	0,705	0,424	0,772	0,667
60	0,530	0,907	0,831	0,505	0,876	0,782	0,472	0,847	0,741

DIA	7			13			20		
EXTRATO	EMX-F	EMX-R	HRP	EMX-F	EMX-R	HRP	EMX-F	EMX-R	HRP
TEMPO (s)	ABS			ABS			ABS		
10	0,133	0,264	0,192	0,140	0,288	0,225	0,138	0,249	0,192
20	0,214	0,433	0,326	0,222	0,467	0,366	0,205	0,410	0,314
30	0,285	0,568	0,444	0,294	0,614	0,483	0,271	0,544	0,420
40	0,345	0,687	0,540	0,357	0,734	0,588	0,331	0,655	0,510
50	0,400	0,786	0,626	0,413	0,827	0,677	0,383	0,747	0,589
60	0,449	0,861	0,697	0,464	0,895	0,757	0,433	0,820	0,658

DIA	27			DIA	EMX-F	EMX-R	HRP
EXTRATO	EMX-F	EMX-R	HRP		ATIVIDADE (U/mL)		
TEMPO (s)	ABS						
10	0,130	0,252	0,176	1	4720	8770	7780
20	0,207	0,407	0,293	2	4830	8710	7470
30	0,277	0,537	0,388	3	4590	8050	7150
40	0,339	0,647	0,474	7	4250	8450	6960
50	0,395	0,737	0,545	13	4340	8910	7260
60	0,446	0,809	0,610	20	3850	8120	6370
				27	4180	7900	5950

Anexo IV – Valores de Δi para os biossensores de NTTP-R, NTTP -F e NTT-HRP em Diferentes Dias

DIA	NTTP-F				
	#1	#2	#3	MÉDIA (μA)	DP
<i>1</i>	43,7	42,8	42,4	43,0	0,7
<i>2</i>	33,0	31,4	31,1	31,8	1,0
<i>3</i>	28,7	29,5	30,9	29,7	1,1
<i>8</i>	38,3	31,6	32,3	34,1	3,7
<i>14</i>	35,7	32,6	37,2	35,2	2,3
<i>23</i>	31,1	33,1	32,8	32,3	1,1
<i>30</i>	24,7	21,9	26,9	24,5	2,5
DIA	NTTP-R				
	#1	#2	#3	MÉDIA (μA)	DP
<i>1</i>	41,3	41,6	38,5	40,5	1,7
<i>2</i>	28,0	28,8	26,7	27,8	1,1
<i>3</i>	26,0	26,9	27,3	26,7	0,7
<i>8</i>	32,6	32,3	32,3	32,4	0,2
<i>14</i>	28,0	27,1	30,6	28,6	1,8
<i>23</i>	28,4	26,8	30,6	28,6	1,9
<i>30</i>	25,7	21,6	23,6	23,6	2,1
DIA	NTT-HRP				
	#1	#2	#3	MÉDIA (μA)	DP
<i>1</i>	41,0	44,0	39,2	41,4	2,4
<i>2</i>	25,5	25,4	28,1	26,3	1,5
<i>3</i>	28,5	28,4	27,4	28,1	0,6
<i>8</i>	29,6	31,1	28,4	29,7	1,4
<i>14</i>	28,7	25,3	23,1	25,7	2,8
<i>23</i>	31,3	28,8	30,7	30,3	1,3
<i>30</i>	22,4	20,7	19,4	20,8	1,5

