

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

NATÁLIA GOEDEL MEDEIROS

**DESENVOLVIMENTO DE BIOSSENSOR BASEADO EM
TIROSINASE PARA DETERMINAÇÃO DE ADENOSINA**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Porto Alegre, março de 2017.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

NATÁLIA GOEDEL MEDEIROS

**DESENVOLVIMENTO DE BIOSSENSOR BASEADO EM
TIROSINASE PARA DETERMINAÇÃO DE ADENOSINA**

Dissertação apresentada como requisito parcial
para a obtenção do grau de Mestre em Química

Prof.^a Dra. Jacqueline Arguello da
Silva
Orientadora

Prof. Dr. Lauro Tatsuo Kubota
Co-orientador

Porto Alegre, março de 2017.

A presente dissertação foi realizada no período entre (março/2015) e (fevereiro/2017), no Instituto de Química da Universidade Federal do Rio Grande do Sul sob Orientação da Professora Doutora Jacqueline Arguello da Silva e Co-orientação do Professor Doutor Lauro Tatsuo Kubota. A dissertação foi julgada adequada para a obtenção do título de Mestre em Química pela seguinte banca examinadora:

Comissão Examinadora:

Prof. Dr. Paulo C. Nascimento

Prof. Dr. Marco Flores Ferrão

Prof^a Dr^a. Leandra Franciscato Campo

Prof^a Dr^a. Jacqueline Argüello

Prof. Dr. Lauro T. Kubota

Natália Goedel Medeiros

"O que sabemos é uma gota, o que ignoramos é um oceano"

Isaac Newton

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Marco e Marquit, que sempre me incentivaram e me apoiaram em todas minhas decisões profissionais, que compreenderam a minha ausência em muitos churrascos de domingo e sempre estiveram disponíveis pra me escutar mesmo não entendendo muito bem o que era o meu trabalho.

Ao meu namorado Marcelo por todo companheirismo, paciência, compreensão e incentivo, tanto nos momentos felizes quanto tristes. E ainda mais importante, por acreditar na minha capacidade e me fazer acreditar nela também.

À minha orientadora Jacqueline por embarcar comigo nessa jornada, por aceitar o desafio de trabalhar com algo não familiar, pelos conhecimentos divididos comigo, pelas idas aos congressos e pelas longas conversas e risadas que demos nesses anos. Ao professor Lauro, agradeço por me acolher como co-orientanda e pelos valiosos conselhos e observações ao trabalho.

Aos meus colegas de laboratório, Vanessa e Filomeno, pelo apoio de sempre, pelas boas conversas que fizeram com que o tempo voasse sempre que estávamos juntos, pela amizade e principalmente agradeço pela ajuda e mão na massa na reta final do trabalho.

À UFRGS, PPGQ, IQ, CNPq e CAPES pelo apoio financeiro e estrutural que possibilitou a realização deste trabalho.

**Trabalhos apresentados em congressos dos resultados descritos na
Dissertação**

- NATÁLIA GOEDEL MEDEIROS, JACQUELINE AGUELLO, LAURO T. KUBOTA. Determinação de adenosina utilizando eletrodo de carbono impresso modificado com nanopartículas de ouro e tirosinase. IV Escola de Bioanalítica, Campinas, SP (abril/2016).

- NATÁLIA GOEDEL MEDEIROS, JACQUELINE AGUELLO, LAURO T. KUBOTA. Desenvolvimento de biossensor a base de tirosinase para determinação de adenosina. 18º Encontro Nacional de Química Analítica, Florianópolis, SC (setembro/2016).

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	viii
LISTA DE TABELAS	xii
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xiii
RESUMO.....	xiv
ABSTRACT.....	xv
1. INTRODUÇÃO	16
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	18
2.1 Adenosina	18
2.2 Biossensores.....	26
2.2.1 Definição e classificação	26
2.2.2 Métodos de imobilização	32
2.3 Enzimas.....	35
2.3.1 Definição e estrutura	35
2.3.2 Classificação e nomenclatura das enzimas	36
2.3.3 Atividade e cinética enzimática	37
2.3.4 Inibição enzimática.....	43
2.3.5 Tirosinase.....	44
2.4 Nanopartículas de ouro	47
2.5 Eletrodos impressos	48
2.6 Breve descrição das técnicas eletroquímicas utilizadas neste trabalho	50
2.6.1 Voltametria	50
2.6.1.1 Voltametria Cíclica.....	51
2.6.1.2 Voltametria de Pulso Diferencial	53
2.6.2 Cronoamperometria	55
2.7 Espectroscopia de absorção molecular no UV-Vis.....	57
3. PARTE EXPERIMENTAL	59

3.1	 Materiais e reagentes	59
3.2	 Instrumentação	60
3.3	 Síntese das nanopartículas de ouro	60
3.1	 Preparação do biossensor	61
3.2	 Medidas Eletroquímicas	61
3.3	 Estudo da oxidação do catecol na presença de adenosina por Espectroscopia de Absorção no UV-Vis	63
4.	 RESULTADOS E DISCUSSÃO	64
4.1	 Síntese e caracterização das nanopartículas de ouro	64
4.2	 Caracterização dos sensores e do biossensor	68
4.2.1	 Análise da morfologia dos sensores e do biossensor	68
4.2.2	 Caracterização eletroquímica do biossensor	69
4.2.3	 Determinação da constante cinética de Michaelis-Menten da tirosinase imobilizada	79
4.2.4	 Estabilidade do biossensor	83
4.3	 Determinação direta de adenosina por eletro-oxidação	84
4.4	 Estudo por Espectroscopia de Absorção Molecular no UV-Vis	92
4.4.1	 Estudo da interação entre catecol e adenosina	92
4.4.2	 Estudo da inibição enzimática da tirosinase pela adenosina	95
5.	 CONCLUSÃO	99
6.	 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	101

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Fórmula estrutural da adenosina.....	18
Figura 2. Esquema da construção de um biossensor (traduzido e adaptado da Ref. 30).	28
Figura 3. Ilustração dos métodos de imobilização de enzimas (traduzido e adaptado da Ref. 36).....	33
Figura 4. Fórmula estrutural do polímero Nafion.	35
Figura 5. Nomenclatura oficial, exemplo da tirosinase E.C. 1.14.18.1.....	37
Figura 6. Efeito da enzima sobre a energia de ativação de uma reação (traduzido e adaptado da Ref. 37).	39
Figura 7. Efeito da concentração do substrato na velocidade inicial da reação enzimática.	41
Figura 8. Gráfico de Lineweaver-Burk.....	42
Figura 9. Gráfico do efeito de um inibidor competitivo e outro não-competitivo sobre a velocidade inicial versus [S].	44
Figura 10. Representação tridimensional da estrutura secundária da tirosinase de <i>Bacillus megaterium</i> (adaptado da Ref. 43).	45
Figura 11. Ciclo catalítico da tirosinase (reproduzido da Ref. 44).....	46
Figura 12. A) Curva de potencial versus tempo. B) Voltamograma cíclico de uma solução de $K_3Fe(CN)_6$ 6×10^{-3} mol L ⁻¹ e KNO_3 1 mol L ⁻¹ . (Reproduzido da Ref. 67). ..	52
Figura 13. Sinais de excitação em voltametria de pulso diferencial (reproduzido da Ref. 66).	54
Figura 14. Experimento de cronoamperometria: (a) forma da onda potencial-tempo; (b) mudança no perfil de concentração com o tempo; (c) resposta corrente-tempo resultante; (traduzido da Ref. 70).....	56

Figura 15. Cronoamperograma obtido pela adição de concentrações crescentes do analito (adaptado da Ref. 71).....	57
Figura 16. Foto da célula eletroquímica e do potenciostato utilizados.....	60
Figura 17. Espectro no UV-Vis da solução coloidal com o pico característico de ressonância plasmônica superficial em 522 nm.....	65
Figura 18. A) Imagem de MET das AuNPs. B) Histograma da distribuição de diâmetro.	66
Figura 19. Imagens de MEV da superfície dos eletrodos (A) AuNPs/SPE, (B) Nafion/AuNPs/SPE e (C) Nafion/Tyr/AuNPs/SPE. (D) Perfil de linha de uma área superficial dos eletrodos modificados (i) AuNPs/SPE, (ii) Nafion/AuNPs/SPE e (iii) Nafion/Tyr/AuNPs/SPE.....	69
Figura 20. Voltamogramas cíclicos com o biossensor Nafion/Tyr/AuNPs/SPE (linha preta) e SPE (linha vermelha) na presença de $7,39 \times 10^{-4}$ mol L ⁻¹ de tirosina. Solução eletrolítica: TF 0,1 mol L ⁻¹ pH=7,3. Velocidade de varredura: 20 mV s ⁻¹	70
Figura 21. Voltamogramas cíclicos do biossensor (a) em branco, na presença de (b) $4,95 \times 10^{-4}$ mol L ⁻¹ , (c) $9,80 \times 10^{-4}$ mol L ⁻¹ e (d) $1,46 \times 10^{-3}$ mol L ⁻¹ de tirosina. Solução eletrolítica: TF 0,1 mol L ⁻¹ pH=7,3. Velocidade de varredura: 20 mV s ⁻¹	71
Figura 22. A) Voltamogramas cíclicos do biossensor na presença de $1,46 \times 10^{-3}$ mol L ⁻¹ de tirosina (a) e após adição de $1,90 \times 10^{-4}$ mol L ⁻¹ (b) e $2,83 \times 10^{-4}$ mol L ⁻¹ de adenosina (c). B) Voltamogramas cíclicos na presença de $1,46 \times 10^{-3}$ mol L ⁻¹ de tirosina (a) e após adição de $1,90 \times 10^{-2}$ mol L ⁻¹ (b) e $2,83 \times 10^{-2}$ mol L ⁻¹ de NH ₄ OH (c). Solução eletrolítica: TF 0,1 mol L ⁻¹ pH=7,3. Velocidade de varredura: 20 mV s ⁻¹	72
Figura 23. A) Voltamograma cíclico da redução da <i>o</i> -quinona e oxidação do catecol sobre a superfície do biossensor. B) Ilustração do mecanismo de oxidação enzimática do catecol a <i>o</i> -quinona e redução eletroquímica da <i>o</i> -quinona na superfície do eletrodo.....	74
Figura 24. Voltamograma cíclico de $7,38 \times 10^{-4}$ mol L ⁻¹ de catecol, em solução eletrolítica de tampão fosfato pH=7.3, com o biossensor Nafion/Tyr/AuNPs/SPE, e com os sensores AuNPs/SPE e SPE. Velocidade de varredura: 20 mV s ⁻¹	75

Figura 25. Voltamograma cíclico de $7,38 \times 10^{-4}$ mol L ⁻¹ de catecol (linha sólida) e após a adição de $2,17 \times 10^{-4}$ mol L ⁻¹ de adenosina (linha tracejada), em solução eletrolítica de tampão fosfato 0,1 mol L ⁻¹ pH = 7,3 , com o biossensor Nafion/Tyr/AuNPs/SPE. Velocidade de varredura: 20 mV s ⁻¹	76
Figura 26. Voltamograma cíclico de $7,38 \times 10^{-4}$ mol L ⁻¹ de catecol (linha sólida) e após a adição de $2,17 \times 10^{-4}$ mol L ⁻¹ de adenosina (linha tracejada), em solução eletrolítica de tampão fosfato 0,1 mol L ⁻¹ pH = 7,3, com o sensor SPE. Velocidade de varredura: 20 mV s ⁻¹	77
Figura 27. Exemplos de adutos formados por o-quinonas e adenina ou adenosina, em A) aduto formado pela dopamina o-quinona e pela adenina da Ref. 69, em B) aduto formado pelo estrógeno-catecol e adenina da Ref. 70 e em C) a ligação formada pela dopamina o-quinona e adenosina da Ref. 71.....	78
Figura 28. A) Voltamogramas de Pulso Diferencial registrados na solução branco e após sucessivas adições de catecol para a construção da curva cinética. B) Voltamogramas registrados na solução branco (linha preta), após adição de adenosina (linha tracejada) e após sucessivas adições de catecol.	80
Figura 29. A) Curva cinética de Michaelis-Menten com o substrato catecol na ausência (normal) e na presença da adenosina. B) Gráfico de Lineweaver-Burk das duas curvas.....	81
Figura 30. Cartas de controle da resposta a 5×10^{-5} mol L ⁻¹ de catecol do biossensor Nafion/Tyr/AuNPs/SPE armazenado (A) seco e (B) imerso em tampão fosfato 0,1 mol L ⁻¹ pH= 7,3.....	84
Figura 31. Mecanismo de eletro-oxidação da adenosina (reproduzido da Ref. 84).....	85
Figura 32. A) Voltamogramas cíclicos mostrando a eletro-oxidação da adenosina sobre o eletrodo SPE (i) e AuNPs/SPE (ii). B) Voltamogramas cíclicos registrados na ausência (linha tracejada) e na presença de adenosina (linha contínua) sobre o biossensor Nafion/Tyr/AuNPs/SPE. [adenosina] = $1,0 \times 10^{-4}$ mol L ⁻¹	86
Figura 33. Cronoamperogramas dos sensores SPE, AuNPs/SPE, Nafion/AuNPs/SPE e o biossensor Nafion/Tyr/AuNPs/SPE obtidos pelo aumento da concentração de adenosina em solução de tampão fosfato 0,1 mol L ⁻¹ contendo 0,05 mol L ⁻¹ KCl, pH=7.3, E _{ap} = +1,0 V.	87

Figura 34. A) Triplicata dos cronoamperogramas da adenosina realizados com o Nafion/Tyr/AuNPs/SPE. B) Curva de calibração para adenosina com o Nafion/Tyr/AuNPs/SPE.	88
Figura 35. Espectros de absorção molecular no UV-Vis dos reagentes utilizados no estudo.....	93
Figura 36. A) Espectro de absorção molecular no UV-Vis do catecol $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ em meio de tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH= 7,3 na presença de adenosina $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ em função do tempo. B) Gráfico de absorbância em 416 nm versus tempo de reação.....	94
Figura 37. A) Espectro de absorção molecular no UV-Vis do catecol $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ em meio de ácido clorídrico $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ na presença de adenosina $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ em função do tempo. B) Gráfico de absorbância em 416 nm versus tempo de reação.	94
Figura 38. Fotos da solução de catecol $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ dissolvido em NaOH $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ em três diferentes estágios: (A) imediatamente após a dissolução do catecol, (B) durante o tempo do experimento e (C) duas horas após.	95
Figura 39. Espectros de absorção no UV-Vis dos reagentes utilizados para avaliar a inibição enzimática.	96
Figura 40. Espectros de absorção no UV-Vis das misturas para avaliar a inibição enzimática pela adenosina.....	97

LISTA DE TABELAS

Tabela I. Classificação internacional das enzimas (traduzido e adaptado da Ref. 37).	36
Tabela II. Relação da absorvância das AuNPs no pico de ressonância do plasma de superfície (A_{spr}) à absorvância a 450 nm (A_{450}) em dependência do diâmetro de partícula proposto na Ref. 74.	65
Tabela III. Comparação da constante aparente de Michaelis-Menten para catecol com diferentes biossensores de tirosinase.....	82
Tabela IV. Comparação dos resultados do método proposto com outras técnicas de determinação da adenosina.	91

LISTA DE ABREVIATURAS

- [ES]** – Concentração do complexo enzima-substrato
- [S]** – Concentração do substrato
- ADP** – Difosfato de adenosina
- AMP** – Monofosfato de adenosina
- ATP** – Trifosfato de adenosina
- AuNPs** – Nanopartículas de ouro
- CA** – Cronoamperometria
- CGE-LIF** – Eletroforese Capilar em Gel com fluorescência induzida por laser
- CL** – Quimiluminescência
- CLAE** – Cromatografia Líquida de alta eficiência
- CV** – Voltametria Cíclica
- DPV** – Voltametria de Pulso Diferencial
- ESI-IMS** – Espectrometria de mobilidade iônica com ionização por electrospray
- GC-MS** – Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas
- K_m – Constante de Michaelis-Menten
- MET** – Microscopia Eletrônica de Transmissão
- MEV** – Microscopia Eletrônica de Varredura
- SPE** – *Screen-printed carbon electrode* (Eletrodo de carbono impresso)
- SPR** – Ressonância plasmônica de superfície
- SWV** – Voltametria por onda quadrada
- TF** – Tampão fosfato
- UV-Vis** – Ultravioleta e visível
- V_0 – Velocidade inicial
- $V_{máx}$ – Velocidade máxima

RESUMO

Neste trabalho relata-se pela primeira vez a determinação de adenosina por um biossensor baseado em tirosinase. O biossensor foi desenvolvido mediante a modificação de um eletrodo de carbono impresso (SPE) com nanopartículas de ouro (AuNPs), tirosinase (Tyr) e Nafion, denominado biossensor Nafion/Tyr/AuNPs/SPE. As AuNPs sintetizadas possuem diâmetro médio de $15,0 \pm 1,1$ nm e sua função é melhorar a via de condução de elétrons entre a enzima e o eletrodo. Utilizou-se o aprisionamento com filme Nafion® para evitar a lixiviação enzimática da superfície do eletrodo. A tirosinase imobilizada apresentou boa atividade frente ao substrato catecol. Verificou-se que a adenosina atua como um inibidor do tipo não-competitivo. O biossensor é estável durante pelo menos 45 dias. Além disso, foi realizada a eletro-oxidação da adenosina para sua determinação. O biossensor apresenta sensibilidade superior em comparação com SPE, AuNPs/SPE e Nafion/AuNPs/SPE. As curvas de calibração revelaram duas faixas lineares para as concentrações de adenosina, de $1,0 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ até $5,0 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ e entre $6,0 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ e $1,2 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹. O limite de detecção ($3 \times$ (desvio padrão + média dos brancos)/coeficiente angular da curva) foi de $7,0 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹.

Palavras-chave: adenosina, tirosinase, biossensor, nanopartículas de ouro, eletrodos de carbono impresso.

ABSTRACT

In this work we report for the first time the determination of adenosine by a biosensor based on tyrosinase. The biosensor was developed by modifying a screen-printed carbon electrode (SPE) with gold nanoparticles (AuNPs), tyrosinase (Tyr) and Nafion, denoted as Nafion/Tyr/AuNPs/SPE biosensor. The synthesized AuNPs have a mean diameter of 15.0 ± 1.1 nm and their function is to improve the electron conduction pathway between the enzyme and the electrode. The entrapment with Nafion® film was selected to prevent the enzyme lixiviation from the electrode surface. Immobilized tyrosinase showed good activity with the catechol substrate. It was found that adenosine acts as a non-competitive type inhibitor. The biosensor is stable for at least 45 days. In addition, the electro-oxidation of adenosine was performed for its determination. The biosensor has superior sensitivity compared to SPE, AuNPs/SPE and Nafion/AuNPs/SPE. Calibration curves revealed two linear ranges for adenosine concentrations of $1,0 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ up to $5,0 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ and from $6,0 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ to $1,2 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹. The detection limit ($3 \times$ (standard deviation + mean of blanks)/slope of the curve) was $7,0 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹.

Keywords: adenosine, tyrosinase, biosensor, gold nanoparticles, screen-printed electrode.

1. INTRODUÇÃO

A adenosina é um nucleosídeo púrico endógeno encontrado naturalmente em ambientes intra e extracelular, tanto em seres humanos quanto em animais. Esta biomolécula possui função vital em muitos processos bioquímicos, como neurotransmissor, vasodilatador do sistema circulatório e também está envolvida em respostas inflamatórias e imunológicas do organismo. Observa-se que há um aumento anormal do nível basal em condições metabolicamente estressantes, como na presença de um câncer ou de uma isquemia. Dessa forma, esta biomolécula pode ser utilizada como um biomarcador para carcinomas. Além disso, seu envolvimento em outros processos biológicos e patológicos vem sendo investigado.

A determinação da adenosina possui grande interesse biológico e clínico. Neste contexto, os biossensores apresentam vantagens em relação às técnicas analíticas de alta precisão que utilizam equipamentos de alto custo, além de preparo dispendioso de amostras e treinamento operacional, pois os biossensores são dispositivos de baixo custo relativo, fácil utilização, reposta analítica rápida e requerem pouco ou nenhum preparo de amostras. Na sua configuração, os biossensores combinam um biocomponente, que faz o reconhecimento da substância de interesse através de uma reação bioquímica, e o transdutor químico ou físico, o qual é responsável pela transformação da resposta química obtida em um sinal mensurável.

Os biossensores enzimáticos são os mais estudados devido ao grande número de enzimas disponíveis e também pela seletividade e estabilidade que o sistema enzimático fornece. Pelo qual, para a construção de um biossensor para determinação da adenosina, fez-se o uso da enzima tirosinase, uma enzima oxidoredutase. O eletrodo de carbono impresso que foi utilizado neste trabalho, apresenta à grande vantagem de possuir os três eletrodos, o eletrodo de trabalho, o contra-eletrodo e o eletrodo de referência, combinados em apenas uma plataforma de tamanho miniaturizado. Na preparação do biossensor, também se optou pela utilização de nanopartículas de ouro com o

intuito de amplificar o sinal analítico e de proporcionar uma melhor condição para imobilização da tirosinase.

O trabalho desenvolvido nesta dissertação está descrito na forma de capítulos, sendo o primeiro capítulo uma breve introdução. No segundo capítulo são apresentados de forma sucinta os principais temas abordados: o analito de interesse, biossensores, enzimas, incluindo a enzima tirosinase utilizada no trabalho, e sistemas de imobilização e ainda uma breve abordagem sobre as técnicas analíticas utilizadas: as eletroquímicas e a espectroscopia de absorção molecular no ultravioleta-visível. No terceiro capítulo, estão descritos os materiais, reagentes e equipamentos utilizados, além das metodologias aplicadas. O quarto capítulo apresenta os resultados obtidos e discussão sobre os mesmos. Por fim, no quinto capítulo têm-se as conclusões do trabalho e no sexto capítulo estão listadas as referências bibliográficas utilizadas.

O objetivo geral deste trabalho é desenvolver um biossensor baseado na enzima tirosinase imobilizada em um sistema composto por nanopartículas de ouro e Nafion suportados em um eletrodo de carbono impresso que possua preparação simples e fácil, para determinação de adenosina. Para isto, os objetivos específicos do trabalho são:

- a) Síntese e caracterização das nanopartículas de ouro utilizadas na confecção do biossensor;
- b) Confecção e caracterização morfológica e eletroquímica do biossensor baseado em tirosinase;
- c) Caracterização cinética da enzima imobilizada e determinação do efeito da adenosina sobre o mesmo;
- d) Determinação da adenosina utilizando o biossensor produzido e obtenção dos parâmetros analíticos, como faixa linear, sensibilidade e limite de detecção.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Adenosina

A adenosina, representada na Figura 1, é um nucleosídeo purínico endógeno, está presente tanto dentro como fora das células, após a sua liberação das células ou a sua formação extracelular, difunde-se à membrana celular das células circundantes onde se liga à pelo menos quatro tipos diferentes de receptores de adenosina, A₁, A_{2A}, A_{2B} e A₃^{1; 2; 3}.

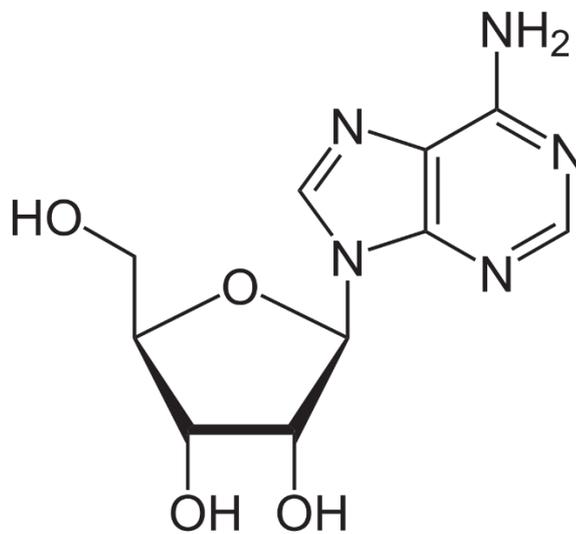


Figura 1. Fórmula estrutural da adenosina.

Drury e Szent-Györgyi, em 1929, relataram pela primeira vez que a adenosina atua como uma molécula de sinalização extracelular. Eles descobriram que a adenosina (extraída do músculo cardíaco) diminui a frequência cardíaca e aumenta o fluxo sanguíneo coronário³. Desde a década de 1980, a adenosina tem sido utilizada para tratar pacientes com aumento da frequência cardíaca causada por taquicardia supraventricular³. Além disso, a adenosina tem sido utilizada como agente de diagnóstico, devido à sua ação como vasodilatador coronariano, para avaliar a função da artéria coronária em conjunto com imagens de perfusão miocárdica de radionuclídeos³. Adenosina foi proposta por Berne como um dilatador endógeno de vasos coronarianos que é liberado durante a redução do fornecimento de oxigênio miocárdico ou

aumento da carga de trabalho. A adenosina tem várias funções importantes relacionadas com a fisiologia do coração e do cérebro⁴.

Existem duas vias principais para aumentar a produção e liberação da adenosina, uma delas é a desfosforilação de ATP à adenosina pela enzima metabólica 5'-nucleotidase e a supressão da atividade da enzima adenosina quinase. A adenosina é levada ao espaço extracelular por transportadores especializados de nucleosídeos. Outra via é através da liberação de nucleotídeos precursores de adenina (ATP, ADP e AMP) da célula seguida por catabolismo extracelular gerando adenosina através de uma cascata de ectonucleotidases¹.

Normalmente, a adenosina está presente no espaço extracelular em baixas concentrações, porém em condições metabólicas estressantes tais como lesão tecidual, isquemia e inflamação, os níveis extracelulares são aumentados². As concentrações podem variar de 1×10^{-6} mol L⁻¹ em tecidos não estressados, e atingir até 1×10^{-4} mol L⁻¹ em tecidos inflamados ou isquêmicos. Foram encontradas na faixa de 1×10^{-5} à 1×10^{-4} mol L⁻¹ de adenosina no líquido sinovial de pacientes com artrite reumatóide, por exemplo. Sabe-se também que níveis elevados de nucleosídeos são excretados na urina e soro de pacientes com câncer ⁵. Investigando o efeito de ATP e adenosina extracelular em células de câncer do colo do útero humano, Mello et al. descobriram que a adenosina formada a partir da degradação do ATP por ectonucleotidases é o principal fator responsável pela indução da apoptose (tipo de autodestruição celular ordenada) ⁶. Além disso, Mujoomdar, Hoskin e Blay concluíram que a adenosina é estimuladora do crescimento de células de carcinoma colorretal humano em concentrações presentes no ambiente extracelular do tumor⁷. Os níveis de adenosina modulam as respostas inflamatórias², regula o sistema imune inato¹, desta forma, a determinação do nível de adenosina em fluidos biológicos, como sangue e urina, fornece informações sobre a saúde do tecido.

Tendo em vista a importância da adenosina na fisiologia humana, vários métodos analíticos têm sido desenvolvidos para a sua determinação utilizando

diferentes técnicas e abordagens. A seguir, são descritos alguns trabalhos encontrados na literatura sobre desenvolvimento de métodos para determinação de adenosina.

Em 2007, Marin, Franchini e Rocco⁸ desenvolveram e validaram um método FR-CLAE (cromatografia líquida de alta eficiência com fase reversa) para a análise de adenosina. A separação da adenosina por CLAE foi realizada numa coluna C18, utilizando uma fase móvel constituída por água, contendo 7% v/v acetonitrila, a uma vazão de 0,8 mL/min. O efluente da coluna foi monitorado por detecção de UV a 260 nm. Obteve-se uma resposta linear ao longo da faixa de concentrações de $(0,25-100,00) \times 10^{-6}$ mol L⁻¹.

No mesmo ano, Goyal e colaboradores⁹ utilizaram um eletrodo de carbono vítreo modificado com fulereno-C₆₀ para a determinação simultânea de adenosina e guanósina por voltametria de pulso diferencial. Este eletrodo exibiu um deslocamento dos potenciais de oxidação a valores menos positivos além de um acentuado aumento na resposta de corrente comparado com o eletrodo não modificado. As curvas de calibração linear foram obtidas na faixa de concentração de $0,5 \times 10^{-6}$ a $1,0 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹ em solução tampão fosfato 0,1 M em pH=7,2 com um limite de detecção de $3,02 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹ e $1,45 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹ para determinação individual de adenosina e guanósina, respectivamente. Os estudos de interferência mostraram que o eletrodo exibia excelente seletividade na presença de hipoxantina, xantina, ácido úrico, e ácido ascórbico. O eletrodo proposto foi aplicado com sucesso para detectar adenosina e guanósina em plasma sanguíneo humano e urina, sem qualquer pré-tratamento.

Em 2008, Zhang, Xia e Li¹⁰ desenvolveram um biossensor para adenosina utilizando aptâmeros^a de DNA. Baseada na estratégia "tipo sanduíche", uma das fitas de DNA tiolada foi primeiramente imobilizada na superfície de nanopartículas de ouro (AuNPs) eletrodepositadas sobre eletrodo de ouro. Seguidamente foi promovida uma reação de hibridação com a fita de

^a Aptâmeros são biossensores que utilizam sondas de DNA ou RNA como biocomponente.

DNA complementar. Esta última se encontrava unido numa das extremidades a um fragmento de DNA (o DNA vinculador) que por sua vez estava ligado ao DNA relator que contém AuNPs. Na presença da adenosina, o DNA vinculador se liga a ela liberando em solução sondas de DNA relator juntamente com as AuNPs, resultando numa redução da corrente de pico do complexo eletroativo $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{3+}$ utilizada como transdutor. Pelo efeito das AuNPs, foi atingido um limite de detecção muito baixo de $1,8 \times 10^{-10} \text{ mol L}^{-1}$ para adenosina. O aptassensor apresentou excelente seletividade contra outros nucleosídeos e foi testado com sucesso para detectar adenosina em amostras de soro humano.

Ainda em 2008, outros dois trabalhos desenvolvidos por Goyal foram publicados. Na primeira, Goyal, Gupta e Chatterjee¹¹ realizaram a determinação voltamétrica de adenosina e inosina utilizando eletrodo de grafite pirolítico modificado com nanotubos de carbono de parede simples. O eletrodo modificado apresentou propriedades eletrocatalíticas notáveis para a oxidação de adenosina e inosina com potenciais de pico de 1229 mV e 1348 mV, respectivamente. As curvas de calibração foram lineares na faixa de concentração de $0,5 \times 10^{-6}$ a $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ para adenosina e 10×10^{-6} a $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ para inosina. Os limites de detecção obtidos para adenosina e inosina foram de $0,51 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ e $2,04 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$, respectivamente. O método proposto pelos autores foi utilizado para estimar estes compostos em plasma sanguíneo humano e amostras de urina e o método foi validado por HPLC.

No outro trabalho, Goyal e Singh¹² realizaram a determinação voltamétrica simultânea da adenosina e da dopamina, dada a importância fisiológica no controle da doença de Parkinson. Eles utilizaram um eletrodo de carbono vítreo modificado com nanotubos de carbono de parede simples em solução tampão fosfato de pH=7,2. A relação da concentração e o pico de corrente foram lineares na faixa de 1×10^{-6} a $100 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ para adenosina e dopamina. O limite de detecção (3σ) observada para adenosina e dopamina foram $34,7 \times 10^{-6}$ e $7 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$, respectivamente.

No ano seguinte, em 2009, Yan e colaboradores¹³ desenvolveram um aptassensor com detecção por quimiluminescência. Nesse trabalho, eles

utilizaram o reagente 3,4,5-trimetoxil-fenilglioxal como molécula sinalizadora, o qual reage instantaneamente com nucleobases de guanina presentes num aptâmero que liga à adenosina. Na presença da adenosina, o aptâmero imobilizado na superfície de nanopartículas magnéticas forma um complexo de adenosina/aptâmero. A formação deste complexo provoca a dissociação do aptâmero das nanopartículas magnéticas, resultando numa diminuição do sinal quimiluminescente. A diminuição do sinal de pico é proporcional à quantidade de adenosina. Verificou-se que a intensidade de quimiluminescência tinha uma dependência linear da concentração de adenosina na faixa de 4×10^{-7} a 1×10^{-5} mol L⁻¹, com um limite de detecção de 8×10^{-8} mol L⁻¹.

Já em 2011, Maduraiveeran e Ramaraj¹⁴ desenvolveram um sensor óptico baseada na ressonância plasmônica de superfície (SPR) de nanopartículas de prata. Os mesmos sintetizaram nanopartículas de prata incorporadas em uma rede sol-gel de silicato funcionalizado com amina que foram utilizadas para detectar biomoléculas tais como cisteína, adenosina e nicotinamida adenina dinucleotídeo (NADH). O sensor óptico apresentou o limite de detecção de $2,0 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ e faixa linear de $(2,0 - 14,0) \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ para adenosina.

Patel, Dutta e Huang¹⁵ demonstraram que o aptâmero a base de DNA de cadeia tripla apresenta melhor afinidade para a adenosina do que os aptâmeros de DNA de cadeia dupla, atingindo limite de detecção de $5,0 \times 10^{-8}$ mol L⁻¹. O composto furano-dU foi utilizado para a detecção por fluorescência. O sensor, seletivo para adenosina sobre uridina, citidina, guanosina, ATP e AMP, pode ser utilizado na faixa de concentração de $5,0 \times 10^{-8}$ mol L⁻¹ a $2,0 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹.

Também baseado em aptâmeros, Yan, Wang e Chen¹⁶ desenvolveram um biossensor eletroquímico para detecção de trombina e adenosina. Na construção do biossensor, o aptâmero de trombina foi primeiramente imobilizado sobre a superfície do eletrodo de ouro, e depois foi hibridizado com o aptâmero de adenosina. O corante azul de metileno, utilizado para a detecção eletroquímica, foi adsorvido nos aptâmeros via interação com a guanina. Na presença de trombina ou adenosina, observa-se uma diminuição

da corrente de oxidação do corante quando o mesmo é substituído por essas moléculas. A faixa linear encontrada foi de 6×10^{-9} a 6×10^{-8} mol L⁻¹ para trombina e de $1,0 \times 10^{-8}$ a $1,0 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹ para adenosina. Os limites de detecção foram determinados como sendo 3×10^{-9} mol L⁻¹ para trombina e 1×10^{-8} mol L⁻¹ para adenosina, respectivamente. Além disso, a albumina de soro bovino (BSA) e a lisozima, ou uridina e guanósina não influenciaram no desempenho do biossensor, indicando boa seletividade deste sensor para detecção de trombina ou adenosina. O aptassensor foi aplicado com sucesso na análise de trombina e adenosina separadamente em amostras de plasma humano.

Em 2013, Sun e colaboradores¹⁷ utilizaram o líquido iônico hexafluorofosfato de 1-hexilpiridínio, grafeno, e nanopartículas de ZrO₂ com filme de quitosana na preparação de um eletrodo modificado para determinação simultânea de adenosina e guanósina por eletro-oxidação direta. Para a determinação individual da adenosina foi encontrada duas faixas lineares de concentrações de 0,4 a 20×10^{-6} mol L⁻¹ e de 20 a 360×10^{-6} mol L⁻¹ e o limite de detecção (3σ) foi $0,131 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹. O método proposto foi aplicado com sucesso para detectar adenosina e guanósina em amostras de urina humana com resultados satisfatórios.

Ainda no mesmo ano, Shahdost-fard e colaboradores¹⁸ descreveram a fabricação de um novo aptassensor eletroquímico para a determinação de adenosina. Na construção do biossensor, eles utilizaram um eletrodo de carbono vítreo modificado com um nanocompósito contendo nanotubos de carbono de parede múltipla, líquido iônico e quitosana. Primeiramente, uma sonda de captura com terminação de amina (ssDNA1) foi ligada covalentemente ao nanocompósito utilizando glutaraldeído como agente de ligação. Seguidamente, um aptâmero específico de adenosina (ssDNA2) foi imobilizado na superfície do eletrodo através da hibridização com o ssDNA1. Azul de metileno foi utilizado como sonda redox, cuja intensidade de corrente diminui na medida em que há formação do complexo aptâmero-adenosina. O aptassensor mostrou um limite de detecção baixo de $1,50 \times 10^{-10}$ mol L⁻¹ e faixa linear de concentração de até $0,4 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹. Foi demonstrada a

seletividade frente a alguns outros nucleosídeos tais como guanosina, citidina e uridina. Os autores aplicaram o aptassensor para medir a concentração de adenosina em amostras de soro sanguíneo e de formulação de fármaco e obtiveram sucesso nas determinações, o que os levou a afirmar que o aptassensor desenvolvido pode ser aplicado na detecção de adenosina em amostras clínicas.

Em 2014, Perrier e colaboradores¹⁹ desenvolveram uma nova estratégia de detecção de pequenas moléculas tais como adenosina, ocratoxina A e tirosinamida. Eles utilizaram uma combinação da abordagem de proteção enzimática do aptâmero induzido pelo analito com a técnica CGE-LIF (eletroforese capilar em gel com fluorescência induzida por laser). O DNA fica parcialmente protegido contra hidrólise enzimática uma vez que interage com uma das moléculas alvo. Já na ausência dos mesmos, o DNA é clivado em fragmentos menores. A quantidade de aptâmero ligado remanescente após a reação enzimática foi proporcional à concentração do analito. A técnica CGE foi utilizada para realizar a separação de espécies de aptâmeros e quantificar a adenosina (A), ocratoxina A (O) e tirosinamida (T). Os autores conseguiram detectar estas três moléculas num meio complexo, o soro humano tratado termicamente e diluído, mostrando uma boa recuperação. A faixa linear e o limite de detecção para adenosina foram $(0,8 - 7,0) \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ e $8 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$, respectivamente.

Para a determinação simultânea dos neurotransmissores dopamina e adenosina na presença do neuroprotetor guanosina em pH fisiológico, Kesavan e John²⁰ utilizaram um eletrodo modificado com nanopartículas de ouro ligadas ao cátion aminofenil (AP-AuNPs). Devido à proximidade dos potenciais de oxidação e de fenômenos de adsorção não é possível realizar a determinação simultânea dessas espécies utilizando eletrodo não modificado. No entanto, o eletrodo modificado com AP-AuNP separou os sinais voltamétricos de dopamina, guanosina e adenosina com diferenças de potencial de 800 mV entre dopamina e guanosina e 340 mV entre guanosina e adenosina, as correntes de pico de oxidação também foram aumentadas. A resposta da corrente amperométrica aumentou linearmente com concentrações crescentes

de dopamina, guanosina e adenosina nos intervalos de 4.0×10^{-8} a 1×10^{-4} mol L⁻¹, 7.0×10^{-8} a 5×10^{-5} mol L⁻¹ e 2.0×10^{-7} a 1×10^{-4} mol L⁻¹, respectivamente, e os limites de detecção foram $8,0 \times 10^{-11}$ mol L⁻¹ para dopamina, $2,6 \times 10^{-8}$ mol L⁻¹ para guanosina e $5,1 \times 10^{-8}$ mol L⁻¹ para adenosina (S/N=3). A aplicação prática foi demonstrada determinando simultaneamente as concentrações de dopamina, guanosina e adenosina em amostras de sangue humano e urina.

Em 2015, Najafabadi, Khayamian e Hashemian²¹ utilizaram nanopartículas magnéticas conjugadas com aptâmeros para a extração seletiva de adenosina em amostras de urina, seguidas da identificação e quantificação por espectrometria de mobilidade iônica por ionização por electrospray (ESI-IMS). Os autores otimizaram os parâmetros de extração tais como quantidade de solvente, condições de eluição (tipo de solvente e volume) e condições de adsorção. Sob condições otimizadas, verificaram que a faixa linear era de $(1,85 - 185) \times 10^{-7}$ mol L⁻¹ com um limite de detecção de $7,50 \times 10^{-8}$ mol L⁻¹. A eficiência de extração foi de 94% e o desvio padrão relativo foi de 4% para três medições repetidas de $0,25 \mu\text{g mL}^{-1}$ de adenosina em amostras de urina. Como uma aplicação prática, o método foi aplicado para a determinação de adenosina em amostras de urina de pacientes com câncer de pulmão, e os resultados obtidos estavam de acordo com os obtidos pelo método CLAE-UV. Este método foi proposto como uma alternativa para análise clínica.

Hung, Shih e Tseng²² construíram um sistema seletivo para a detecção de adenosina com base no uso de nanopartículas de ouro estabilizadas com Tween 20 (Tween 20-AuNPs) como um eficiente extintor de fluorescência para boro-dipirrometano conjugado com adenosina 5'-trifosfato (BODIPY-ATP) e como um elemento de reconhecimento para a adenosina. BODIPY-ATP pode interagir com Tween 20-AuNPs através da coordenação entre o grupo adenina do BODIPY-ATP e os átomos de Au, causando a extinção de fluorescência de BODIPY-ATP através do efeito de transferência de energia de superfície das AuNPs. Quando a adenosina se liga à superfície da nanopartícula, esta apresenta atração eletrostática adicional ao BODIPY-ATP, resultando num aumento da eficiência das AuNPs na extinção de fluorescência de BODIPY-ATP. O limite de detecção numa relação sinal/ruído de 3 foi determinado como

sendo $6,0 \times 10^{-8}$ mol L⁻¹. O sistema proposto combinado com uma coluna contendo ácido fenilborônico foi aplicado com sucesso na determinação de adenosina na urina.

Sun e colaboradores²³ fabricaram uma sonda trifuncional que consistiu num aptâmero que se liga a adenosina, estreptavidina ligada a nanopartículas magnéticas (estreptavidina-MNB) e um sistema enzimático catalítico de ruptura e clonagem de fragmentos de DNA. Na presença da adenosina há liberação do suporte catalítico que gera uma grande quantidade de fragmentos de DNA que ao interagirem com a N-metilmecoporfirina IX (NMM) aumentam significativamente o sinal fluorescente. Este método exibiu uma sensibilidade elevada em relação à adenosina com um limite de detecção de $4,2 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹. Além disso, este ensaio pode distinguir amostras de urina de pacientes com câncer e pessoas saudáveis do grupo de controle, oferecendo uma nova estratégia para a quantificação confiável de adenosina na investigação médica e diagnóstico clínico precoce.

Outros métodos mencionados na literatura incluem a cromatografia líquida de alta eficiência em coluna acoplada²⁴, e a espectrometria de massa com ionização/dessorção a laser assistida por matriz em tempo de voo²⁵. Estes métodos geralmente apresentam alto custo operacional e envolvem um pré-tratamento de amostras mais elaborados e tempos de análise demorados. Os sensores e biossensores eletroquímicos, por sua vez, têm atraído a atenção por oferecerem vantagens tais como portabilidade, facilidade de manipulação, sensibilidade, seletividade e baixo custo.

2.2 Biossensores

2.2.1 Definição e classificação

Biossensores são dispositivos analíticos com ampla gama de aplicações em diversas áreas, como no monitoramento ambiental, na área alimentícia,

clínica, biomédica e farmacêutica²⁶. Eles podem ser considerados como ferramentas seletivas para detecção de biomoléculas ou servir de forma complementar aos métodos analíticos clássicos, como a cromatografia, por exemplo, devido a sua simplicidade, baixo custo, rapidez no tempo de resposta e pela possibilidade de miniaturização e portabilidade ^{27; 28}.

Biossensores combinam dois elementos principais: um componente biológico ativo (biocomponente ou biorreceptor), o qual é responsável pelo reconhecimento de uma substância através de uma reação bioquímica específica. Estas reações podem gerar desde variação na concentração de prótons, liberação de gases, emissão ou absorção de luz, liberação de calor, variação de massa, mudança no estado de oxidação do analito, etc.; que podem ser detectados no transdutor. Este último é responsável pela conversão dessas variações em um sinal mensurável, como uma variação de corrente, potencial, temperatura, entre outros ²⁹.

A Figura 2 (traduzida e adaptada da Referência³⁰) apresenta um esquema da construção e do funcionamento de um biossensor. A escolha do biocomponente e do transdutor depende das propriedades de cada amostra de interesse e do tipo de magnitude física a ser medida.

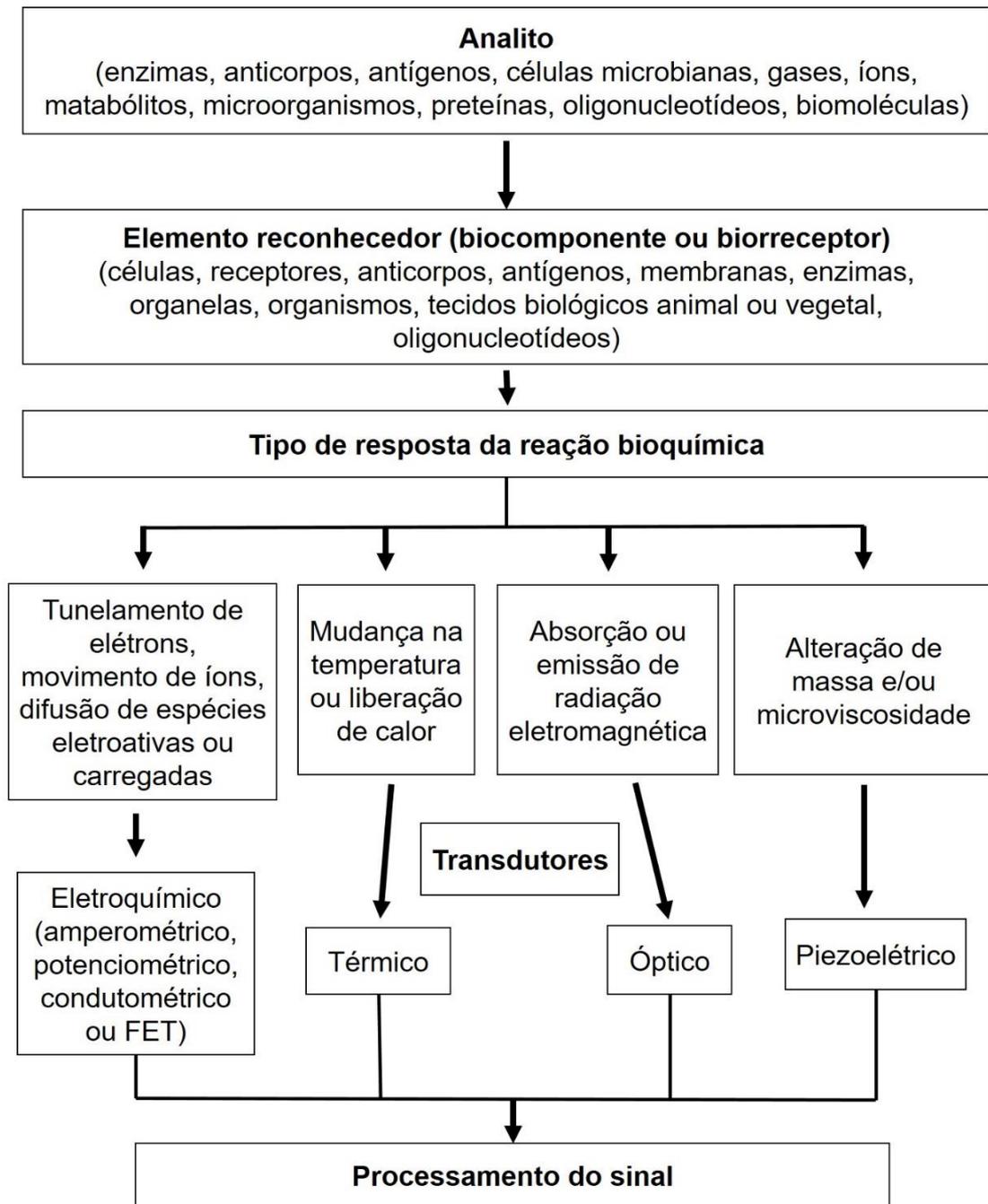


Figura 2. Esquema da construção de um biossensor (traduzido e adaptado da Ref. 30).

Como biocomponente podem ser utilizados na construção de um biossensor, tecidos biológicos, células, organelas, membranas, enzimas, receptores, anticorpos, ácidos nucleicos e macromoléculas orgânicas³¹. O tipo de biocomponente utilizado determinará o grau de seletividade ou especificidade do biossensor.

Um dos critérios de classificação de biossensores se baseia no sistema de transdução que pode ser eletroquímico (potenciométrico, amperométrico, condutométrico, impedimétrico), calorimétrico, óptico e piezoelétrico.

- a) Um biossensor eletroquímico de acordo com a definição da IUPAC, é um dispositivo integrado autônomo, que é capaz de fornecer dados específicos quantitativos ou semi-quantitativos de informação analítica utilizando um elemento de reconhecimento biológico (biorreceptor) que é retido em contato direto com o elemento de transdução ³². Estes dispositivos têm a vantagem de ser econômicos e apresentar uma resposta rápida. A possibilidade de automação permite a aplicação num grande número de amostras ³⁰.
- b) Os biossensores calorimétricos detectam o calor envolvido nas reações bioquímicas do analito com uma substância biológica ativa, como uma enzima. A forma mais utilizada acopla as substâncias diretamente ao termistor, que detecta o calor envolvido na reação bioquímica. A maior parte do calor em reações enzimáticas é perdida para o meio sem ser detectada, o que diminui a sensibilidade dos biossensores calorimétricos ³³.
- c) Os biossensores com sistema de transdução óptico são baseados na medição da luz observada ou emitida como uma resposta de uma reação química ou biológica. Em tais biossensores, fibras ópticas são usadas para guiar as ondas de luz a detectores, como um eletrodo ou semicondutor ³³.
- d) Os biossensores piezoelétricos detectam a variação de massa ou microviscosidade em sua superfície. Geralmente, o quartzo tem sido utilizado para ser revestido com uma substância biologicamente ativa que se liga seletivamente ao analito, gerando

um aumento de massa na superfície e diminuição da frequência de ressonância das oscilações ³³.

Outro critério de classificação dos biossensores é o mecanismo de interação entre o biocomponente e o analito. Os biocomponentes são divididos em três grupos: biocatalíticos, bioafinidade e receptores híbridos ³⁰.

- a) Os biossensores que utilizam reações biocatalíticas constituem-se de sistemas mono ou multi enzimáticos, células inteiras (microorganismos, como bactérias, fungos, células eucarióticas, leveduras), organelas e tecidos biológicos animal ou vegetal. Geralmente, os biossensores que utilizam micro-organismos ou tecidos biológicos apresentam vantagens como menor sensibilidade frente a inibidores presentes na amostra, maior tolerância à variações de pH e temperatura e desvantagens como tempo de resposta lento e baixa seletividade, devido a variedade de processos biológicos que ocorrem numa célula inteira. Estes problemas são minimizados através da utilização de enzimas, as quais representam o biorreceptor mais comumente utilizado devido a sua seletividade. Os biossensores enzimáticos podem ser potenciométricos, amperométricos, optoelétrico, calorimétrico e piezoelétrico, dependendo do tipo de transdutor utilizado. As enzimas oxidorreduções são as mais utilizadas por serem mais estáveis ^{30; 34}.
- b) Os biossensores baseados na bioafinidade podem ser quimiorreceptores, anticorpos e ácidos nucleicos. Estes dispositivos fornecem interações seletivas ao formar complexos termodinamicamente estáveis e são conhecidos como imunossensores. Os imunossensores apresentam alta seletividade e especificidade, porém como não geram um sinal eletroquímico detectável, necessitam de uma marcação do antígeno ou do anticorpo com enzimas, compostos fluorescentes, substratos

eletroquimicamente ativos ou complexos avidina-biotina. Desta forma, os transdutores geralmente utilizados são sistemas acústicos ou ópticos ^{30; 34}.

- c) Os biossensores constituídos de receptores híbridos que são as sondas de DNA ou RNA possuem alta seletividade, pois a detecção é baseada na hibridização de uma sequência única de bases de ácidos nucleicos com a simples fita da sonda. Geralmente, este tipo de biossensor, também conhecido como aptassensor ou aptâmero, utiliza um transdutor piezoelétrico ^{30; 34}.

De acordo com o objetivo deste trabalho, será utilizado o transdutor amperométrico. Os sensores amperométricos medem a corrente produzida por uma reação química de uma espécie eletroativa a um determinado potencial aplicado, a qual está relacionada com a concentração da espécie em solução. A resposta do biossensor amperométrico é relativamente rápida e sensível. No entanto, a seletividade é governada apenas pelo potencial redox das espécies eletroativas presentes. Consequentemente, a corrente medida pelo instrumento pode incluir as contribuições de várias espécies químicas ³⁰.

Apesar de suas limitações em termos da sua susceptibilidade ao pH, à força iônica, a inibidores e sua baixa estabilidade, as enzimas são amplamente utilizadas na construção de biossensores eletroquímicos ²⁹. Devido à especificidade e sensibilidade que as enzimas apresentam, os biossensores enzimáticos podem ser adaptados para praticamente qualquer analito alvo e estes podem ser tanto substratos enzimáticos como inibidores enzimáticos. Uma das maiores vantagens de usar um biossensor é que a determinação do analito é realizada com uma preparação simplificada da amostra ³⁵.

2.2.2 Métodos de imobilização

O método de imobilização utilizado pode influenciar as características dos biossensores, como tempo de vida útil, faixa linear, sensibilidade, tempo de resposta, estabilidade e ação anti-interferente ³⁶.

Existem vários métodos para imobilizar o biocomponente na superfície dos transdutores. Na Figura 3 são apresentados alguns: a) adsorção física em matriz insolúvel em água baseada em forças hidrofóbicas, eletrostática e de van der Waals; b) aprisionamento em sol-gel, ou hidrogel, ou em uma pasta, confinado por membranas permeáveis; c) ligação covalente entre a enzima e o material de suporte; d) encapsulamento; e) micelas; f) formação de filme enzimático de Langmuir-Blodgett ou monocamada auto-montada³⁶; g) reticulação da enzima empregando um reagente multifuncional de baixo peso molecular que forma uma ligação covalente entre o transdutor e a enzima usando um agente bifuncional ³⁶.

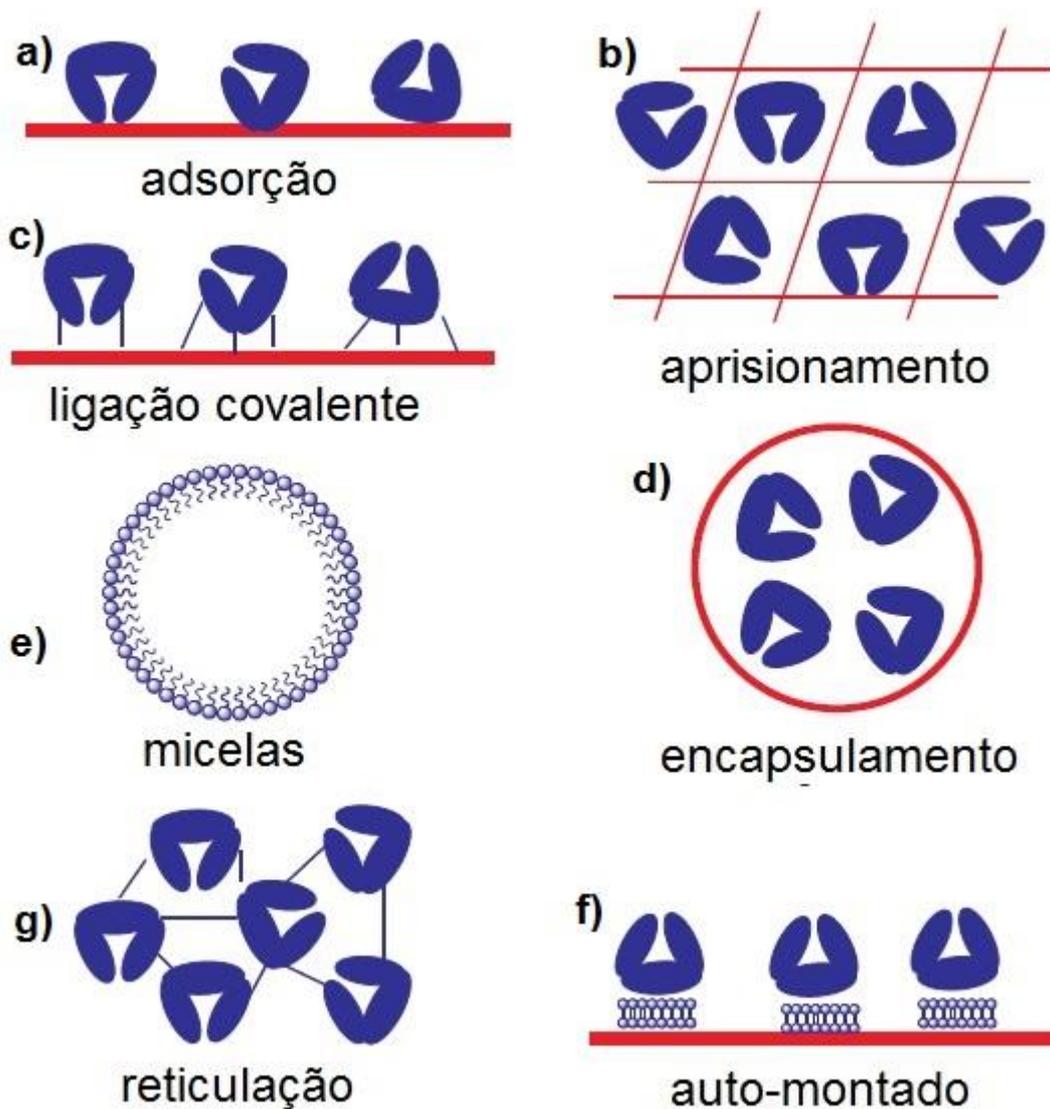


Figura 3. Ilustração dos métodos de imobilização de enzimas (traduzido e adaptado da Ref. 36).

O método de adsorção para a imobilização de enzimas apresenta a grande vantagem da simplicidade de execução; porém, apresenta dificuldades, tais como a falta de controle na orientação da enzima sobre o suporte, o centro ativo pode não estar acessível ao analito para que possa ocorrer a reação. Além disso, pode ocorrer lixiviação ou solubilização da enzima devido às interações fracas com o suporte ²⁹.

O procedimento de aprisionamento por oclusão em géis ou membranas corresponde ao confinamento do biocomponente em uma matriz polimérica ou em uma membrana semipermeável, que evita a lixiviação do material biológico.

Contudo, especial atenção deve ser dada ao tamanho de poros nos polímeros, que evite a perda do componente biológico para a solução, mas que permita a difusão das espécies envolvidas através das membranas ²⁹. Geralmente, o Nafion é utilizado para esta finalidade.

As grandes vantagens do método de ligação covalente são o controle na orientação e a minimização da lixiviação do biocomponente. Também tem sido observada uma maior estabilidade do complexo enzima-suporte em relação aos efeitos da variação do pH, da força iônica, do solvente. Contudo, o método apresenta alta possibilidade de perda da atividade enzimática devido à reação com grupos funcionais do centro ativo da enzima, assim como pela deformação da estrutura tridimensional da mesma ²⁹.

O método de reticulação da enzima é o mais amplamente utilizado e baseia-se na formação de ligações cruzadas com os grupos funcionais amino da enzima e do suporte. As principais vantagens deste método são a simplicidade de execução e a forte interação da enzima com o suporte, diminuindo a lixiviação e proporcionando ao eletrodo uma maior estabilidade. Entretanto, também apresenta grandes desvantagens, como a dificuldade do controle da reação, o uso de grandes quantidades de enzima, baixa atividade enzimática e dificuldades na reprodutibilidade do eletrodo, ocasionando uma baixa reprodutibilidade no desempenho do eletrodo ²⁹.

Neste trabalho optou-se por utilizar o método de aprisionamento empregando o Nafion como polímero. O Nafion é um trocador de cátions sulfonado perfluorado, o qual tem sido amplamente empregado na preparação de eletrodos modificados devido as seguintes propriedades: inércia química, estabilidade térmica, resistência mecânica e propriedades anti-incrustantes. O polímero é aniônico e após ser adicionado sobre a superfície forma uma estrutura com canais hidrofílicos contidos dentro de uma matriz hidrofóbica. Os filmes formados a partir deste material são razoavelmente robustos, mostram forte exclusão de interferentes aniônicos e apresentam uma melhor biocompatibilidade ³⁶.

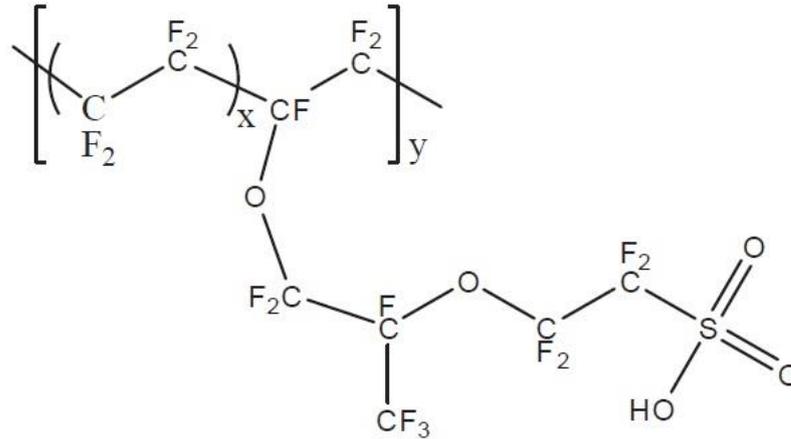


Figura 4. Fórmula estrutural do polímero Nafion.

2.3 Enzimas

2.3.1 Definição e estrutura

As enzimas são essenciais para todos os processos bioquímicos. Agindo em sequências organizadas, elas catalisam centenas de reações que degradam as moléculas de nutrientes, conservam e transformam a energia química e fazem macromoléculas biológicas a partir de precursores simples. As enzimas têm poder catalítico extraordinário, muitas vezes muito maior do que a de catalisadores sintéticos ou inorgânicos. Elas têm um alto grau de seletividade para seus substratos, aceleram muito as reações químicas, e elas funcionam em soluções aquosas em condições muito suaves de temperatura e pH. Poucos catalisadores não biológicos têm todas estas propriedades ³⁷.

Com exceção de um pequeno grupo de moléculas de RNA catalítico (ribozimas), todas as enzimas são proteínas. A sua atividade catalítica depende da integridade da sua conformação de proteína nativa. Se uma enzima é desnaturada ou dissociada em suas subunidades, geralmente a atividade catalítica é perdida. Assim, as estruturas primária, secundária, terciária e quaternária das enzimas proteicas são essenciais para a sua atividade catalítica³⁷.

Algumas enzimas não necessitam de grupos químicos para sua atividade além dos seus resíduos de aminoácidos. Outras requerem um componente químico adicional chamado cofator - um ou mais íons inorgânicos, tais como Fe^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Cu^{2+} ou Zn^{2+} , ou moléculas orgânicas chamada coenzima. Algumas enzimas requerem tanto uma coenzima como um ou mais íons metálicos para sua atividade. Uma coenzima ou um íon metálico que é muito fortemente ligado à proteína enzimática ou mesmo ligado covalentemente é denominado grupo prostético. Uma enzima catalítica ativa juntamente com os seus íons metálicos e/ou coenzima ligados, é chamada de holoenzima. A parte proteica dessa enzima é chamada apoenzima ou apoproteína. Um grupo prostético é uma coenzima firmemente ligada à enzima, que desta não se dissocia ³⁷.

2.3.2 Classificação e nomenclatura das enzimas

Segundo um acordo internacional realizado pela União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular (IUBMB, International Union of Biochemistry and Molecular Biology) foi adotado um sistema de classificação e nomenclatura que consiste em uma classificação das enzimas em seis classes ^{37,38,39}, como pode ser observado na Tabela I, cada uma com várias subclasses, baseada no tipo de reação catalisada.

Tabela I. Classificação internacional das enzimas (traduzido e adaptado da Ref. 37).

Número	Classe	Tipo de reação catalisada
1	Oxidoredutases	Reações de oxidação-redução (transferência de elétrons), transferindo prótons ou hidretos
2	Transferases	Reações de transferências de grupo
3	Hidrolases	Reações de hidrólises (transferências de grupos funcionais para água)
4	Liases	Adição de grupos a ligações duplas ou formação de ligações duplas por remoção de grupos

5	Isomerases	Transferência de grupos intramolecular para formar isômeros
6	Ligases	Formação de ligações C-C, C-S, C-O e C-N por reação de condensação acoplada à clivagem de ATP

Para cada enzima é atribuído um número de classificação em quatro partes e um nome sistemático, que identifica a reação que ela catalisa. O número da *Enzyme Commission* (E. C.) que identifica a enzima tirosinase é apresentado na Figura 5 ⁴⁰:

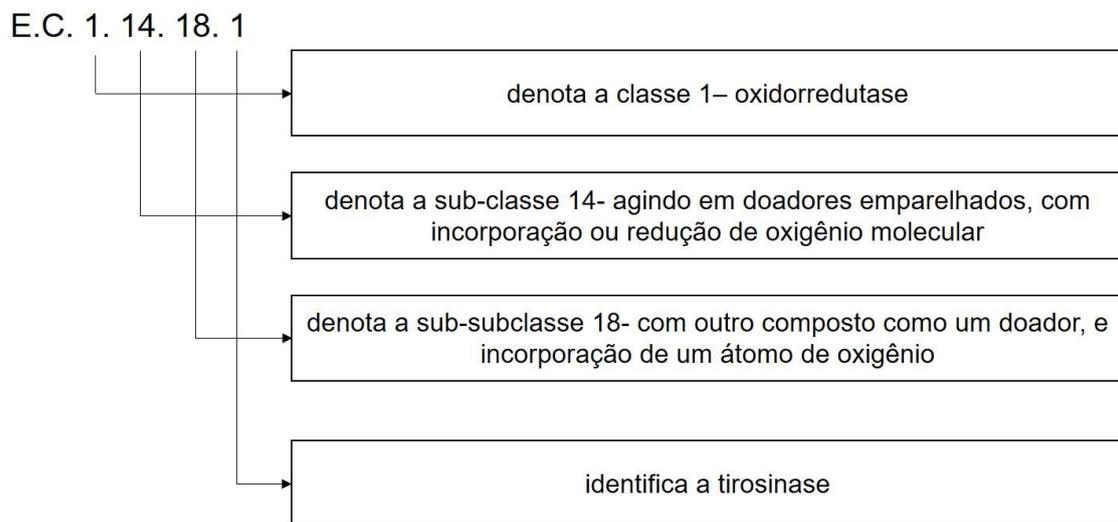
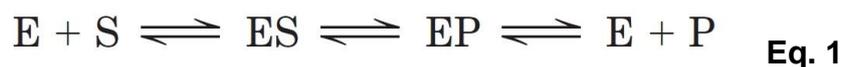


Figura 5. Nomenclatura oficial, exemplo da tirosinase E.C. 1.14.18.1.

2.3.3 Atividade e cinética enzimática

Uma reação enzimática simples pode ser escrita da seguinte forma:



Onde E, S e P representam a enzima, o substrato e o produto, respectivamente. ES e EP são os complexos transitórios da enzima com o substrato e com o produto ³⁷.

A reação catalisada ocorre dentro dos limites de uma “fenda” na enzima chamada sítio ativo. A superfície do sítio ativo contém cadeias laterais de aminoácidos que criam uma superfície tridimensional complementar ao substrato. O sítio ativo liga-se ao substrato, formando um complexo enzima-substrato (ES). O ES é convertido no complexo enzima-produto (EP), o qual é subsequentemente dissociado em enzima e produto ³⁷.

Segundo o mecanismo de encaixe induzido proposto por Daniel Koshland, as enzimas possuem flexibilidade na sua estrutura, por isso, o sítio ativo muda sua conformação na presença do substrato. Ocorrem alterações das cadeias laterais dos aminoácidos que formam os sítios ativos, os quais sofrem uma reorientação para que suas posições potencializem a ação catalítica da enzima ³⁷. Em geral, a seletividade é derivada da formação de muitas interações fracas entre a enzima e a sua molécula de substrato específica.

Uma enzima permite que a reação proceda rapidamente em condições existentes dentro da célula, por facilitar uma via alternativa de reação com uma menor energia livre de ativação, como é mostrado na Figura 6. A enzima não altera a energia livre dos reagentes e dos produtos e, assim, não altera o equilíbrio da reação ³⁹.

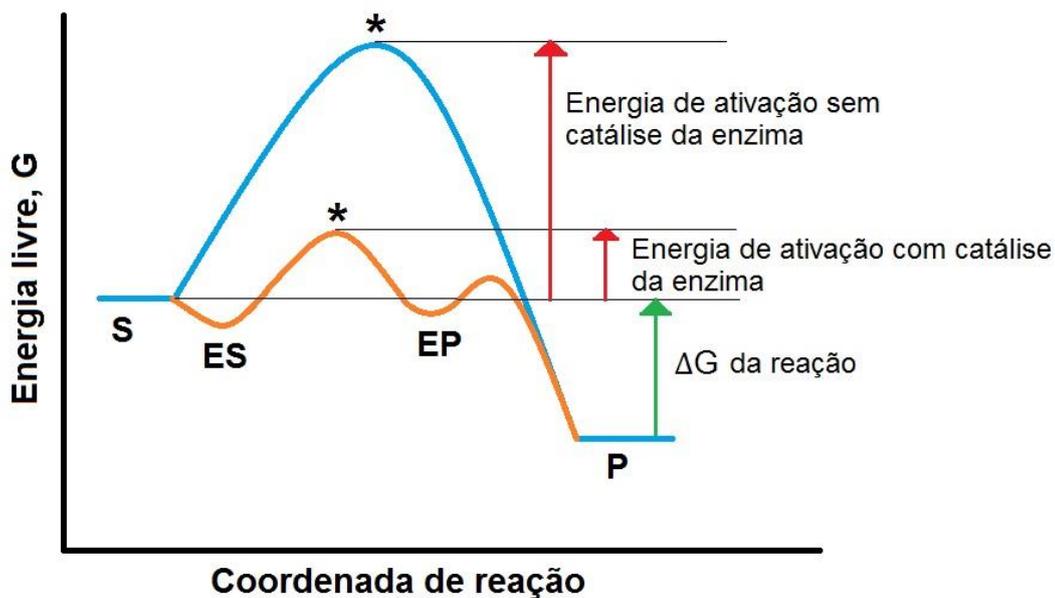


Figura 6. Efeito da enzima sobre a energia de ativação de uma reação (traduzido e adaptado da Ref. 37).

A atividade enzimática U , estabelecida pela Comissão de Enzimas, é a quantidade de enzima capaz de converter $1 \mu\text{mol}$ de substrato por minuto, em condições estabelecidas do ensaio (concentração do substrato, temperatura e pH) ⁴¹. Os principais fatores que influenciam na velocidade das reações enzimáticas são a concentração do substrato, a temperatura e o pH, da seguinte forma ³⁹:

- Concentração do substrato: A velocidade de uma reação catalisada por enzima aumenta conforme a concentração do substrato, até uma velocidade máxima. A obtenção de um platô na velocidade de reação em altas concentrações de substrato reflete a saturação pelo substrato de todos os sítios de ligação disponíveis.
- Temperatura: A velocidade da reação aumenta com o aumento da temperatura, pois um maior número de moléculas possui energia suficiente para superar a barreira energética para formação dos produtos. Entretanto, após atingir o máximo da velocidade de reação, a

velocidade diminui com o aumento da temperatura, pois ocorre a desnaturação da enzima em altas temperaturas, geralmente acima dos 50 °C.

- pH: A concentração de prótons no meio interfere no estado ionizado ou não-ionizado dos grupos químicos presentes no sítio ativo da enzima, o que influencia na interação com o substrato, desta forma, diminuindo ou aumentando a velocidade da reação. Cada enzima possui um pH ótimo para sua atividade; Além disso, pHs extremos podem causar a desnaturação da enzima.

Como já mencionado, a concentração do substrato, [S], afeta a velocidade de uma reação catalisada por uma enzima. No entanto, estudar os efeitos da concentração de substrato é complicado pelo fato de que as alterações de [S] durante o curso de uma reação com o substrato são convertidas em produto. Uma abordagem mais simples em experimentos cinéticos é medir a velocidade inicial, designada V_0 , quando [S] é muito maior que a concentração de enzima [E]. Numa reação típica, a enzima pode estar presente em quantidades nanomolares, enquanto que [S] pode ser cinco ou seis ordens de magnitude maior. Se apenas o início da reação é monitorado, a mudança em [S] pode ser considerada constante. V_0 pode então ser explorado como uma função de [S]. O efeito causado sobre V_0 ao variar [S] quando a concentração da enzima é mantida constante é mostrado na Figura 7. Em concentrações relativamente baixas de substrato, V_0 aumenta quase linearmente com um aumento de [S]. Em concentrações de substrato mais elevadas, V_0 aumenta em quantidades menores em resposta a aumentos em [S]. Finalmente, alcança-se um ponto para além do qual os aumentos de V_0 são extremamente pequenos à medida que [S] aumenta. Esta região V_0 tipo platô está próxima da velocidade máxima, V_{\max} ³⁷.

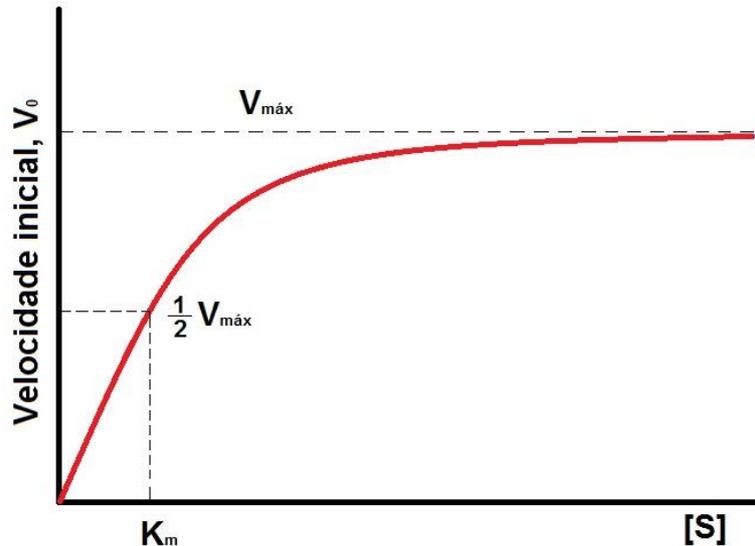


Figura 7. Efeito da concentração do substrato na velocidade inicial da reação enzimática.

O efeito de saturação é uma característica distintiva dos catalisadores enzimáticos e é responsável pelo patamar observado na Figura 6. Esta curva relaciona a [S] com a V₀ se aproxima à uma hipérbole retangular ³⁷, a qual pode ser expressa algebricamente pela equação de Michaelis-Menten (Eq. 2):

$$V_0 = \frac{V_{\max} [S]}{K_m + [S]} \quad \text{Eq. 2}$$

Onde os termos são [S], V₀, V_{máx} e a contante de Michaelis-Menten, K_m = (k₂ + k₋₁)/k₁; Todos estes termos podem ser medidos experimentalmente.

A K_m pode variar muito de enzima para enzima, e mesmo para diferentes substratos da mesma enzima. O termo é por vezes usado (muitas vezes de forma inadequada) como um indicador da afinidade de uma enzima para o seu substrato ³⁷. O significado real da K_m depende de aspectos específicos do mecanismo de reação, tais como o número e as velocidades relativas das etapas individuais ³⁷. Contudo, um baixo valor de K_m significa que uma baixa concentração de substrato é necessária para atingir a metade da saturação da enzima e para um alto valor de K_m ocorre o inverso ³⁹.

A equação de Michaelis-Menten pode ser algebricamente transformada em equações que são mais úteis na plotagem de dados experimentais. Uma transformação comum é derivada simplesmente tomando o recíproco de ambos os lados da equação de Michaelis-Menten, que simplifica a:

$$\frac{1}{V_0} = \frac{K_m}{V_{\max}} [S] + \frac{1}{V_{\max}} \quad \text{Eq. 3}$$

Esta forma da equação de Michaelis-Menten é chamada de equação de Lineweaver-Burk ³⁷. Para enzimas que obedecem à relação de Michaelis-Menten, o gráfico $1/V_0$ versus $1/[S]$ produz uma linha reta, cujo o coeficiente angular é igual ao K_m/V_{\max} e o intercepto do eixo y é igual a $1/V_{\max}$, e o intercepto no eixo x é igual a $-1/K_m$. O gráfico de Lineweaver-Burk, apresentado na Figura 8, tem a vantagem de permitir a determinação mais precisa da K_m e da V_{\max} , os quais só podem ser aproximados pelo gráfico de V_0 versus $[S]$.

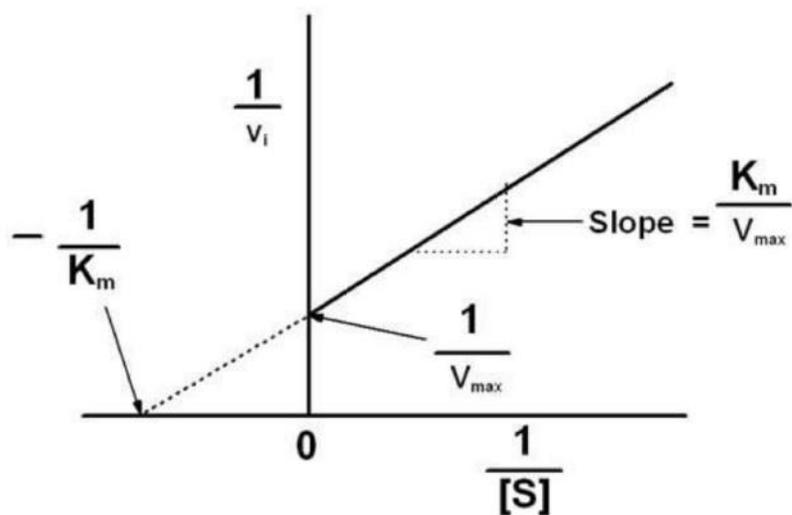


Figura 8. Gráfico de Lineweaver-Burk.

2.3.4 Inibição enzimática

Os inibidores enzimáticos podem ser reversíveis ou irreversíveis. Inibidores reversíveis ligam-se à enzima por meio de ligações não-covalentes e quando dissociam-se há a recuperação da atividade enzimática. A inibição irreversível ocorre quando uma enzima inibida não recupera sua atividade quando o complexo enzima-inibidor é dissociado. Os dois tipos mais comuns de inibição encontrados são inibição competitiva e inibição não-competitiva ^{37;}
³⁹.

Na inibição competitiva o inibidor liga-se reversivelmente ao mesmo sítio ativo que o substrato se ligaria. Como pode ser visto na Figura 9, o inibidor competitivo não altera a $V_{máx}$, porém aumenta a K_m aparente, pois em altas $[S]$ a $V_{máx}$ é alcançada e com a presença do inibidor é necessário maior $[S]$ para atingir $V_{máx}/2$ ³⁹.

Por outro lado, no caso da inibição não-competitiva, o inibidor liga-se em outro sítio da enzima, diferente do sítio ativo do substrato, porém causa uma mudança na estrutura do sítio ativo da enzima, o qual fica impossibilitado de se ligar ao substrato. A inibição não-competitiva não pode ser superada pelo aumento da concentração de substrato, como pode ser observado na Figura 9. Desse modo, os inibidores não-competitivos diminuem a V_{max} da reação. Contudo, a K_m não é alterada pela presença do inibidor não-competitivo ³⁹.

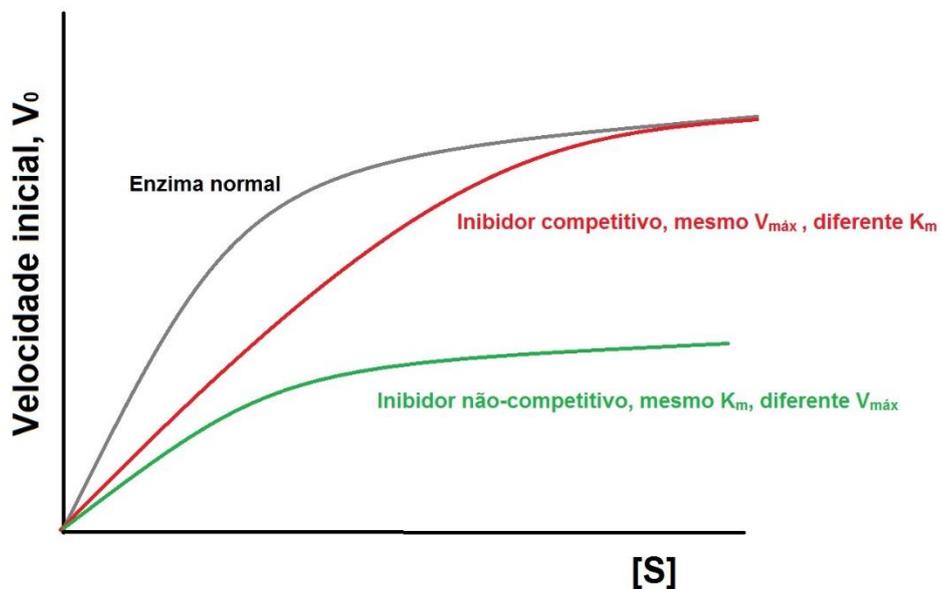


Figura 9. Gráfico do efeito de um inibidor competitivo e outro não-competitivo sobre a velocidade inicial versus $[S]$.

2.3.5 Tirosinase

Em 1895, Bourquelot e Bertrand observaram o aparecimento de um composto escuro no cogumelo na presença da tirosina. Em 1896 foi atribuído o nome de tirosinase a enzima presente no cogumelo, sendo assim chamada porque o primeiro substrato usado foi a tirosina ⁴². A tirosinase (E.C. 1. 14.18.1) é uma enzima que pertence à classe das oxidorreductase; a qual oxida substratos orgânicos, mono e difenóis, agindo em doadores emparelhados e incorporando um átomo de oxigênio. É uma proteína de cobre tipo III encontrada em uma ampla variedade de bactérias, fungos, plantas, insetos, crustáceos e mamíferos, que está envolvida na síntese de betalaínas e melanina⁴⁰.

O sítio ativo da tirosinase é composto por um centro de cobre binuclear (tipo III), no qual cada átomo de cobre está coordenado por três histidinas ⁴³. Na Figura 10 é possível observar a estrutura secundária da tirosinase, estrutura cristalográfica da tirosinase de *Bacillus megaterium* obtida por Sendovski et al.⁴³.

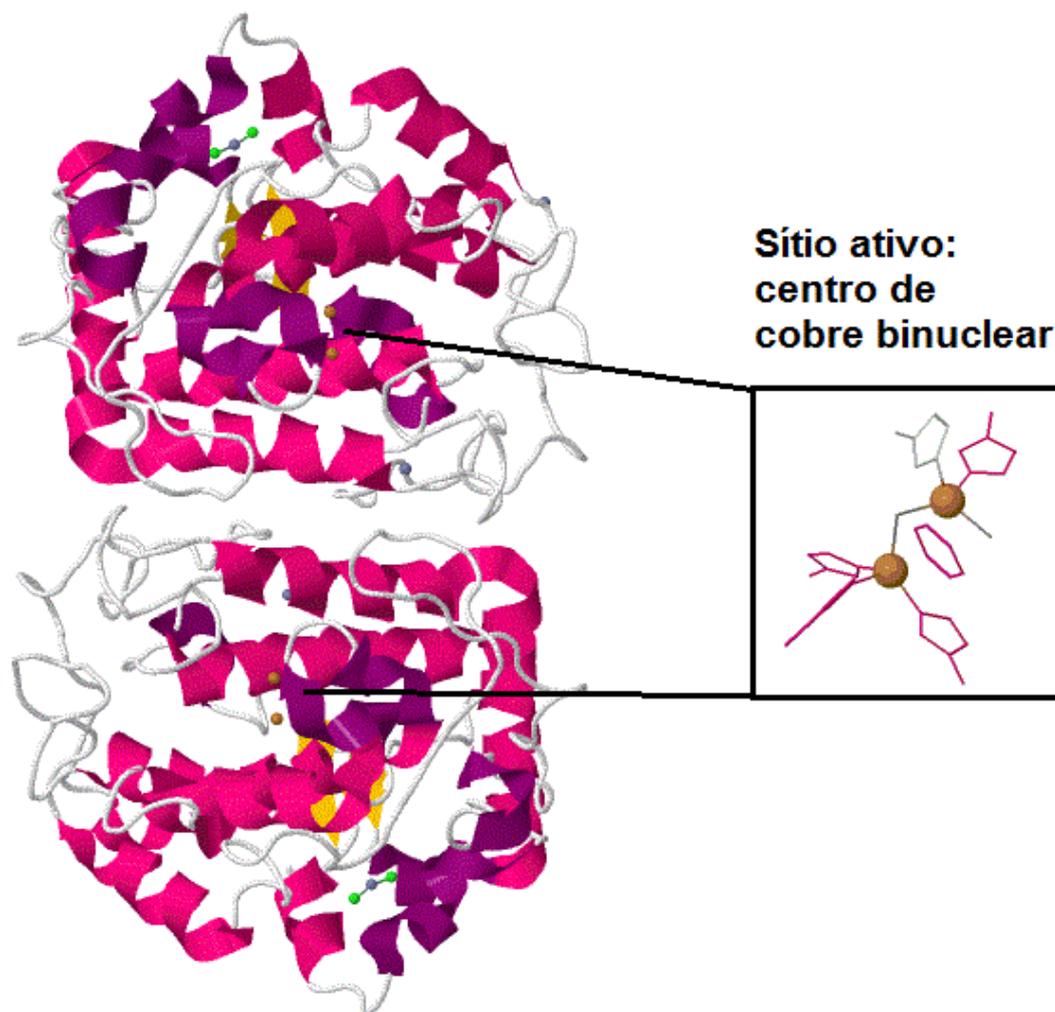


Figura 10. Representação tridimensional da estrutura secundária da tirosinase de *Bacillus megaterium* (adaptado da Ref. 43).

Tem sido reportada a existência de três diferentes estados do sítio ativo da enzima: a forma oxidada oxigenada (E_{oxy} ; $[Cu^{II}-O-O-Cu^{II}]^{-2}$), a forma *met* com Cu(II)-oxidado (E_{met} ; $[Cu^{II}-Cu^{II}]$) e a forma reduzida *deoxi* (E_{deoxy} ; $[Cu^I-Cu^I]$). Na Figura 10 é possível observar o ciclo catalítico da tirosinase, em que E_{oxi} é capaz de catalisar a hidroxilação de substratos monofenólicos e a oxidação de difenóis, enquanto E_{met} resulta em um complexo inativo (“*dead-end complex*”) com monofenóis e não pode ligar oxigênio. Na forma *oxi*, propõe-se que o oxigênio molecular seja ligado como um peróxido entre os dois átomos de cobre numa conformação lateral, tal como visualizado em estruturas cristalográficas previamente determinadas. Na ausência de qualquer substrato, E_{met} é a forma primária ⁴³. A existência do núcleo de peróxido de cobre II foi

confirmada pela espectroscopia, a qual apresenta uma intensa banda de transferência de carga peróxido-cobre no espectro de absorção no UV-Vis em ~350 nm e uma banda de vibracional de estiramento da ligação O-O observável no espectro de Raman em $\sim 750\text{ cm}^{-1}$ 44.

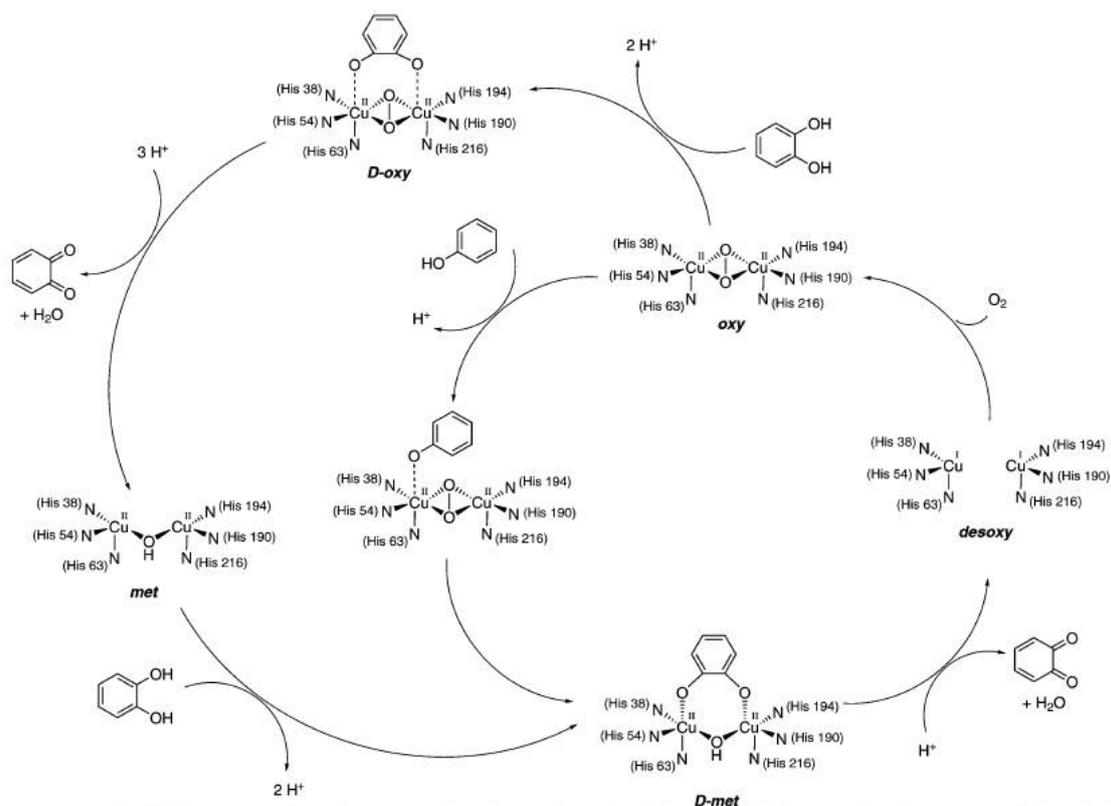


Figura 11. Ciclo catalítico da tirosinase (reproduzido da Ref. 44).

A tirosinase tem sido utilizada na construção de biossensores há bastante tempo, geralmente estes biossensores são utilizados para detectar uma variedade de compostos fenólicos^{45; 46}, como catecol^{47; 48; 49}, bisfenol A^{50; 51; 52; 53}, tiramina⁵⁴, tirosina⁵⁵, dopamina⁴⁹, fármacos como paracetamol⁵⁶ e metimazol⁵⁷.

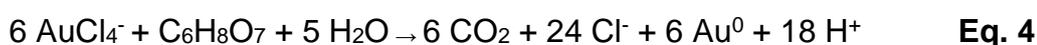
Com o intuito de melhorar a sensibilidade, o desempenho e até de construir dispositivos que tenham a capacidade de determinar vários analitos simultaneamente, tem sido propostos a utilização de nanopartículas metálicas, mais comumente as nanopartículas de ouro, nanomateriais condutores a base de carbono, nanotubos de carbono e grafeno, além do uso de diversos eletrodos como suporte.

Os principais avanços em biossensores giram em torno da imobilização e acessibilidade à interface do material biológico com o eletrodo ³⁶. O uso de polímeros e nanomateriais têm fornecido um meio para aumentar a resposta de sinal destes tipos de dispositivos³⁶. Assim, nanopartículas de ouro, nanomateriais condutores a base de carbono, nanotubos de carbono e grafeno têm sido frequentemente utilizados no desenvolvimento de biossensores.

2.4 Nanopartículas de ouro

Partículas nanométricas de metais nobres, especialmente as nanopartículas de ouro (AuNPs), têm recebido grande interesse devido às suas atrativas propriedades elétricas, ópticas e térmicas, bem como propriedades catalíticas e aplicações potenciais nas áreas da física, química, biologia, medicina e ciência dos materiais ³⁵. Além disso, as nanopartículas de ouro apresentam boa estabilidade, condutividade e biocompatibilidade ^{34; 48}. Por conta disso, elas têm sido cada vez mais utilizadas na confecção de biossensores, pois são capazes de melhorar a interação entre a biomolécula e a superfície do eletrodo ^{27; 58; 59}. As AuNPs são as mais amplamente utilizadas para amplificar o sinal ⁵⁹, uma vez que são fáceis de sintetizar e funcionalizar e são estáveis ⁶⁰.

Um dos protocolos mais populares para a preparação de nanoesferas de ouro baseia-se na redução de H₂AuCl₄ por citrato em água, que foi descrita pela primeira vez em 1951 por Turkevitch e agora é comumente referida como o "método de Turkevitch" ⁶¹. Neste método, o citrato serve tanto como agente redutor como um estabilizador aniônico. Através desta rota sintética é possível produzir nanoesferas de diâmetro médio de cerca de 15 nm com uma distribuição de tamanho bastante estreita. A reação pode ser representada da seguinte forma ⁶¹:



A grande área superficial de AuNPs esféricas confere grande capacidade de adsorção para proteínas, logo, podem combinar-se firmemente com enzimas, anticorpos, glicoproteínas, entre outros. A interação do biocomponente com as nanopartículas de ouro podem ser alcançadas através de interações eletrostáticas ou ligações covalentes através dos grupos funcionais: -SH, -NH₂, -COOH^{34; 62}.

Desta forma, as AuNPs são um recurso muito interessante na preparação de um biossensor, pois além de melhorar a condutividade e a transferência de elétrons de sítios ativos de enzimas para a superfície do eletrodo⁵⁹, amplificando o sinal analítico, também proporcionam uma superfície mais favorável e adequada para a imobilização⁵⁹.

2.5 Eletrodos impressos

Os eletrodos impressos, também conhecidos pela sigla SPE, do inglês *Screen-printed electrode*, combinam três eletrodos: o eletrodo de trabalho, o contra-eletrodo e o eletrodo de referência, em um único dispositivo. Estes são obtidos pela tecnologia de serigrafia, utilizam vários tipos de tintas que é impressa sobre um suporte de plástico.

Monitoramento “*in situ*”, análises “*on-spot*” e testes “*point-of-care*” são necessários em análises biomédicas, farmacêuticas, industriais e ambientais, em que não haja necessidade de nenhum pré-tratamento prévio da amostra e limpeza entre as medidas⁶³. Foi a partir destas necessidades que começaram a ser pesquisados e desenvolvidos sensores descartáveis, dentre eles os SPEs que, inclusive, hoje em dia estão disponíveis comercialmente. Desde a década de 1990, a tecnologia de serigrafia (*screen-printing*) adaptada da indústria microeletrônica, ofereceu alto volume de produção de baixo custo e sensores altamente reprodutíveis e confiáveis.

Estes eletrodos possuem um tamanho miniaturizado, o que possibilita a sua portabilidade, uso como “*point-of-care*”⁶⁴, utilização de pequenos volumes

de amostra⁶⁵, entre outros. Além disso, são simples de operar, confiáveis e possuem um custo modesto⁶³.

A superfície do eletrodo de trabalho dos SPEs pode ser facilmente modificada para vários analitos. Uma das principais estratégias para produzir SPE altamente versáteis é modificar o eletrodo de trabalho depositando diversas substâncias nas superfícies do eletrodo, tais como filmes metálicos, nanopartículas metálicas, enzimas e polímeros^{63; 65}.

Os materiais de carbono são frequentemente utilizados na construção de SPEs devido à sua baixa corrente de fundo, além de ampla janela de potencial no sentido positivo. Este material oferece várias vantagens uma vez que são, de certo modo, baratos, versáteis e inertes. Os SPEs de carbono podem ser utilizados não modificados ou podem ser modificados. Dentre as modificações mais comumente utilizadas na confecção dos sensores estão o uso das nanopartículas metálicas devido às suas propriedades catalíticas, uma grande relação área superficial/volume, capacidade excelente de transferência de elétrons e alta condutividade, resultando em baixos limites de detecção dos analitos.

Além disso, muitas enzimas têm sido utilizadas na construção de biossensores a partir dos SPEs, desta forma, combinando a alta seletividade das enzimas com a ótima sensibilidade do transdutor eletroquímico. O uso da enzima tirosinase na modificação dos SPEs já foi relatado para análises de alguns compostos farmacêuticos, tais como os compostos fenólicos, incluindo o catecol⁶⁵.

2.6 Breve descrição das técnicas eletroquímicas utilizadas neste trabalho

2.6.1 Voltametria

O termo voltametria se refere a um conjunto de técnicas eletroanalíticas nas quais um sinal de excitação de potencial variável é imposto a um eletrodo de trabalho em uma célula eletrolítica. Durante essa varredura de potencial a corrente é registrada como uma função do tempo e então como uma função da voltagem aplicada. O registro da corrente em função do potencial é denominado voltamograma. A magnitude da corrente medida possui relação com a quantidade de analito presente na interface do eletrodo, logo, na célula eletroquímica ⁶⁶. A velocidade de oxidação e/ou redução do analito é limitada pela velocidade de transferência de massa do analito até a superfície do eletrodo ⁶⁷.

A corrente total é soma de dois tipos de correntes. A corrente faradáica (a qual obedece à lei de Faraday), relativa à reação de oxidação/redução da espécie em estudo no eletrodo e é proporcional à concentração de analito no seio da solução. A corrente capacitiva é a corrente necessária para carregar a dupla camada elétrica existente na interface eletrodo/solução, não é proporcional à concentração de analito e não obedece à lei de Faraday ⁶⁶.

A forma na qual o potencial é aplicado e por consequência a forma como o sinal analítico (corrente) é adquirido, irá denominar o tipo de técnica voltamétrica em questão. O modo de aquisição influencia na sensibilidade do método principalmente devido à magnitude da corrente capacitiva observada para cada caso e também na seletividade devido ao formato do voltamograma e à largura dos pulsos de resposta medidos. Além do modo de aquisição, os métodos voltamétricos variam de acordo com as etapas utilizadas antes ou durante a medida do sinal, tais como a pré-concentração de analito ou direção ou inversão da direção da varredura de potencial. A escolha da técnica voltamétrica a ser utilizada está relacionada com o tipo de informação

quantitativa ou qualitativa que se quer obter a respeito do analito ou do processo que envolve a interação entre o analito e o eletrodo de trabalho ⁶⁶.

2.6.1.1 Voltametria Cíclica

A voltametria cíclica é geralmente utilizada com o intuito de extrair informações qualitativas sobre os processos eletroquímicos, devido ao fato de fornecer informações sobre a termodinâmica dos processos redox, da cinética de reações heterogêneas de transferências de elétrons e sobre reações químicas acopladas a processos adsortivos ⁶⁶.

No experimento de voltametria cíclica, o potencial aplicado corresponde a uma onda triangular onde após atingir um valor determinado o potencial é varrido no sentido inverso até o valor inicial. No caso de uma reação reversível, os produtos que tiverem sido gerados no sentido direto (e se localizam ainda próximos à superfície do eletrodo) serão oxidados ou reduzidos, gerando um sinal no sentido inverso. A direção inicial da varredura de potencial pode ser negativa ou positiva. Um experimento de voltametria cíclica pode empregar um ciclo inteiro, um ciclo parcial ou ainda vários ciclos. O tipo de voltamograma gerado depende do tipo de mecanismo redox que o composto em questão sofre no eletrodo, o que faz da voltametria cíclica uma ferramenta valiosa para estudos mecanísticos ^{66; 68}. Um exemplo de voltamograma cíclico pode ser observado na Figura 12, a qual apresenta a varredura de potencial em função do tempo e o respectivo voltamograma cíclico obtido de uma solução de $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ $6 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em KNO_3 1 mol L^{-1} .

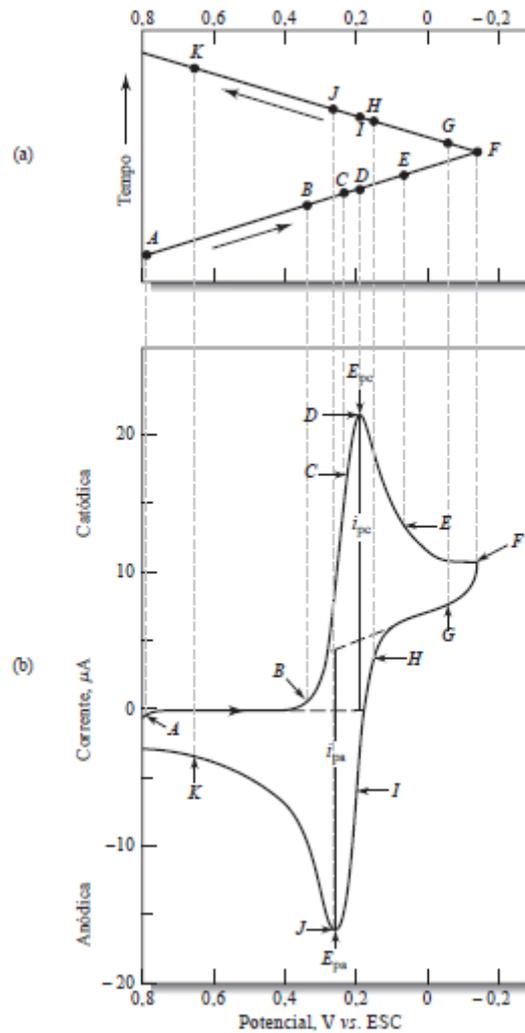


Figura 12. A) Curva de potencial versus tempo. B) Voltamograma cíclico de uma solução de $K_3Fe(CN)_6$ $6 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ e KNO_3 1 mol L^{-1} . (Reproduzido da Ref. 67).

Existem dois fatores principais que determinam as reações que ocorrem no eletrodo: a difusão do analito da solução para a superfície do eletrodo e vice-versa, e a transferência heterogênea de carga entre o analito e o eletrodo. A equação de Butler-Volmer (Equação 5), equação básica da cinética eletroquímica, expressa estas relações ⁶⁶:

$$\frac{i}{nF} = Ca_{(0,t)} K_s \exp\left[-\frac{\alpha n_a F}{RT} (E_{pc} - E^o)\right] - Cb_{(0,t)} K_s \exp\left[\frac{(1-\alpha)n_a}{RT} (E_{pc} - E^o)\right] \quad \text{Eq. 5}$$

Para uma reação reversível, ou seja, uma reação que ocorre com velocidade suficientemente alta para estabelecer um equilíbrio dinâmico na interface, a equação de Butler-Volmer se reduz na equação de Nernst, pois

como a cinética da reação de transferência de carga é rápida ($K_s > 10^{-1} \text{ cm s}^{-1}$) apenas a etapa de transferência de massa irá ditar as regras do processo. A corrente do pico (em ampéres) neste caso é dada por ⁶⁶:

$$i_{pc} = (2,69 \times 10^5) n^{2/3} A D_0^{1/2} v^{1/2} C_0 \quad \text{Eq. 6}$$

Onde n é o número de elétrons envolvidos no processo, A é a área do eletrodo (cm^2), D_0 é o coeficiente de difusão ($\text{cm}^2 \text{ s}^{-1}$), C_0 é a concentração da espécie em solução (mol cm^{-3}) e v é a velocidade de varredura (V s^{-1}).

Quando a velocidade de transferência de carga é lenta, comparada com a velocidade de varredura ($K_s < 10^{-5} \text{ cm s}^{-1}$) as concentrações das espécies oxidadas e reduzida não são mais função apenas do potencial, não possuindo, portanto, um comportamento nernstiano. Neste caso, os termos α (coeficiente de transferência) e K_s (velocidade de transferência de carga) devem ser considerados e a equação que descreve a corrente de pico (i_{pc}) é dada por ⁶⁶:

$$i_{pc} = (2,99 \times 10^5) n(\alpha n)^{1/2} A C_0 D_0^{1/2} v^{1/2} \quad \text{Eq. 7}$$

Nestes casos, o voltamograma costuma apresentar apenas o pico no sentido direto, que irá deslocar-se com o aumento da velocidade de varredura. Além disso, este pico varia também com α e K_s ⁶⁶.

Para uma reação eletródica quase-reversível ($10^{-1} > K_s > 10^{-5} \text{ cm/s}$), a corrente é controlada tanto pela etapa de transferência de massa como pela etapa de transferência de carga. A equação de Nernst é apenas aproximadamente satisfeita ⁶⁶.

2.6.1.2 Voltametria de Pulso Diferencial

A técnica de voltametria de pulso diferencial consiste em pulsos de amplitudes fixos sobrepostos a uma rampa de potencial crescente na forma de escada, aplicados ao eletrodo de trabalho, como pode ser observado na Figura 13.

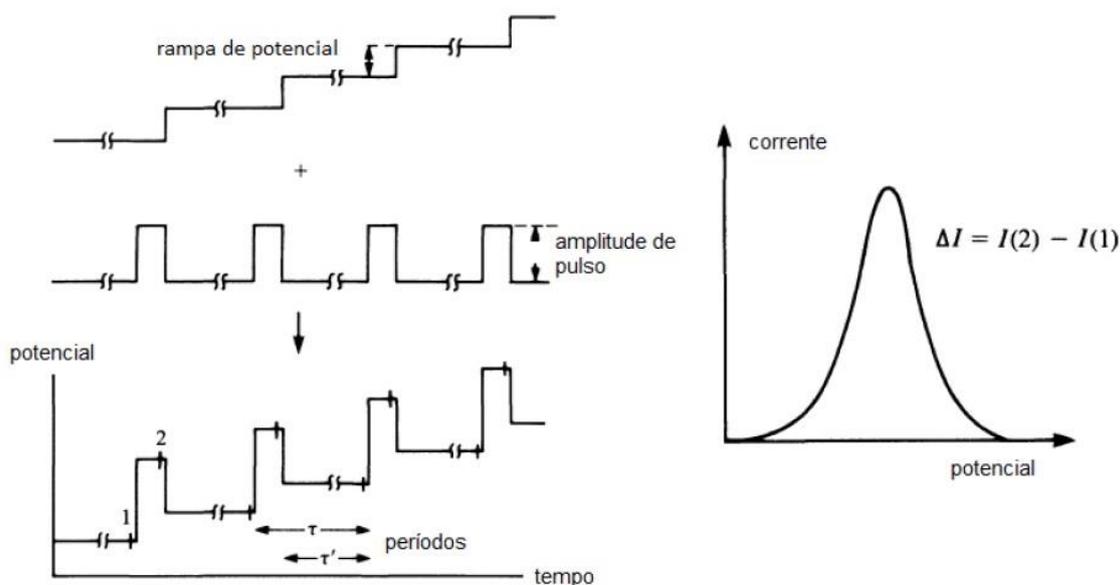


Figura 13. Sinais de excitação em voltametria de pulso diferencial (reproduzido da Ref. 66).

A corrente é medida duas vezes, uma antes da aplicação do pulso (S_1) e outra ao final do pulso (S_2). A primeira corrente é instrumentalmente subtraída da segunda, e a diferença das correntes é plotada versus o potencial aplicado. A curva diferencial resultante consiste em picos de corrente de forma gaussiana, cuja altura é diretamente proporcional à concentração do analito ^{66; 68}.

O objetivo de fazer duas medidas da corrente e trabalhar com a diferença entre elas é a correção da corrente capacitiva. À medida que se aplica o pulso, ocorre um acréscimo da contribuição da corrente capacitiva e da corrente faradáica, mas a corrente capacitiva diminui exponencialmente, enquanto que a corrente faradáica diminui linearmente, assim, escolhendo um tempo apropriado para se fazer a segunda leitura, faz-se a medida da corrente total a um valor de corrente onde a contribuição da corrente capacitiva pode ser desconsiderada. Assim, desvinculando o valor da primeira leitura de corrente da segunda, obtém-se uma minimização da contribuição da corrente de fundo ^{66; 68}. Portanto, esta técnica é muito mais sensível do que as técnicas voltamétricas que não utilizam o pulso e por isso é mais adequada para

determinação de concentrações muito baixas de analito, podendo alcançar a faixa de 10^{-7} a 10^{-8} mol L⁻¹.

2.6.2 Cronoamperometria

Técnicas amperométricas são amplamente utilizadas no desenvolvimento de sensores e no acompanhamento de titulações e reações de interesse biológico ⁶⁷. A cronoamperometria é uma das técnicas eletroquímicas tradicionais e consiste no registro da corrente gerada, pela oxidação ou redução de espécies devido a um potencial externo aplicado, em função do tempo ⁶⁹.

As condições do experimento envolvem um eletrodo de trabalho estacionário e uma solução não agitada. Como o transporte de massa, nestas condições, é devido somente à difusão, a curva corrente *versus* tempo reflete a mudança no gradiente de concentração do analito na vizinhança da superfície eletródica. Isto envolve a expansão gradual da camada de difusão associada com a diminuição do reagente, e conseqüentemente a diminuição da inclinação do perfil de concentração à medida que o tempo progride, como pode ser observado no pico transiente da Figura 14 (c). Assim, em um eletrodo plano, a corrente decai com o tempo segundo a equação de Cottrel (Equação 8) ⁷⁰:

$$i(t) = \frac{nFACD^{1/2}}{\pi^{1/2} t^{1/2}} = kt^{-1/2} \quad \text{Eq. 8}$$

Onde $i(t)$ é a corrente registrada a um tempo t , que é representado em segundos, n é o número de elétrons utilizados para oxidar ou reduzir uma molécula de analito, F é a constante de Faraday (96,485 C/mol), A é a área do eletrodo em cm², C é a concentração das espécies oxidadas em mol/cm³ e D é o coeficiente de difusão das espécies oxidadas em cm²/s.

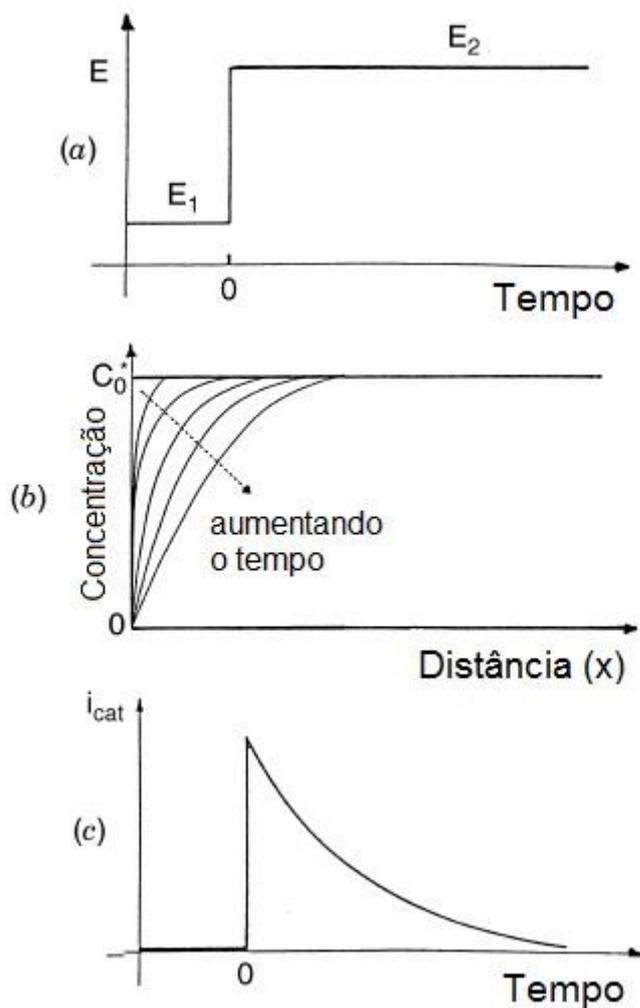


Figura 14. Experimento de cronoamperometria: (a) forma da onda potencial-tempo; (b) mudança no perfil de concentração com o tempo; (c) resposta corrente-tempo resultante; (traduzido da Ref. 70).

Esta técnica é muito utilizada na construção de curvas de calibração analítica aplicada a sensores e biossensores amperométricos, porém não é utilizada na mesma condição descrita acima, na qual o transporte de massa é dado somente pela difusão. Na construção de curvas de calibração utiliza-se a convecção como principal fator de transporte de massa, pois neste caso é mais adequado manter a corrente gerada por dada concentração do analito, do contrário no caso de difusão, a corrente cairia com o tempo. A Figura 15 apresenta um cronoamperograma característico obtido por sucessivas adições do analito ⁷¹.

Este gráfico pode ser analisado em duas partes: a primeira destacada com linha tracejada em azul e a segunda em verde. No início do experimento (azul) a corrente diminui rapidamente até atingir um valor estacionário. Na segunda parte (em verde), é adicionado o analito, espécies que serão oxidadas ou reduzidas na superfície do eletrodo. Para cada acréscimo de analito há um aumento da corrente, como está representado pelas setas. O aumento sucessivo na concentração do analito gera uma curva de corrente em forma de patamares ou escada ⁷¹.

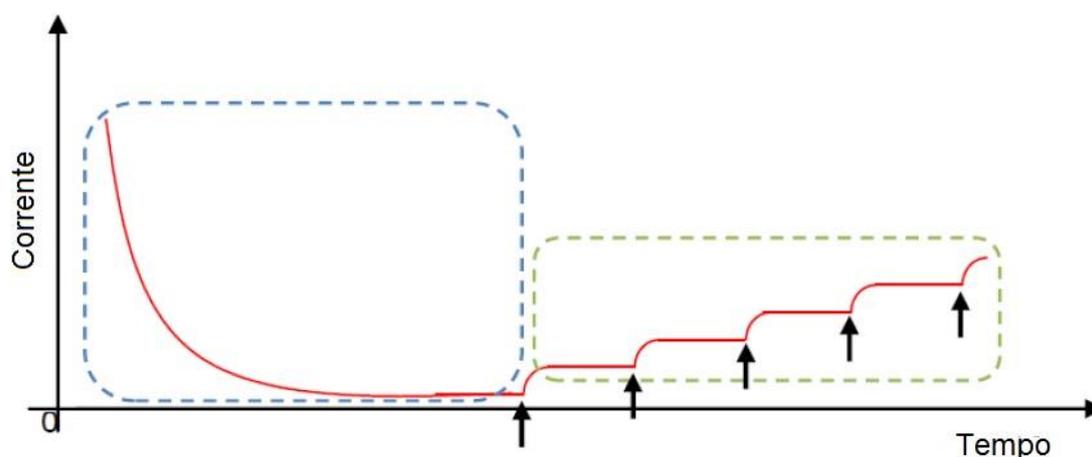


Figura 15. Cronoamperograma obtido pela adição de concentrações crescentes do analito (adaptado da Ref. 71).

2.7 Espectroscopia de absorção molecular no UV-Vis

A espectroscopia de absorção molecular é baseada na medida da transmitância T ou da absorbância A de soluções contidas em células transparentes. Quando um feixe de luz monocromática (P_0) atravessa uma solução com moléculas absorventes, parte da luz é absorvida pela solução e o restante é transmitido (P). Geralmente, a concentração de um analito que absorve radiação está relacionada linearmente com a absorbância, como mostra a lei de Lambert-Beer (Equação 9) ⁶⁸:

$$A = -\log T = \log P_0/P = \epsilon bc \quad \text{Eq. 9}$$

Onde ϵ , b e c são, respectivamente, a absorvidade molar ($\text{L mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$), o caminho óptico (cm), e a concentração da espécie analisada (mol L^{-1}).

Esta técnica pode ser utilizada no monitoramento de reações com formação de produtos que absorvem na faixa do espectro UV-Vis (200-800 nm). É com este intuito que esta técnica foi empregada neste trabalho, assim como Dai e colaboradores⁷² utilizaram a técnica para investigar a reação de oxidação/polimerização da L-DOPA, L-tirosina e dopamina na presença da tirosinase.

3. PARTE EXPERIMENTAL

3.1 Materiais e reagentes

Na síntese das nanopartículas de ouro foram utilizados citrato de sódio (Labsynth), ouro em pó (Sigma-Aldrich, 99,99%) e água ultrapura.

Na preparação do biossensor foram utilizados eletrodos de carbono impresso comerciais adquiridos da DropSens (modelo DRP-C110), solução de nanopartículas de ouro sintetizadas previamente, Tirosinase de cogumelos (Sigma-Aldrich, EC 1.14.18.1, 50 KU) e solução 5% (m/v) de Nafion® 117 (Sigma-Aldrich).

A solução de tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ (TF) pH 7,3 foi preparada utilizando dihidrogenofosfato de sódio anidro (Tedia, NaH₂PO₄) e monohidrogenofosfato de sódio heptahidratado (98%, Na₂HPO₄·7H₂O). A solução de adenosina (Sigma-Aldrich, 99,0%, C₁₀H₁₃N₅O₄) foi preparada utilizando hidróxido de amônio 2,9 mol L⁻¹ (Vetec) e também foi preparada em solvente dimetilformamida (Synth), abreviado pela sigla DMF. As soluções de catecol (Sigma-Aldrich, 99,0%, C₆H₆O₂) 0,01 mol L⁻¹ para as medidas de UV-Vis foram preparada em meio de TF 0,1 mol L⁻¹, outra em meio de ácido clorídrico (Vetec) 0,1 mol L⁻¹ e outra em meio de hidróxido de sódio (Merck) 0,1 mol L⁻¹. Para as medidas eletroquímicas as soluções de catecol foram preparadas em ácido sulfúrico (Proquimios) 0,01 mol L⁻¹. A solução de L-tirosina (Sigma-Aldrich, 99%, C₉H₁₁NO₃) 0,05 mol L⁻¹ foi preparada em meio de ácido clorídrico (Vetec) 1 mol L⁻¹. A solução da enzima tirosinase foi preparada adicionando 1 mL de tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ pH 7,3 no recipiente da enzima comprada que continha 50 KU.

As medidas eletroquímicas foram realizadas em solução TF 0,1 mol L⁻¹ pH 7,3 contendo 0,05 mol L⁻¹ de cloreto de potássio (Sigma-Aldrich, 99,0%).

A água utilizada para preparar todas as soluções foi obtida a partir de um sistema de purificação Milli-Q da Millipore, com resistividade de 18,2 MΩ cm a 25 ° C.

3.2 Instrumentação

Os experimentos eletroquímicos foram realizados com o potenciostato da marca Autolab (PGSTAT128N), mostrado na Figura 16, utilizando o software NOVA 2.0. Os eletrodos de carbono impresso são constituídos do eletrodo de trabalho (4 mm de diâmetro), contra-eletrodo de carbono e eletrodo de referência de prata. Todos os potenciais são referidos a este eletrodo de referência. Um agitador magnético proporcionou o transporte convectivo durante as medições amperométricas. Foi utilizado um pHmetro MS Tecnocon Instrumentação (Mpa210) para verificar o pH das soluções preparadas.



Figura 16. Foto da célula eletroquímica e do potenciostato utilizados.



Foi utilizado um espectrofotômetro UV-Vis (Varian, Cary 50 Conc) e um Microscópio Eletrônico de Transmissão (JEOL, JEM-1200EX II) para caracterizar as nanopartículas de ouro. Enquanto as morfologias das superfícies de eletrodos modificadas foram analisadas utilizando um Microscópio Eletrônico de Varredura (JEOL, JSM 6060).

O mesmo espectrofotômetro UV-Vis (Varian, Cary 50 Conc) foi utilizado para fazer o estudo da interação entre catecol e adenosina e estudo da inibição enzimática.

3.3 Síntese das nanopartículas de ouro

A solução de ácido cloroáurico (HAuCl_4) foi preparada dissolvendo 100 mg do ouro em pó com água-régia e posterior diluição com água ultrapura até 50 mL. A solução coloidal de nanopartículas de ouro (AuNPs) foi preparada por redução do ácido cloroáurico com citrato em solução aquosa pelo método de Turkevich. Primeiro, 90 mL de citrato de sódio 0,1% (m/v) foram aquecidos até ao seu ponto de ebulição. Subsequentemente, adicionou-se 5 mL de 0,011 mol L^{-1} de HAuCl_4 à solução de citrato sob agitação vigorosa. Imediatamente, a cor da solução muda de amarelo pálido para preto, e depois de alguns minutos transforma-se em vermelho vinho. Após 2 horas de agitação, a mistura reacional foi transferida para um balão volumétrico de 100 mL e ajustado o volume com água ultrapura.

3.1 Preparação do biossensor

O biossensor doravante denominado Nafion/Tyr/AuNPs/SPE foi preparado em três etapas: primeiro, 10 μL de uma solução coloidal de AuNPs foram dispersos na superfície do eletrodo e deixando o solvente evaporar à temperatura ambiente. Este procedimento foi repetido três vezes, sendo no total 30 μL de solução de AuNPs depositados. Depois disso, adicionou-se 10 μL de solução de tirosinase contendo 500 U da enzima e deixou-se secar à temperatura ambiente. Finalmente, a superfície foi coberta com 5 μL de solução de Nafion para evitar a lixiviação da enzima na solução. Para comparação, também foram preparados SPE modificados com nanopartículas de ouro (AuNPs/SPE) e SPE modificados com nanopartículas de ouro e polímero Nafion (Nafion/AuNPs/SPE) nas mesmas condições e concentrações utilizadas na confecção do biossensor. O biossensor foi armazenado em tampão fosfato 0,1 mol L^{-1} , pH 7,3, a 2 °C, enquanto os outros foram armazenados secos à temperatura ambiente.

3.2 Medidas Eletroquímicas

Foi analisado o comportamento eletroquímico da tirosina utilizando a técnica de voltametria cíclica, fazendo-se uma varredura de potencial de + 0,20 V a + 0,56 V em solução branco (tampão fosfato 0,1 mol L^{-1} pH 7,3) e com

sucessivas adições de alíquotas de solução de tirosina $0,05 \text{ mol L}^{-1}$. O efeito da inibição enzimática pela adenosina foi avaliado registrando voltamogramas cíclicos mantendo uma concentração fixa de tirosina, e adicionando alíquotas de solução de adenosina $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ na solução eletrolítica.

Outros experimentos foram realizados utilizando catecol como substrato da enzima. Voltamogramas cíclicos foram registrados numa faixa de potencial de $+ 0,35 \text{ V}$ a $- 0,15 \text{ V}$ em solução eletrolítica de tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7,3. Este substrato foi escolhido para realizar estudos pertinentes a determinar a constante cinética da enzima tirosinase, imobilizada no biossensor. As medidas foram realizadas através da técnica de voltametria de pulso diferencial, fazendo-se uma varredura de potencial de $+ 0,3 \text{ V}$ até $- 0,1 \text{ V}$, em uma solução eletrolítica de TF $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ contendo KCl $0,05 \text{ mol L}^{-1}$. Alíquotas de solução de catecol $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ foram adicionadas, obtendo-se uma curva de cinética enzimática na faixa de concentração de $9,98 \times 10^{-5}$ a $3,70 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de catecol. A mesma curva foi realizada na presença de $1,45 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de adenosina.

A fim de efetuar a determinação direta da adenosina, voltamogramas cíclicos foram registrados de $0,0 \text{ V}$ a $+1,2 \text{ V}$ para promover a eletro-oxidação sobre o biossensor. A medida foi realizada em solução eletrolítica de tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7,3 contendo KCl $0,05 \text{ mol L}^{-1}$. Para construir a curva analítica porem utilizou-se a técnica de cronoamperometria, aplicando-se um potencial fixo de $1,0 \text{ V}$ e fazendo sucessivas adições de solução de adenosina $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ na solução eletrolítica de tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7,3 contendo KCl $0,05 \text{ mol L}^{-1}$. Mantida sob agitação magnética, as medidas foram feitas em triplicata. A mesma curva também foi realizada com os sensores SPE, AuNPs/SPE, Nafion/AuNPs/SPE para fins de comparação com o desempenho apresentada pelo biossensor.

A estabilidade do biossensor foi avaliada por um período de 45 dias, consistindo de 10 dias de medidas. Nesse tempo o biossensor foi mantido mergulhado em solução de tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 7,3. Para efeitos comparativos, outro biossensor foi conservado seco. Ambos foram mantidos

sob refrigeração a 2° C. O teste consistiu na medida da corrente de 5×10^{-5} mol L⁻¹ de catecol por voltametria de pulso diferencial. No primeiro dia de medida, foi realizado um conjunto de 10 medições e a média destas medições foi definida como a resposta média para a construção de uma carta de controle. Os limites superior e inferior de controle foram estabelecidos como sendo 3 vezes o desvio padrão desta resposta média. Nos dias seguintes, a medição foi feita em triplicata. Desta forma, foi obtida uma carta de controle para cada um dos tipos de armazenamento.

3.3 Estudo da oxidação do catecol na presença de adenosina por Espectroscopia de Absorção no UV-Vis

Com o intuito de avaliar uma possível interação entre o catecol ou sua forma oxidada (o-quinona) com a adenosina foram realizados experimentos de oxidação de catecol na presença de adenosina. O produto formado foi monitorado por espectroscopia de absorção molecular no UV-Vis. A fim de verificar a influência do pH do meio reacional, utilizou-se o catecol dissolvido em três diferentes meios: tampão fosfato 0,1 mol. L⁻¹ pH=7,3, ácido clorídrico 0,1 mol L⁻¹ pH~1 e hidróxido de sódio 0,1 mol L⁻¹ pH~13.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Síntese e caracterização das nanopartículas de ouro

Seguindo o método proposto por Turkevitch⁶¹, as nanopartículas de ouro (AuNPs) foram sintetizadas em uma solução de citrato de sódio. No processo foi observada a mudança de coloração da solução de ácido cloroáurico, que passou de amarelo pálido para vermelho vinho. Como já mencionado, o citrato de sódio funciona como o agente redutor de íons de ouro, bem como um agente estabilizante, que controla o subsequente crescimento de nucleação de nanopartículas e evita aglomerações⁷³. As AuNPs sintetizadas foram caracterizadas por espectroscopia de absorção molecular no UV-Vis e microscopia eletrônica de transmissão (MET).

A espectroscopia UV-Vis é uma técnica amplamente aplicada para a caracterização das propriedades ópticas e estrutura eletrônica de AuNPs. A banda de absorção máxima exibida pelas soluções coloidais é devida à ressonância plasmônica de superfície (SPR). Sob a irradiação da luz, os elétrons de condução em uma nanoestrutura de ouro são levados a oscilar coletivamente pelo campo elétrico a uma frequência de ressonância em relação à rede de íons positivos. Nesta frequência de ressonância, a luz incidente é absorvida pela nanoestrutura. Alguns desses fótons serão liberados com a mesma frequência em todas as direções e este processo é conhecido como espalhamento. Ao mesmo tempo, alguns desses fótons serão convertidos em vibrações da rede e este processo é referido como absorção. Em geral, o pico de SPR de uma nanoestrutura de ouro deve incluir componentes de espalhamento e absorção. Para nanoesferas de ouro com cerca de 50 nm de diâmetro, o pico é posicionado em 520 nm e este pico é responsável pela cor vermelha rubi exibida pelas soluções coloidais de ouro⁶¹.

O comprimento de onda ou frequência particular depende do tamanho de partícula, forma, ambiente dielétrico e revestimentos⁷⁴. As AuNPs sintetizadas mostraram um pico bem definido com uma absorbância máxima em 522 nm, como mostrado na Figura 17.

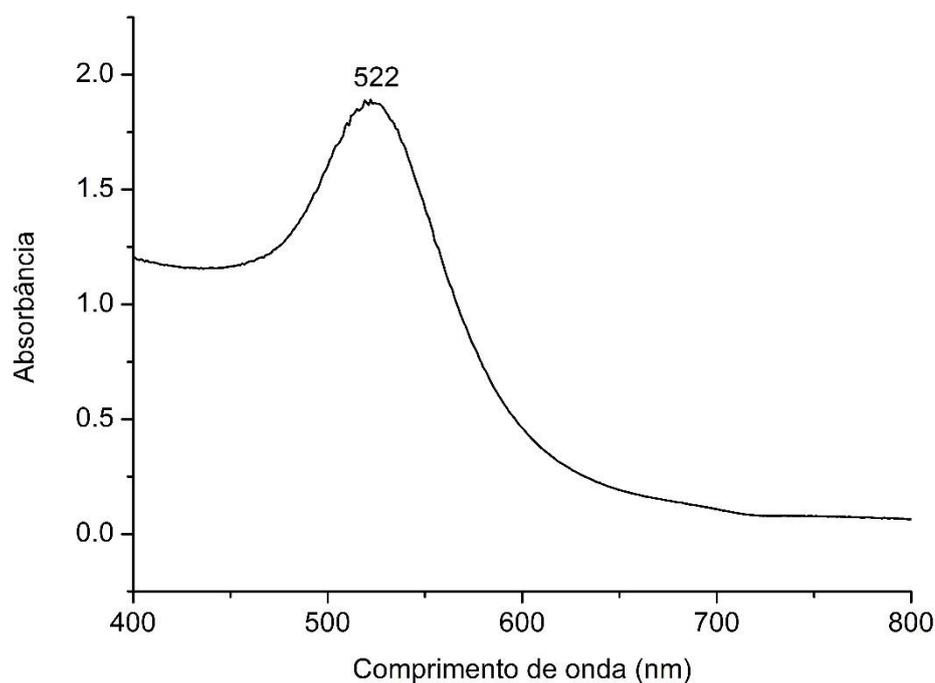


Figura 17. Espectro no UV-Vis da solução coloidal com o pico característico de ressonância plasmônica superficial em 522 nm.

Tabela II. Relação da absorvância das AuNPs no pico de ressonância do plasma de superfície (A_{spr}) à absorvância a 450 nm (A_{450}) em dependência do diâmetro de partícula proposto na Ref. 74.

A_{spr}/A_{450}	d / nm	A_{spr}/A_{450}	d / nm	A_{spr}/A_{450}	d / nm
1.10	3	1.56	12	1.96	40
1.19	4	1.61	14	2.00	45
1.27	5	1.65	16	2.03	50
1.33	6	1.69	18	2.07	55
1.38	7	1.73	20	2.10	60
1.42	8	1.80	25	2.12	65
1.46	9	1.86	30	2.15	70
1.50	10	1.92	35	2.17	75

O tamanho e a concentração da solução de AuNPs foram calculados utilizando-se os dados dos espectros UV-Vis e o método de aproximação relatado na literatura com base na relação entre o tamanho de partícula e o coeficiente de extinção ⁷⁴. Então, a absorvância em do pico de ressonância do

plasma de superfície (A_{spr}) é igual 1,8835 e a absorvância em 450 nm (A_{450}) é igual 1,1646, logo, a razão A_{spr}/A_{450} é igual a 1,6173, que segundo a Tabela II o tamanho do diâmetro estimado das AuNPs é 14 nm. O dado ϵ_{450} em função do diâmetro pode ser usado para calcular a concentração das AuNPs c em mol L⁻¹ a partir da absorvância A em 450 nm para o caminho óptico padrão l de 1 cm de acordo com $c = A_{450}/\epsilon_{450}$. O ϵ_{450} para 14 nm de diâmetro das AuNPs é igual a $1,76 \times 10^8$, fazendo-se o cálculo $c = 1,1646/1,76 \times 10^8$, a concentração estimada é de $6,6 \times 10^{-9}$ mol L⁻¹.

Além disso, o tamanho e a forma das AuNPs foram analisados por MET. A imagem da Figura 18 (A) mostra nanopartículas esféricas com um diâmetro médio de $15,0 \pm 1,1$ nm representado no histograma na Figura 18 (B). A análise de imagem foi realizada usando o software Fiji ImageJ. Este valor é bastante coerente com o tamanho estimado pela espectroscopia UV-Vis. De acordo com a literatura, o crescimento de nanopartículas esféricas ocorre através da redução do sal de ouro e posterior deposição de átomos de metal Au⁰ reduzidos. O metal reduzido forma um aglomerado na fase inicial, e a deposição contínua conduz ao crescimento de partículas reguladas pelo agente de recobrimento, produzindo forma e tamanho definidos^{73; 74}.

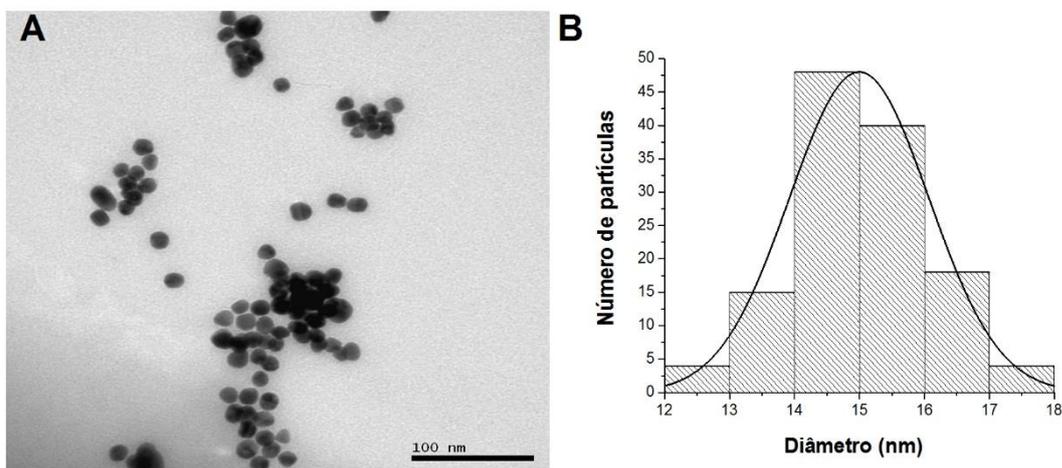


Figura 18. A) Imagem de MET das AuNPs. B) Histograma da distribuição de diâmetro.

A concentração molar da solução de AuNPs também foi estimada a partir da quantidade inicial de ouro utilizada na síntese e do tamanho médio das nanopartículas, segundo a Equação 10:

$$[\text{AuNPs}] = N_{\text{total}} / (N_{\text{av}} \times V \times N_A) \quad \text{Eq. 10}$$

Onde N_{total} é o número total de átomos de ouro, N_{av} é o número de átomos por nanopartículas, V é o volume da solução (0,1 L) e N_A é o número de Avogadro. O N_{total} foi calculado a partir da massa de ouro pesada que foi dissolvida para fazer a solução de HAuCl_4 , que foi 0,0104 g de ouro em pó, dividindo esta pela massa molar do ouro e multiplicando pelo número de Avogadro, obteve-se $3,195 \times 10^{19}$ átomos.

N_{av} foi calculado assumindo a geometria esférica para as nanopartículas, segundo a Equação 11:

$$N_{\text{av}} = (\pi \times \rho \times D^3 \times N_A) / 6M \quad \text{Eq. 11}$$

Em que ρ é a densidade de ouro ($19,32 \text{ g/cm}^3$), D é o diâmetro médio das nanopartículas ($15 \times 10^{-7} \text{ cm}$) e M é o peso atômico do ouro ($196,96 \text{ g/mol}$). Desta forma, o número de átomos por nanopartículas de ouro, N_{av} é igual a $1,04 \times 10^5$ átomos por AuNPs.

Concluindo o cálculo da equação 10, encontrou-se que a concentração de AuNPs é $5,1 \times 10^{-9} \text{ mol L}^{-1}$, concentração muito próxima do valor obtido a partir dos dados da espectroscopia UV-Vis.

A distribuição uniforme de tamanho dos nanomateriais e sua similaridade de tamanho com as enzimas, juntamente com outras propriedades vantajosas dos nanomateriais, conferem a melhoria das propriedades enzimáticas em sistemas nanobiocatalíticos, particularmente a estabilidade e atividade enzimática ³⁵.

4.2 Caracterização dos sensores e do biossensor

4.2.1 Análise da morfologia dos sensores e do biossensor

A preparação do biossensor Nafion/Tyr/AuNPs/SPE envolveu três etapas: a deposição de AuNPs, a adição de tirosinase e a aplicação de Nafion como uma membrana para impedir a difusão da enzima para a solução. Para comparação, foram também preparados os sensores AuNPs/SPE, Nafion/AuNPs/SPE. A morfologia da superfície destes eletrodos foi analisada através de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV). A Figura 19 mostra as imagens de MEV de AuNPs/SPE (A), Nafion/AuNPs/SPE (B) e Nafion/Tyr/AuNPs/SPE (C). A superfície do biossensor parece uniformemente coberta por aglomerados de grãos provavelmente da tirosinase, identificados na Figura 19 (C) pelas setas azuis. Alguns flocos de grafite, identificados pelos círculos vermelhos, que são visíveis nos outros eletrodos desapareceram na superfície do biossensor, sendo recobertos pela camada enzimática. Algumas fissuras devido à evaporação do solvente são visíveis na presença do polímero, são identificadas pelas setas amarelas. A Figura 19 (D) mostra o perfil de rugosidade da superfície obtido a partir de uma secção da imagem, realizado através da análise das imagens pelo software Fiji ImageJ, para o biossensor (iii) o aspecto é ligeiramente mais liso e regular.

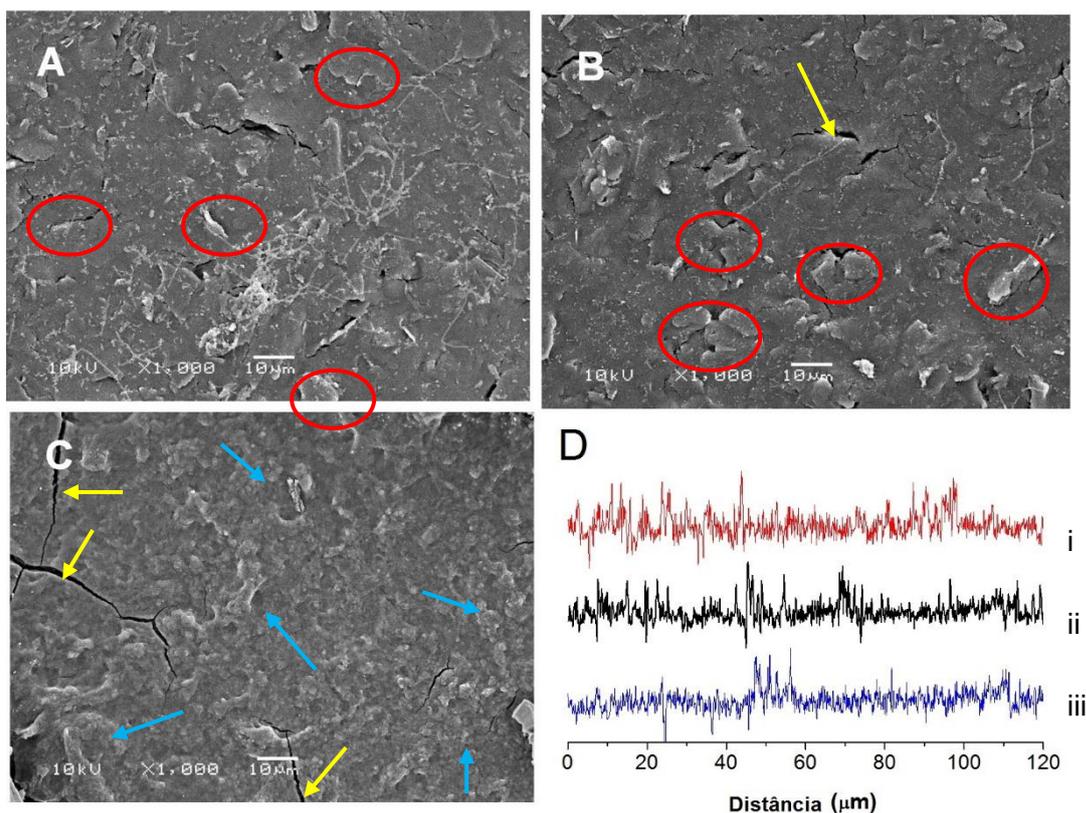
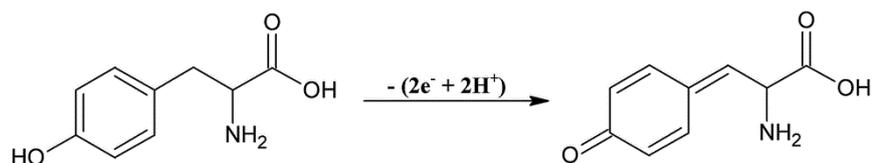


Figura 19. Imagens de MEV da superfície dos eletrodos (A) AuNPs/SPE, (B) Nafion/AuNPs/SPE e (C) Nafion/Tyr/AuNPs/SPE. (D) Perfil de linha de uma área superficial dos eletrodos modificados (i) AuNPs/SPE, (ii) Nafion/AuNPs/SPE e (iii) Nafion/Tyr/AuNPs/SPE.

4.2.2 Caracterização eletroquímica do biossensor

Primeiramente, foi testado o uso da tirosina como substrato da tirosinase. Voltamogramas cíclicos foram registrados fazendo a varredura de potencial de + 0,20 V à + 0,56 V na presença de $7,39 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ de tirosina. Foi observado um pico anódico irreversível bem definido em 0,45 V como mostra a Figura 20. No mesmo gráfico é apresentada a resposta do eletrodo SPE sem modificar para fins comparativos. De acordo com a literatura, o sinal observado corresponde à oxidação da tirosina através da reação descrita a seguir ⁷⁵.



Eq. 12

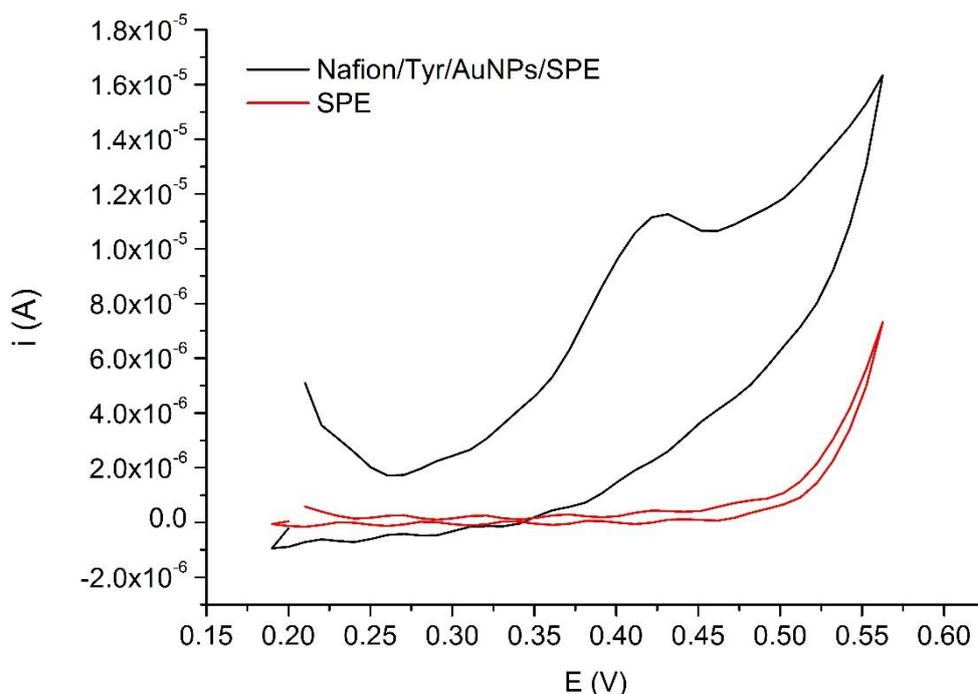


Figura 20. Voltamogramas cíclicos com o biossensor Nafion/Tyr/AuNPs/SPE (linha preta) e SPE (linha vermelha) na presença de $7,39 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de tirosina. Solução eletrolítica: TF $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH=7,3. Velocidade de varredura: 20 mV s^{-1} .

Na Figura 21 são apresentados os voltamogramas cíclicos, realizados na mesma faixa de potencial do experimento apresentado na Figura 20, utilizando o biossensor Nafion/Tyr/AuNPs/SPE em que primeiramente foi realizado na solução branco de TF $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ e depois com sucessivas adições de solução de tirosina $0,05 \text{ mol L}^{-1}$. Mediante estes voltamogramas cíclicos foi possível observar que o pico de oxidação da tirosina sofre um leve deslocamento do potencial do pico de oxidação em função do aumento da concentração de tirosina, variando de $+0,427 \text{ V}$ a $+0,469 \text{ V}$ nas concentrações de $4,95 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ e $1,46 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, respectivamente.

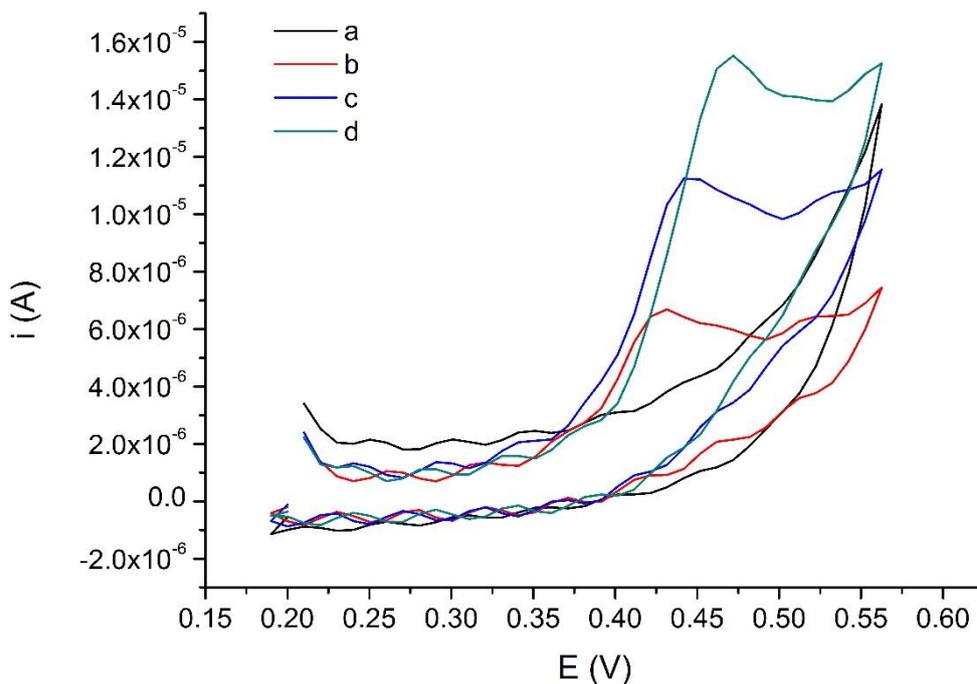


Figura 21. Voltamogramas cíclicos do biossensor (a) em branco, na presença de (b) $4,95 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, (c) $9,80 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ e (d) $1,46 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de tirosina. Solução eletrolítica: TF $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH=7,3. Velocidade de varredura: 20 mV s^{-1} .

Sabendo do comportamento eletroquímico da tirosina sobre o biossensor, realizou-se o teste de inibição enzimática pela adenosina. O experimento consistiu na adição de alíquotas de solução de adenosina $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ em solução eletrolítica de TF $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ contendo $1,46 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de tirosina. Como pode ser observado na Figura 22 (A), a adição de adenosina não provocou grande diferença na intensidade de corrente. Contudo, apresentou um deslocamento do potencial de pico anódico de cerca de 60 mV no sentido negativo.

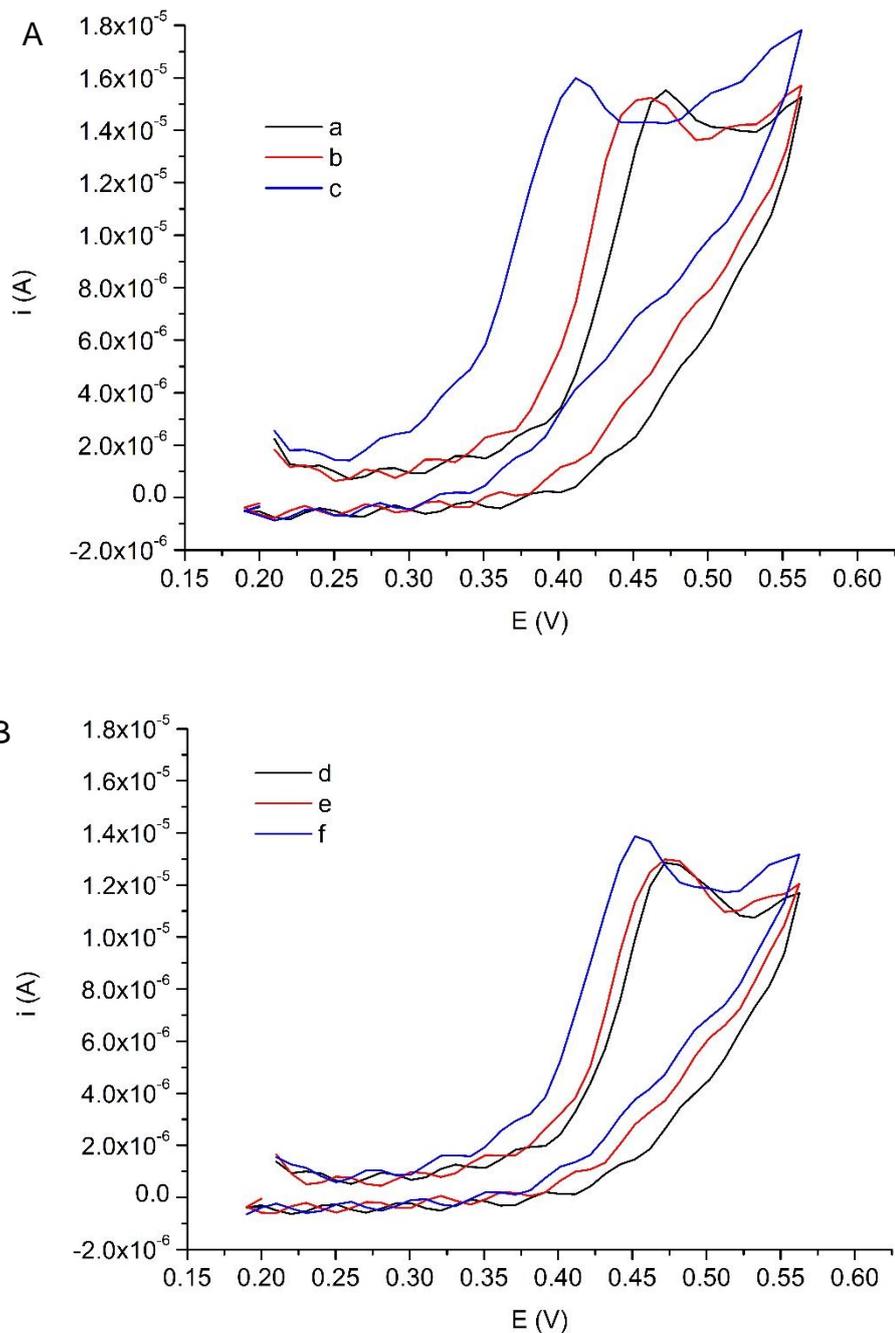


Figura 22. A) Voltamogramas cíclicos do biossensor na presença de $1,46 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de tirosina (a) e após adição de $1,90 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ (b) e $2,83 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de adenosina (c). B) Voltamogramas cíclicos na presença de $1,46 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de tirosina (a) e após adição de $1,90 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ (b) e $2,83 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ de NH_4OH (c). Solução eletrolítica: TF $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH=7,3. Velocidade de varredura: 20 mV s^{-1} .

Visto que a oxidação envolve a transferência de prótons, foi investigada a influência da adição de base neste deslocamento de potencial, pois a

adenosina foi preparada em solução de hidróxido de amônio $1,0 \text{ mol L}^{-1}$. Os voltamogramas cíclicos foram registrados nas mesmas condições do experimento anterior, mesma concentração de tirosina, porém, ao invés de adicionar alíquotas da solução de adenosina, foram adicionadas as mesmas alíquotas de solução de hidróxido de amônio $1,0 \text{ mol L}^{-1}$, pois foi a concentração de hidróxido de amônio utilizada para dissolver a adenosina. A Figura 22 (B) apresenta os voltamogramas cíclicos de $1,46 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de tirosina e após adições de $1,90 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ e $2,83 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ de NH_4OH . Neste experimento, também foi observado um deslocamento do pico de potencial de oxidação no sentido negativo, porém menor do que no caso da adenosina, aproximadamente 22 mV. Portanto, o aumento de concentração de base na solução eletrolítica influencia o comportamento eletroquímico da tirosina, porém não foi possível verificar o comportamento de inibição sobre a enzima causada pela adenosina, neste caso.

Em uma segunda etapa, o catecol foi escolhido para ser utilizado como substrato. O catecol é oxidado enzimaticamente pela tirosinase, produzindo a o-quinona, que é reduzida eletroquimicamente de volta ao catecol na superfície do eletrodo, como representado na Figura 23 (B). Desta forma, é possível relacionar a quantidade de o-quinona reduzida com a quantidade de catecol presente na solução. Além disso, o catecol pode ser oxidado de volta à o-quinona eletroquimicamente fazendo a varredura no sentido inverso, tal como mostra o voltamograma da Figura 23 (A).

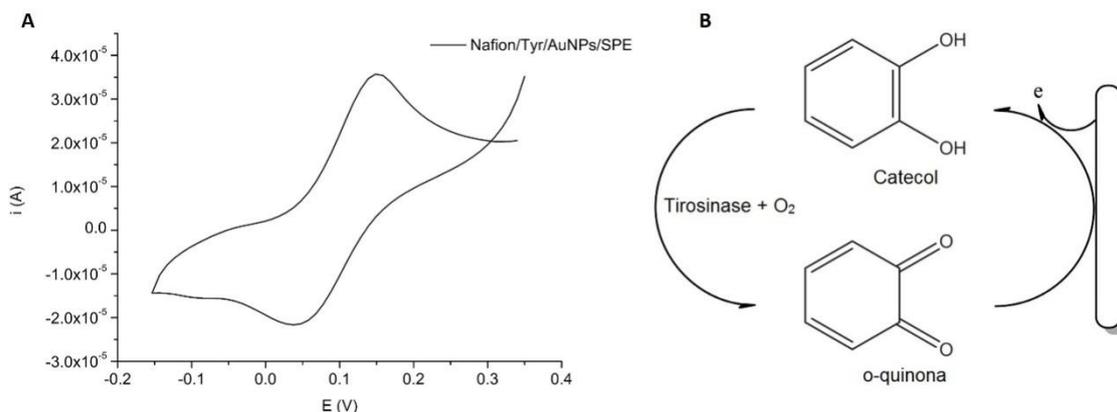


Figura 23. A) Voltamograma cíclico da redução da o-quinona e oxidação do catecol sobre a superfície do biossensor. B) Ilustração do mecanismo de oxidação enzimática do catecol a o-quinona e redução eletroquímica da o-quinona na superfície do eletrodo.

Para fins comparativos, foi investigado o comportamento eletroquímico dos sensores SPE e AuNPs/SPE na presença de catecol, em solução eletrolítica de tampão fosfato pH 7,3. Os voltamogramas são apresentados na Figura 24, nos quais a varredura foi realizada na faixa de potenciais de + 0,35 V a - 0,15 V à 20 mV s^{-1} com uma concentração fixa de $7,38 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de catecol. Os picos catódicos correspondentes à redução da o-quinona aparecem em + 0,0400 V, + 0,0157 V e + 0,0413 V para Nafion/Tyr/AuNPs/SPE, AuNPs/SPE e SPE, respectivamente. Seguindo essa mesma ordem, a oxidação do catecol teve lugar em + 0,151 V, + 0,126 V e + 0,182 V.

Com esses dados foi calculado o valor do ΔE_p (diferença dos potenciais anódico e catódico). Um parâmetro importante que diz respeito a reversibilidade do sistema. O valor encontrado para Nafion/Tyr/AuNPs/SPE e AuNPs/SPE foi de 0,111 V e para o eletrodo SPE foi de 0,141 V, estes dados indicam que as nanopartículas de ouro tornam o sistema um pouco mais reversível do que o eletrodo não modificado. O grande diferencial entre os eletrodos e o biossensor é a intensidade de corrente obtida como resposta, tanto na redução da o-quinona como na oxidação do catecol, na qual o biossensor apresenta maior resposta.

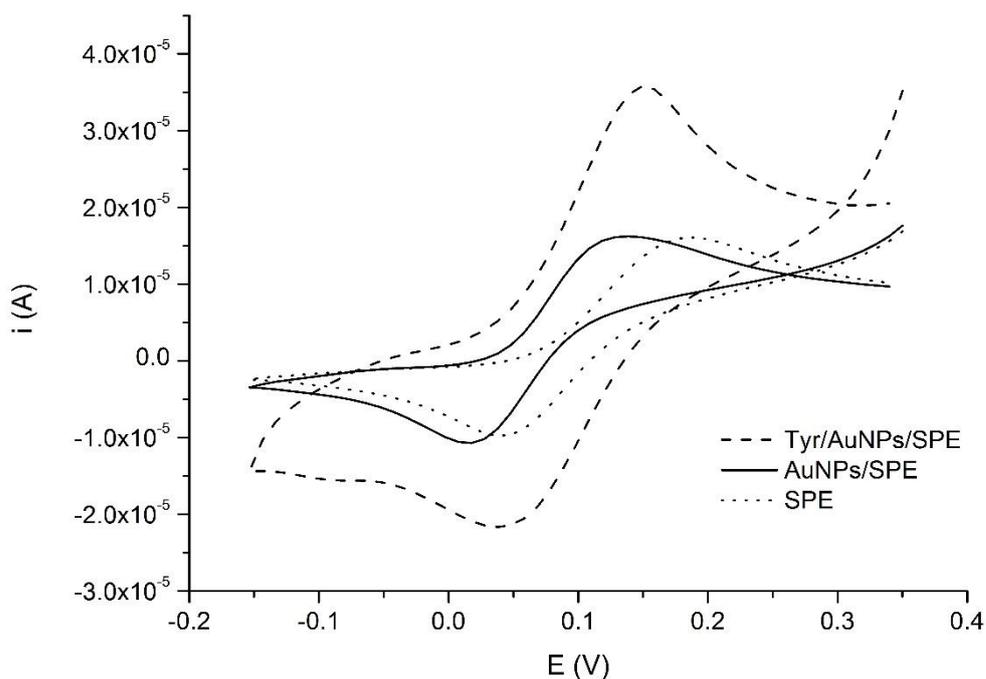


Figura 24. Voltamograma cíclico de $7,38 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de catecol, em solução eletrolítica de tampão fosfato $\text{pH}=7.3$, com o biossensor Nafion/Tyr/AuNPs/SPE, e com os sensores AuNPs/SPE e SPE. Velocidade de varredura: 20 mV s^{-1} .

Na etapa seguinte, foi estudada a possível inibição da atividade da tirosinase pela adenosina, com o intuito de fazer sua determinação por inibição enzimática. Há relatos na literatura que a adenosina pode atuar como inibidor desta enzima. Por exemplo, foi demonstrada a inibição da tirosinase com extrato de pepino do mar do Extremo Oriente (*Stichopus japonicas*)⁷⁶ Através do fracionamento guiado por bioatividade, identificou-se etil- α -D-glucopiranosídeo (valor IC_{50} de $0,19 \text{ mg/mL}$) e adenosina (valor IC_{50} de $0,13 \text{ mg/mL}$) como constituintes bioativos⁷⁷. A análise cinética revelou que os extratos são inibidores reversíveis e de tipo misto⁷⁷.

Na Figura 25 são apresentados voltamogramas cíclicos registrados na presença de $7,38 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de catecol e após a adição de $2,17 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de adenosina no Nafion/Tyr/AuNPs/SPE e SPE, observou-se uma diminuição da corrente dos picos catódico e anódico, no caso do pico catódico poderia

estar ocorrendo a inibição, pois se houvesse inibição a enzima produziria menos o-quinona, então o pico catódico seria menor.

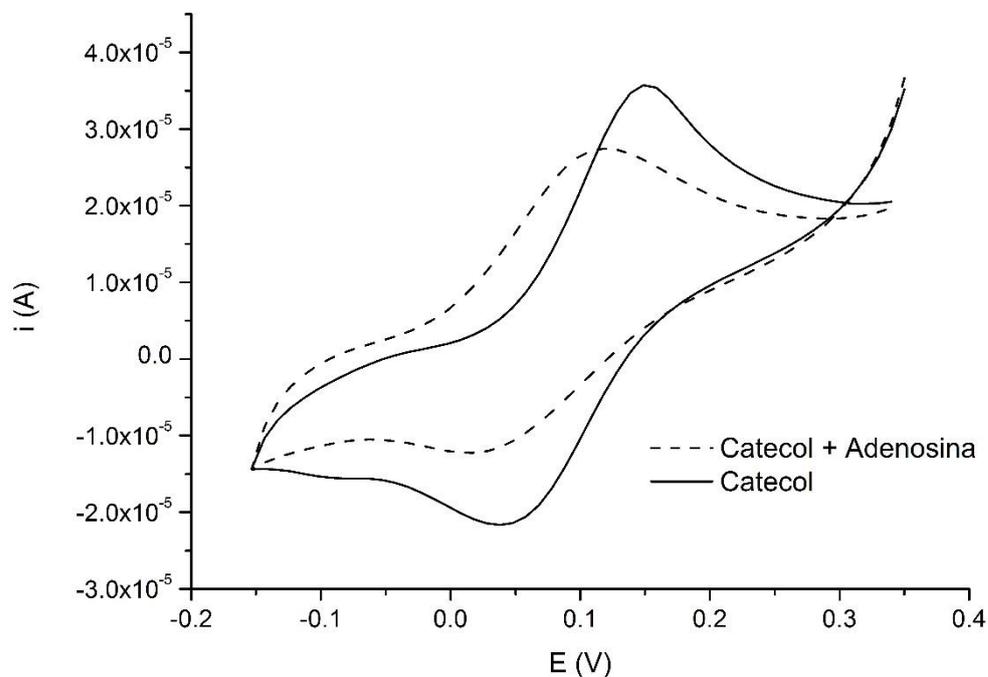


Figura 25. Voltamograma cíclico de $7,38 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de catecol (linha sólida) e após a adição de $2,17 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de adenosina (linha tracejada), em solução eletrolítica de tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ $\text{pH} = 7,3$, com o biossensor Nafion/Tyr/AuNPs/SPE. Velocidade de varredura: 20 mV s^{-1} .

Na Figura 26, mostra-se o mesmo experimento, porém utilizando o sensor SPE, pode-se ver que o pico catódico desaparece quando a adenosina é adicionada à solução, enquanto mantém a corrente de pico anódico. Como não há a presença de enzima neste sensor, suspeitou-se que a adenosina poderia estar reagindo com o catecol ou com a o-quinona formada pela auto-oxidação do catecol, o que foi posteriormente investigado através do estudo por espectroscopia de absorção no UV-Vis.

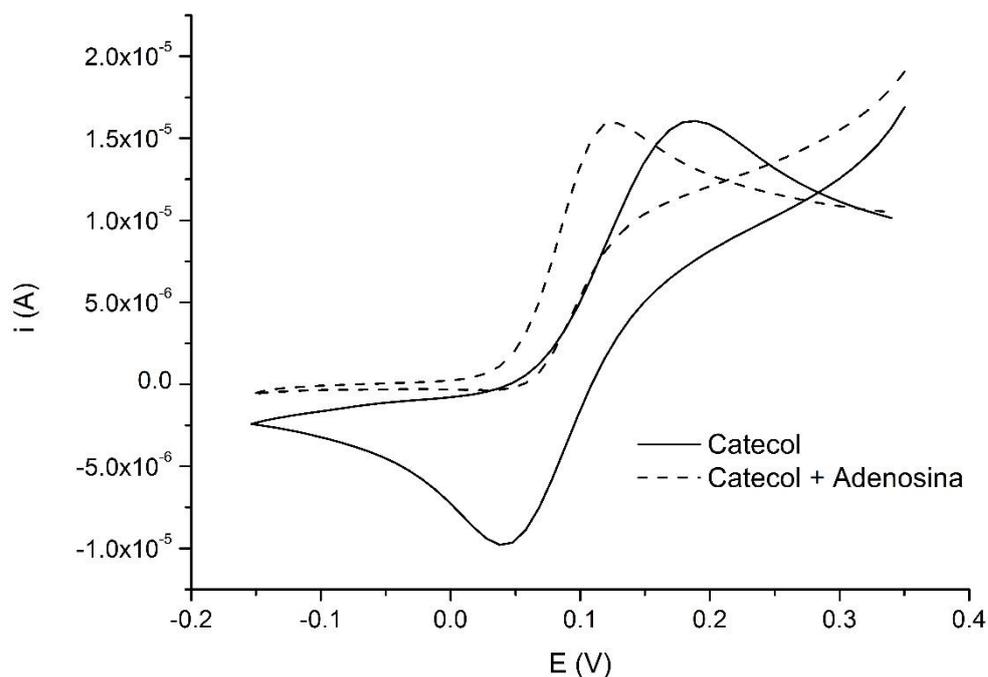


Figura 26. Voltamograma cíclico de $7,38 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de catecol (linha sólida) e após a adição de $2,17 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de adenosina (linha tracejada), em solução eletrolítica de tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ $\text{pH} = 7,3$, com o sensor SPE. Velocidade de varredura: 20 mV s^{-1} .

Embora esta reação entre a *o*-quinona ou o catecol e a adenosina não tenha sido prevista, na literatura já foi observada e estudada a reação entre catecóis ou *o*-quinonas e bases purínicas como adenina ou nucleotídeos como adenosina via adições de Michael. Zahid et al. ⁷⁸ estudaram a formação de um aduto entre a quinona formada da dopamina e adenina, Figura 27 (A), esta reação pode ocorrer no sistema biológico o que significa que pode ser formado um aduto de quinona de dopamina-DNA, o qual pode levar a doenças neurodegenerativas como a doença de Parkinson. Zhang e Gross ⁷⁹ estudaram as reações entre quinonas de estrógeno-catecol e adenina, Figura 27 (B), pois vários tipos de câncer podem ser conduzidos por estrogênios que são metabolizados a quinonas ativas e podem modificar o DNA. Mu et al. ⁸⁰ empregaram esta reação entre adenosina e dopamina, Figura 27 (C), para desenvolver um sensor fluorescente para a dopamina.

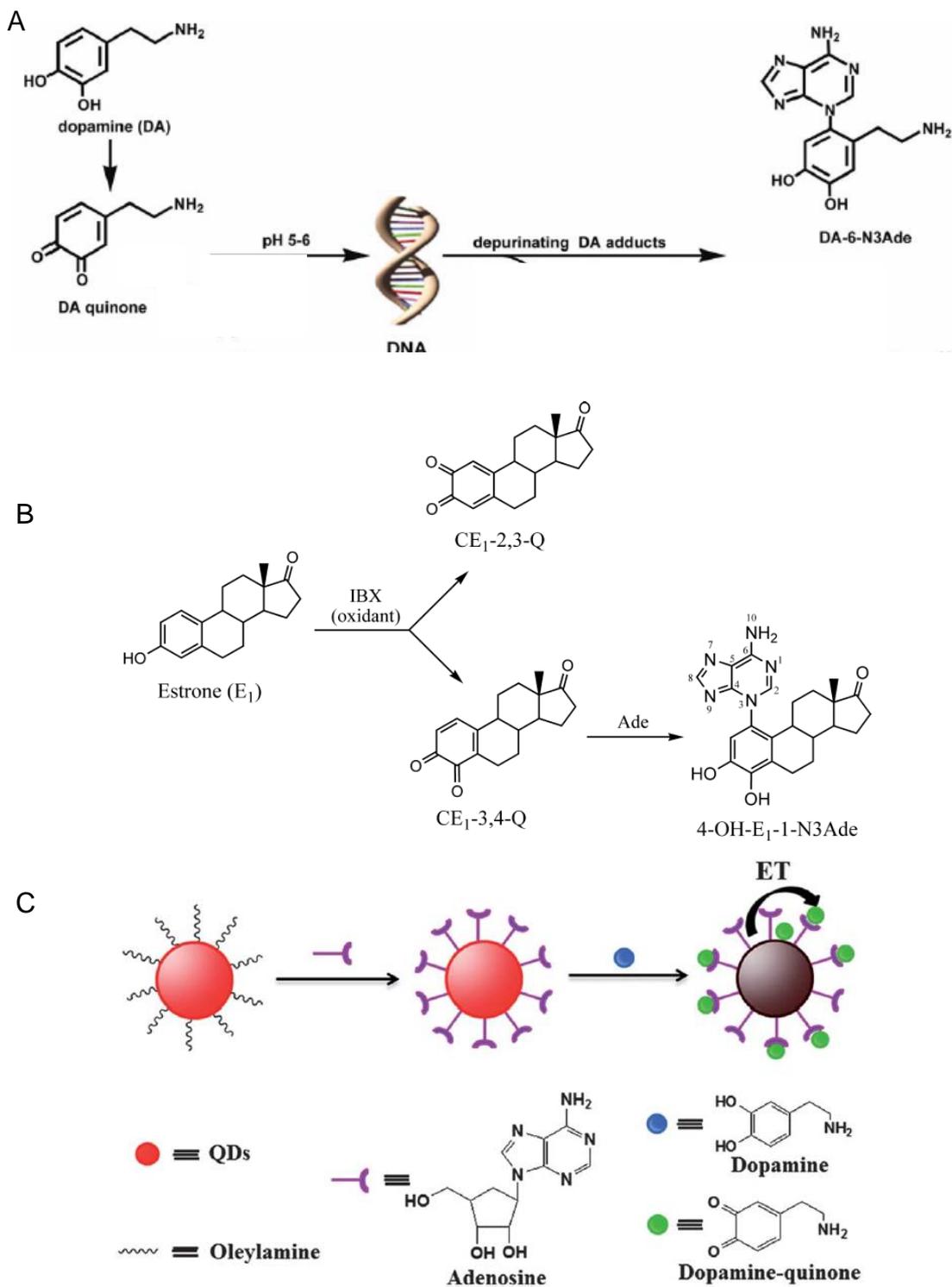


Figura 27. Exemplos de adutos formados por o-quinonas e adenina ou adenosina, em A) aduto formado pela dopamina o-quinona e pela adenina da Ref. 69, em B) aduto formado pelo estrógeno-catecol e adenina da Ref. 70 e em C) a ligação formada pela dopamina o-quinona e adenosina da Ref. 71.

4.2.3 Determinação da constante cinética de Michaelis-Menten da tirosinase imobilizada

O processo de imobilização pode causar a perda total ou parcial da atividade enzimática e modificar a cinética enzimática. A constante de Michaelis-Menten expressa a concentração de substrato necessária para obter a metade da saturação da enzima. Para o biossensor Nafion/Tyr/AuNPs/SPE, a cinética do tipo Michaelis-Menten foi avaliada utilizando catecol como substrato.

A velocidade de reação depende da concentração inicial do substrato, e neste caso, pode-se presumir ser proporcional à corrente de redução da o-quinona. A voltametria de pulso diferencial (VPD) foi escolhida para executar este estudo por ser uma técnica mais sensível. Na Figura 28 (A) são apresentados os voltamogramas de pulso diferencial registrados primeiramente na solução branco e seguido pelas adições sucessiva de catecol, variando a concentração de 5×10^{-5} a $4,55 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹. Os acréscimos na corrente são proporcionais à concentração do catecol até atingir o platô de saturação enzimática. O mesmo experimento foi repetido, na presença de $1,45 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹ adenosina, como mostra a Figura 28 (B). Neste segundo experimento, é possível observar que a linha base do branco (linha preta) registrada inicialmente, diminui significativamente na presença da adenosina (linha preta pontilhada). Os acréscimos na corrente também são menores quando comparado ao experimento na ausência da adenosina.

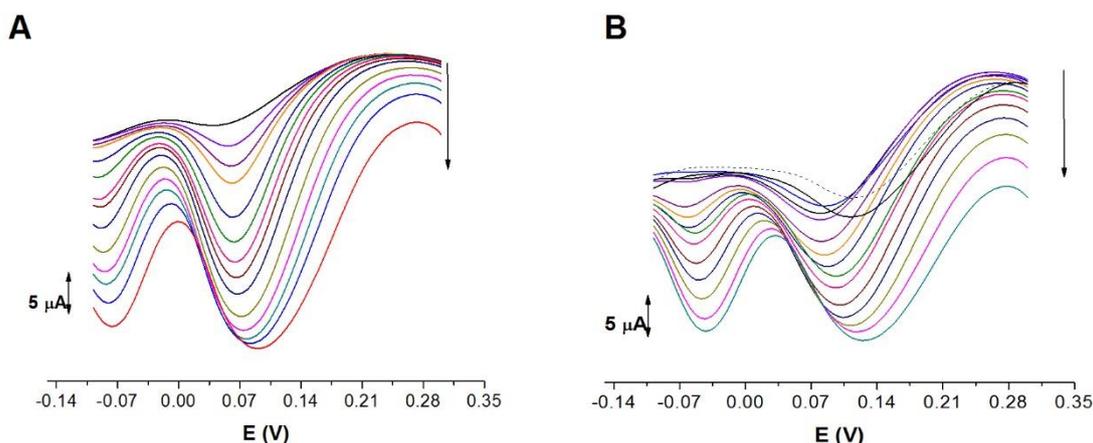


Figura 28. A) Voltamogramas de Pulso Diferencial registrados na solução branco e após sucessivas adições de catecol para a construção da curva cinética. B) Voltamogramas registrados na solução branco (linha preta), após adição de adenosina (linha tracejada) e após sucessivas adições de catecol.

Deste modo, a relação entre a concentração do catecol e a corrente permitiu a obtenção da curva cinética do tipo Michaelis-Menten, representada na Figura 29 (A). Neste gráfico o platô de saturação representa a velocidade máxima da reação enzimática, V_{\max} . Para calcular a constante aparente de Michaelis-Menten (K_m^{app}) e o valor de V_{\max} foi construída a curva de Lineweaver-Burk, que relaciona o recíproco da corrente em função do recíproco da concentração do substrato. A relação linear de $1/i$ versus $1/[catecol]$ é mostrado na Figura 29 (B), onde o coeficiente angular é igual ao K_m/V_{\max} , o intercepto do eixo y é igual a $1/V_{\max}$, e o intercepto no eixo x é igual a $-1/K_m$. No estudo cinético na ausência do inibidor foi obtida a seguinte relação: $1/i = 32240,65 + 16,12 (1/[mol L^{-1}])$, $R^2 = 0,9996$. No experimento na presença de adenosina foi obtida a seguinte equação da reta: $1/i = 53985,29 + 27,06 (1/[mol L^{-1}])$, $R^2 = 0,9893$. A partir desses dados, a velocidade máxima foi calculada como sendo $V_{\max} = 3,10 \times 10^{-5} \text{ mol/cm s}$ para a cinética normal e $V_{\max} = 1,85 \times 10^{-5} \text{ mol/cm s}$ na presença da adenosina. Obteve-se $K_m^{app} = 5,00 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, este valor é semelhante a outros biossensores de tirosinase relatados na literatura, como pode ser visto na Tabela II. Na presença da adenosina, o K_m^{app} calculado foi muito similar ao obtido no experimento normal, $K_m^{app} = 5,01 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$. Portanto, pela comparação da forma do gráfico da cinética enzimática na ausência e na presença da adenosina e pelas

constantes de Michaelis-Menten aparente calculadas possuírem o mesmo valor, chega-se a conclusão de que a adenosina é um inibidor da tirosinase do tipo não-competitivo.

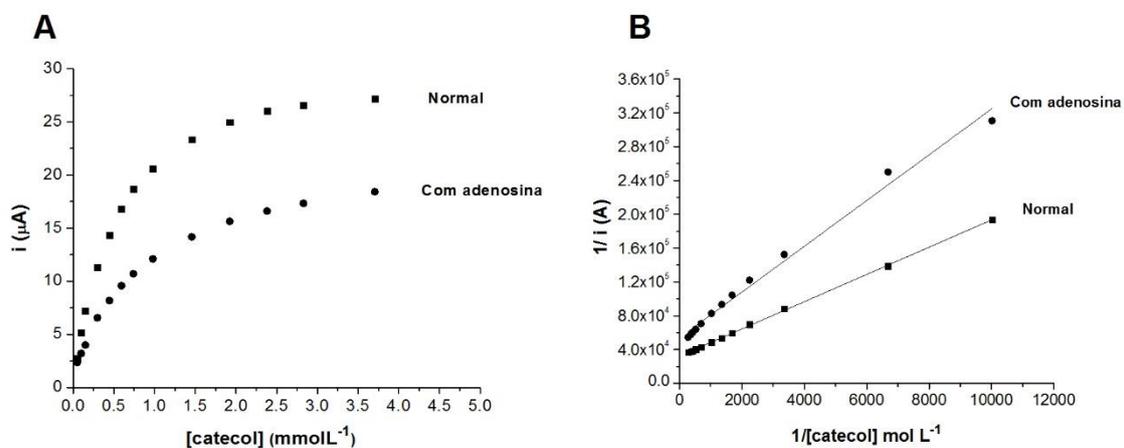


Figura 29. A) Curva cinética de Michaelis-Menten com o substrato catecol na ausência (normal) e na presença da adenosina. B) Gráfico de Lineweaver-Burk das duas curvas.

Mais estudos precisam ser realizados para determinar se a inibição é reversível ou não e avaliar a possibilidade de explorar esta inibição para fins analíticos na determinação da adenosina.

Tabela III. Comparação da constante aparente de Michaelis-Menten para catecol com diferentes biossensores de tirosinase.

Biossensor	K_m^{app} (mol L⁻¹)	Referências
Tyr-nAu-GCE	$1,2 \times 10^{-4}$	81
Tyr-AuNPs-DHP/GCE	$2,0 \times 10^{-4}$	48
IDE/PEDOT-CNT-Ty-GAD	$1,81 \times 10^{-5}$	49
Tyr/Dex-Au-Sil-rGO/GCE	$5,7 \times 10^{-6}$	82
Tyr-MPA-AuE	$3,35 \times 10^{-4}$	46
Graphite-Teflon-tirosinase compósito	$0,7 \times 10^{-4}$	45
Graphite-Teflon-tirosinase compósito	$4,99 \times 10^{-5}$	83
Graphite-EPD-tirosinase compósito	$5,63 \times 10^{-5}$	83
RVC- resina epoxy-tirosinase compósito	$2,0 \times 10^{-4}$	83

4.2.4 Estabilidade do biossensor

Foi realizada uma avaliação para verificar a estabilidade do biossensor Nafion/Tyr/AuNPs/SPE de acordo com seu tempo de vida útil e também em função do tipo de armazenamento utilizado. Foram escolhidos dois tipos de armazenamento, imerso em solução tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ a pH = 7,3 e o outro seco, ambos sendo refrigerados a 2 °C. A avaliação foi realizada medindo uma concentração fixa de catecol, 5 × 10⁻⁵ mol L⁻¹, pela técnica de voltametria de pulso diferencial durante um período total de 45 dias.

Para melhor avaliar a resposta do biossensor durante esse intervalo de tempo, foram construídas cartas de controle. As mesmas consistem em um gráfico sequencial de alguma característica que é utilizada como critério de qualidade a fim de fazer a sua monitoração. A carta também mostra os limites estatísticos da variação que são permissíveis para a característica que está sendo medida. É possível determinar se as medidas em dias consecutivos estão dentro de certos limites do valor do padrão. Esses limites são chamados limite superior de controle e limite inferior de controle, os quais representam três desvios padrão para cada lado da média e formam uma faixa na qual espera-se que o valor medido esteja contido em 99,7% das vezes. A grande vantagem de utilizar a carta de controle é que desvios sistemáticos em relação à média são relativamente fáceis de observar em uma carta de controle ⁶⁷.

No primeiro dia de trabalho, foi realizado um conjunto de 10 medidas e a média destas medições foi definida como a resposta média da carta de controle. Os limites superior e inferior de controle foram estabelecidos sendo 3 vezes o desvio padrão somado/subtraído da média. Nos dias seguintes, as medições foram realizadas em triplicata. O valor médio é mostrado na Figura 30, cada um correspondendo ao armazenamento seco (A) e em solução de tampão fosfato (B), respectivamente.

No caso do biossensor armazenado na solução de tampão fosfato, (B), houve apenas dois casos abaixo do limite inferior de controle entre o décimo e o vigésimo dia de vida. No outro caso, o biossensor foi armazenado seco, (A), mostrou ser estável ao longo de 45 dias de tempo de vida. O fato interessante

que pode ser observado ao comparar a resposta entre as duas formas de armazenamento é que a resposta em corrente do biossensor armazenado seco é significativamente menor do que a armazenada em tampão fosfato. Isto justifica o armazenamento com o biossensor imerso em solução de tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$.

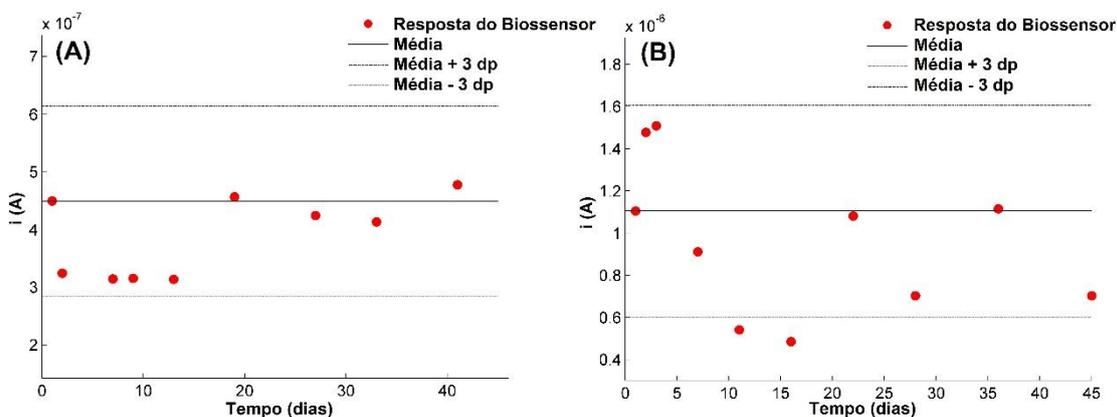


Figura 30. Cartas de controle da resposta a $5 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ de catecol do biossensor Nafion/Tyr/AuNPs/SPE armazenado (A) seco e (B) imerso em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH= 7,3.

4.3 Determinação direta de adenosina por eletro-oxidação

A adenosina pode ser determinada através da eletro-oxidação, como já estudado por Goyal et al.⁸⁴, através da perda de 6 elétrons e 6 prótons como pode ser observado na Figura 31. Em outro estudo, Goyal et al.⁸⁵ utilizaram várias técnicas, como espectroscopia de absorção molecular no UV-Vis, CLAE e GC-MS, para identificar os produtos gerados sobre o eletrodo de grafite pirolítico. Foram identificados quatro produtos da eletro-oxidação, a formação de alantoína, dímeros C-O-O-C e C-C e a ribose.

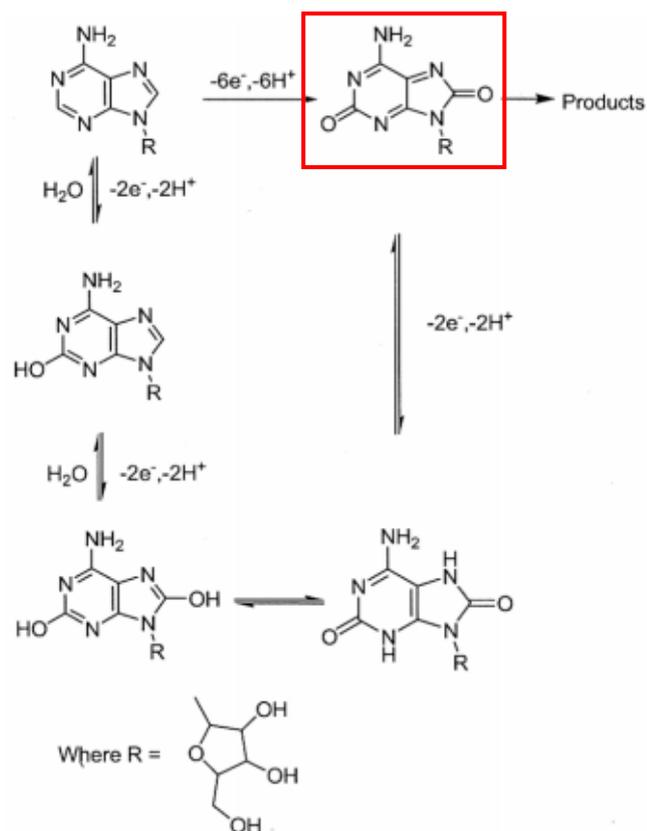


Figura 31. Mecanismo de eletro-oxidação da adenosina (reproduzido da Ref. 84).

A Figura 32 (A) apresenta os voltamogramas cíclicos da eletrooxidação de adenosina sobre o eletrodo SPE e AuNPs/SPE. Picos irreversíveis e pouco definidos aparecem em ambos os casos; Contudo, o potencial de pico de oxidação da adenosina em AuNPs/SPE desloca-se para um valor menos positivo (quase 200 mV) em comparação com o SPE não modificado. Aparentemente, a presença de AuNPs facilita a transferência de elétrons na superfície do eletrodo de carbono.

Investigou-se o perfil voltamétrico da eletrooxidação da adenosina no biossensor Nafion/Tyr/AuNPs/SPE. Como mostrado na Figura 33 (B), não foi evidente a presença de picos de oxidação e redução. Contudo, foi possível observar que há um aumento na corrente de oxidação, entre 0,8 e 1,2 V, na presença da adenosina em comparação com o voltamograma na solução do branco.

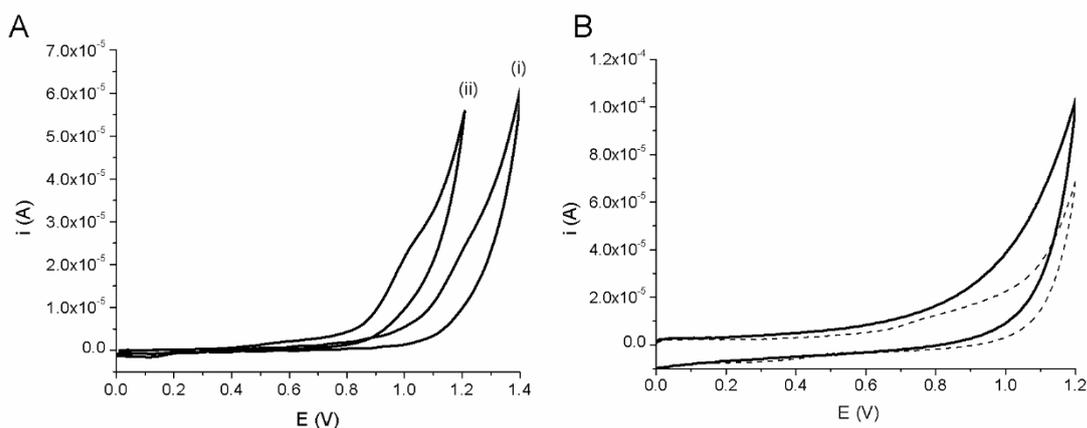


Figura 32. A) Voltamogramas cíclicos mostrando a eletro-oxidação da adenosina sobre o eletrodo SPE (i) e AuNPs/SPE (ii). B) Voltamogramas cíclicos registrados na ausência (linha tracejada) e na presença de adenosina (linha contínua) sobre o biossensor Nafion/Tyr/AuNPs/SPE. $[adenosina] = 1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$.

Devido a ausência de um pico de oxidação da adenosina sobre o biossensor Nafion/Tyr/AuNPs/SPE, a técnica de cronoamperometria foi mais adequada para a determinação da adenosina. Nesta técnica não é necessário realizar uma varredura de potencial, pois a corrente, proporcional à concentração do analito, é gerada mantendo fixo um valor de potencial. O experimento foi realizado fazendo-se adições sucessivas de adenosina na solução de tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ sob agitação constante, aplicando-se um potencial de $1,0 \text{ V}$. A Figura 33 ilustra os gráficos típicos em formato de escada para SPE, AuNPs/SPE, Nafion/AuNPs/SPE e Nafion/Tyr/AuNPs/SPE. A presença das AuNPs já melhorou a sensibilidade do sensor SPE. No entanto, o biossensor exibe um desempenho significativamente maior. É difícil afirmar que ocorre uma reação enzimática por trás dessa melhoria, mas a presença da enzima de alguma forma favorece a resposta do biossensor.

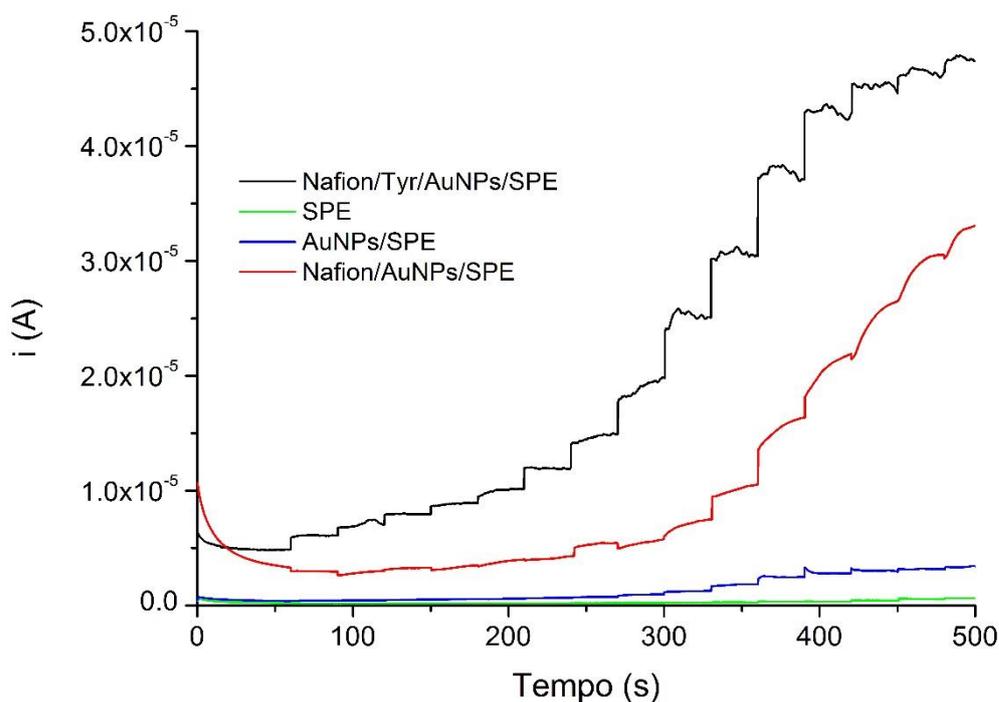


Figura 33. Cronoamperogramas dos sensores SPE, AuNPs/SPE, Nafion/AuNPs/SPE e o biossensor Nafion/Tyr/AuNPs/SPE obtidos pelo aumento da concentração de adenosina em solução de tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ contendo $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ KCl, $\text{pH}=7.3$, $E_{ap}= +1,0 \text{ V}$.

O incremento da corrente pela adição crescente da concentração da adenosina, como pode ser observado nos cronamperogramas apresentados na Figura 34 (A), permitiu a construção da curva de calibração para adenosina com o biossensor Nafion/Tyr/AuNPs/SPE. Observou-se um comportamento linear em duas faixas de concentração, sendo de $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ até $5,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ a primeira e de $6,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ a $1,2 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ a segunda, como mostrado na Figura 34 (B). As equações das curvas de calibração são $i \text{ (A)} = 5,61 \times 10^{-6} + 0,0945 \times [\text{adenosina (mol L}^{-1})]$ $R^2 = 0,8687$ para a primeira faixa linear e $i \text{ (A)} = - 1,74 \times 10^{-5} + 0,48317 \times [\text{adenosina (mol L}^{-1})]$ $R^2 = 0,9524$ para a segunda faixa linear.

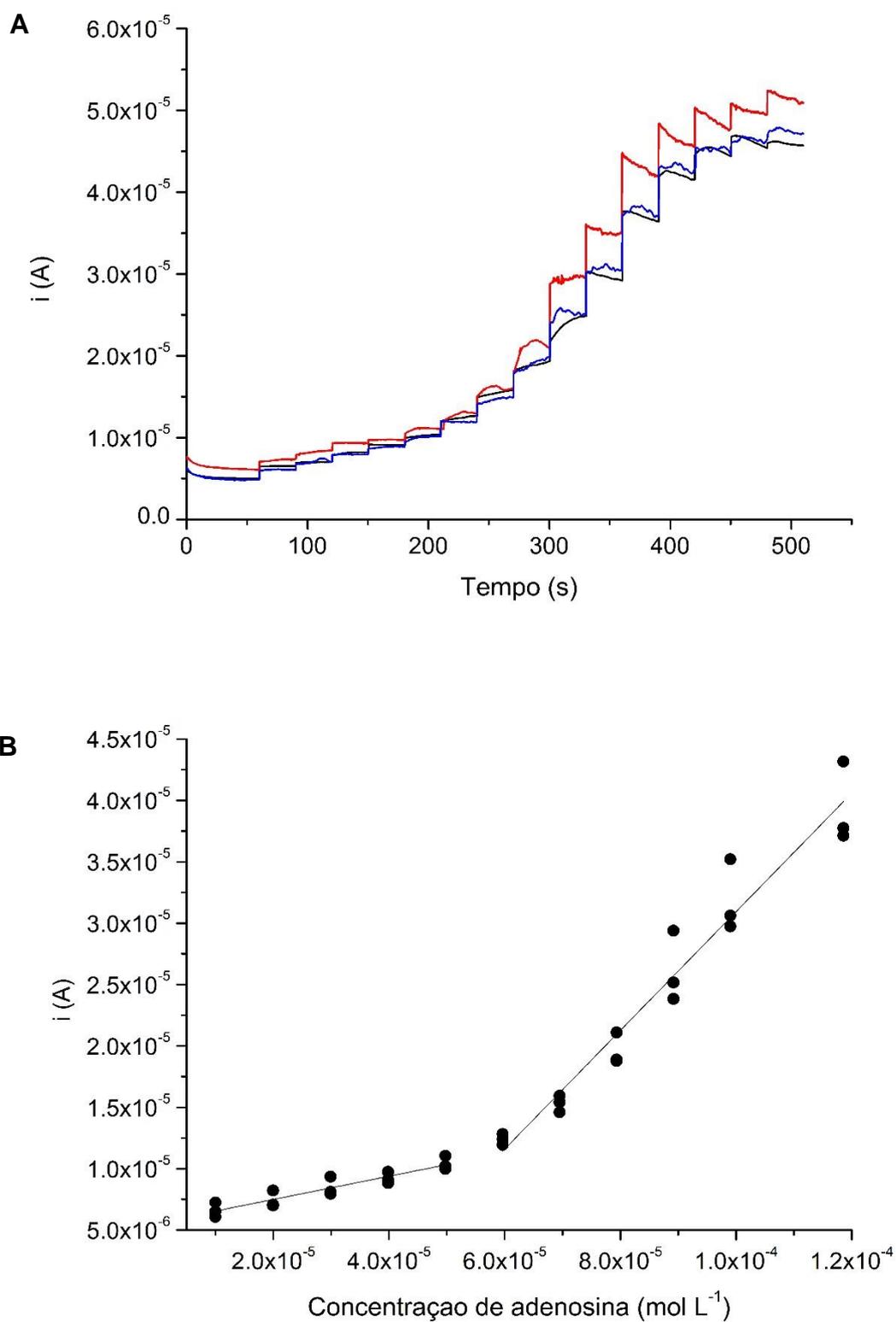


Figura 34. A) Triplicata dos cronoamperogramas da adenosina realizados com o Nafion/Tyr/AuNPs/SPE. B) Curva de calibração para adenosina com o Nafion/Tyr/AuNPs/SPE.

A linearidade das duas curvas de calibração foi analisada de acordo com a metodologia de uma série de testes estatísticos proposta por Souza e Junqueira ⁸⁶. A normalidade dos resíduos foi verificada pelo teste de Ryan-Joiner com um intervalo de confiança de 99% e os resíduos das duas regressões seguem a normalidade. O teste de Levene modificado por Brown e Forsythe comprovou que existe homocedasticidade para as duas curvas de calibração. Foi avaliada a independência dos resíduos segundo o teste de Durbin-Watson, através deste foi constatado que não há autocorrelação com $p > 0,1$ para as duas curvas de calibração. A falta de ajuste e a significância de regressão foram avaliadas pela ANOVA e as duas curvas de calibração têm as regressões significativas com $p < 0,001$ e não há desvio da linearidade com $p > 0,05$.

O limite de detecção (LD) foi calculado como 3 vezes o desvio padrão de 10 medições de branco mais a média dividido pelo coeficiente angular da curva, LD é $7,0 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$. Na Tabela IV, foi feita uma comparação do limite de detecção e da faixa linear de outros métodos analíticos, inclusive sensores eletroquímicos e biossensores, para a determinação da adenosina. Através desta comparação é possível observar que o limite de detecção deste biossensor proposto está na mesma faixa que LDs da Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Detector UV (CLAE-UV) e eletroforese capilar em gel com detecção de fluorescência induzida por laser (CGE-LIF), entretanto as vantagens deste biossensor eletroquímico frente a estes métodos analíticos são o baixo custo, a facilidade de fabricação e manipulação e a portabilidade. Ainda que os aptâmeros sejam muito sensíveis, podem atingir limites de detecção próximos da faixa de $10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$, a produção de um aptâmero específico é um pouco dispendiosa e não é uma fabricação simples e acessível. No entanto, sensores eletroquímicos e biossensores ^{9; 11; 12; 17; 20} tem atraído atenção no desenvolvimento do método de determinação de adenosina, pois oferecem rápida análise e resposta, fabricação barata e simples, além de poderem ser tão sensíveis como os aptâmeros. Embora o desempenho do biossensor seja similar a outros sensores eletroquímicos, o desenvolvimento do biossensor Nafion/Tyr/AuNPs/SPE é simples, rápido e fácil, apresenta boa

estabilidade e boa reprodutibilidade. Estes fatores que tornam o biossensor Nafion/Tyr/AuNPs/SPE um método alternativo viável com potencial para ser aplicado na análise da adenosina em fluidos biológicos, como sangue, plasma sanguíneo e urina.

Tabela IV. Comparação dos resultados do método proposto com outras técnicas de determinação da adenosina.

Método Analítico	Sistema de detecção	LD (mol L⁻¹)	Faixa linear (mol L⁻¹)	Ref.
CLAE	UV	0,1×10 ⁻⁶	(0,25 – 100,0)×10 ⁻⁶	8
AgNPs/ silicato com amina	UV-Vis	2,0×10 ⁻⁵	(2,0 – 14,0)×10 ⁻⁵	14
MNPs-aptassensor	ESI-IMS	7,50×10 ⁻⁸	(1,85 -185)×10 ⁻⁷	21
Aptassensor enzimático	CGE-LIF	8×10 ⁻⁶	(0,8 -7,0)×10 ⁻⁵	19
Tween 20-AuNPs/BODIPY - ATP	Fluorescência	6,0×10 ⁻⁸	(0,1 – 1,0)×10 ⁻⁶	22
Aptassensor Triplex DNA	Fluorescência	4,2×10 ⁻⁷	1,0×10 ⁻⁶ – 1,0×10 ⁻⁴	23
aptassensor	Fluorescência	5,0×10 ⁻⁸	5,0×10 ⁻⁸ – 2×10 ⁻⁶	15
Aptassensor com esfera magnética	CL	8×10 ⁻⁸	4×10 ⁻⁷ -1×10 ⁻⁵	13
GCE/ILs/MWCNTs/CHIT	DPV	1,50×10 ⁻¹⁰	(0,50 – 2,50)×10 ⁻⁹ (1,0 – 5,0)×10 ⁻⁸ (5,0 – 40,0)×10 ⁻⁸	18
Au/AuNPs/DNA aptassensor	CV	1,8×10 ⁻¹⁰	5,0×10 ⁻¹⁰ – 4,0×10 ⁻⁹	10
SWNT/ grafite pirólítico	SWV	0,51×10 ⁻⁷	0,5×10 ⁻⁶ – 1,0×10 ⁻³	11
Fulereno-C ₆₀ /GCE	DPV	3,02×10 ⁻⁷	0,5×10 ⁻⁶ – 1,0×10 ⁻³	9
AP-AuNPs filme/GCE	CA	5,1×10 ⁻⁸	2,0×10 ⁻⁷ -1,0×10 ⁻⁴	20
SWCNT/GCE	DPV	3,47×10 ⁻⁵	(1 – 100)×10 ⁻⁶	12
CTS-GR-ZrO ₂ /CILE	DPV	0,131×10 ⁻⁶	(0,4 – 20,0)×10 ⁻⁶ (20,0 – 360)×10 ⁻⁶	17
Au/ DNA aptassensor	DPV	1,0×10 ⁻⁸	(0,01-1)×10 ⁻⁶	18
Nafion/Tyr/AuNPs/SPE	CA	7,0×10 ⁻⁷	(1,0 – 5,0)×10 ⁻⁵ (6,0 – 12,0)×10 ⁻⁵	Este trabalho

CA – Cronoamperometria

CL – Quimiluminescência

CGE-LIF – Eletroforese Capilar em Gel com fluorescência induzida por laser

CV – Voltametria Cíclica

DPV – Voltametria de Pulso Diferencial

ESI-IMS – Espectrometria de mobilidade iônica com Ionização por electrospray

SWV – Voltametria por onda quadrada

4.4 Estudo por Espectroscopia de Absorção Molecular no UV-Vis

4.4.1 Estudo da interação entre catecol e adenosina

O objetivo deste estudo foi avaliar, através da técnica de espectroscopia de absorção molecular no UV-Vis, a possível interação entre os reagentes catecol e adenosina e conseqüentemente a formação do aduto catecol-adenosina, como já foi apresentado na Figura 27 no capítulo 4.2.2.

É importante salientar que o catecol sofre processos de oxidação em contato com o ar, fato que no início deste estudo era por nós desconhecido. O aparecimento de manchas escuras na bancada branca, recentemente pintada do laboratório, nos levou a suspeitar de fungos, porém isto foi descartado após análise microbiológica. A certeza de que as manchas provinham do catecol veio pela constatação de que elas só apareciam na proximidade da balança analítica, lugar onde eram preparadas as soluções. A balança foi trocada de lugar e as manchas acompanharam essa mudança. A solução de catecol em TF $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ adquire coloração amarelada com o tempo, sendo necessária a sua preparação em meio ácido.

Neste experimento, a solução $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ de catecol foi preparada em três meios distintos: em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH=7,3, ácido clorídrico $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ e em hidróxido de sódio $0,1 \text{ mol L}^{-1}$. Sendo assim, foram feitos os espectros de absorção destes reagentes, apresentados na Figura 35, a fim de tomá-los como o branco. O único reagente que apresentou absorção significativa no visível foi a solução de catecol em meio básico, os outros reagentes são incolores.

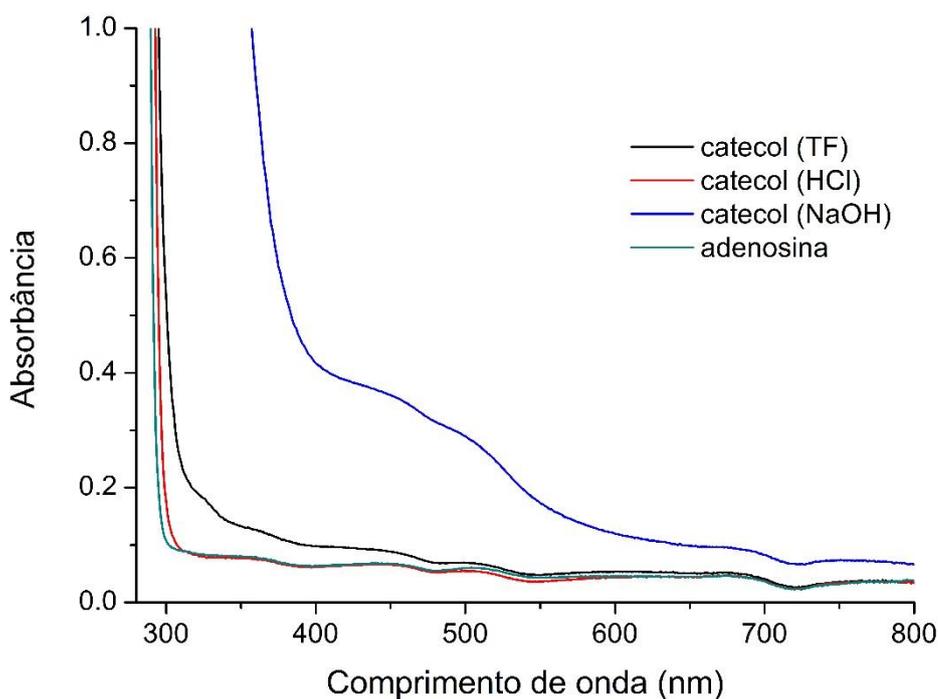


Figura 35. Espectros de absorção molecular no UV-Vis dos reagentes utilizados no estudo.

A Figura 36 (A) apresenta a sequência de espectros de absorção molecular no UV-Vis da mistura de catecol em meio tamponado (TF) pH= 7,3 e adenosina em função do tempo, conforme foi realizado o experimento. Foi possível observar desde o primeiro espectro obtido, imediatamente após terem sido misturados os reagentes, duas bandas bem evidentes em 330 nm e outra em 416 nm, as quais com o passar do tempo só aumentaram, a primeira mais rapidamente que a segunda. Aproximadamente em 15 minutos após o início da reação, foi possível observar o surgimento de um “ombro”, muito próximo da banda de 416 nm, em torno de 440 nm. Este “ombro” também foi aumentando de intensidade com o passar do tempo da reação. A fim de analisar melhor este aumento da banda em 416 nm em função do tempo de reação, foi plotado o gráfico de absorbância em 416 nm versus tempo de reação, conforme apresentado na Figura 36 (B). Este gráfico mostra que nos minutos iniciais ocorre um rápido aumento da intensidade de absorção, mas logo diminui ligeiramente sua intensidade e a seguir aumenta novamente linearmente até o final do experimento, totalizando duas horas de reação.

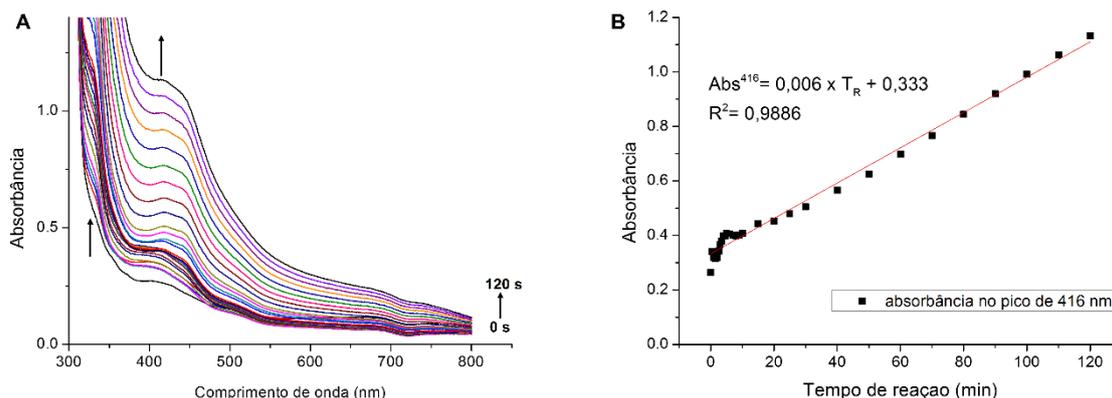


Figura 36. A) Espectro de absorção molecular no UV-Vis do catecol $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ em meio de tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ $\text{pH}= 7,3$ na presença de adenosina $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ em função do tempo. B) Gráfico de absorbância em 416 nm versus tempo de reação.

Os resultados do experimento realizado com catecol dissolvido em meio de ácido clorídrico $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ são apresentados na Figura 37 (A). Há semelhanças com os espectros obtidos com o catecol em pH neutro, porém houve um aumento significativamente maior do primeiro espectro para o segundo na banda observada em 416 nm. Além disso, o formato da banda em 416 nm aparece mais definido, porém também ocorre o surgimento do “ombro” em 440 nm após 10 minutos de reação.

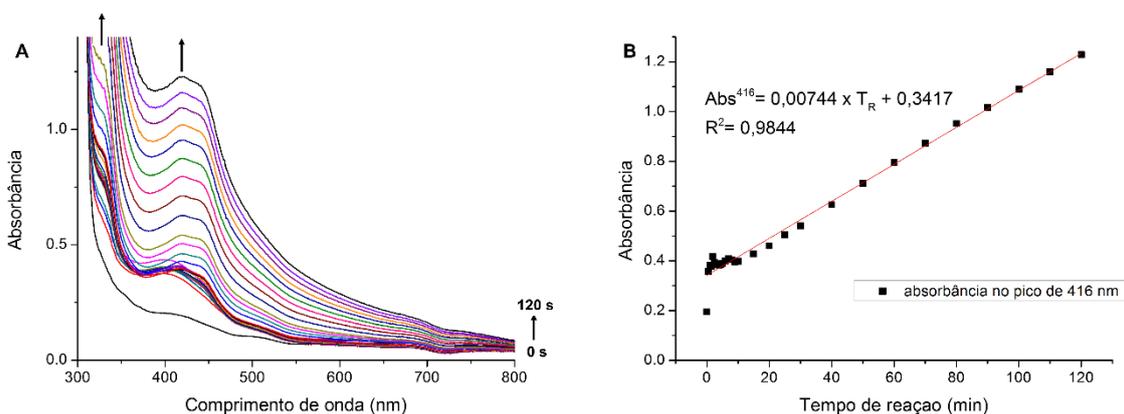


Figura 37. A) Espectro de absorção molecular no UV-Vis do catecol $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ em meio de ácido clorídrico $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ na presença de adenosina $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ em função do tempo. B) Gráfico de absorbância em 416 nm versus tempo de reação.

Diferentemente dos experimentos descritos acima, onde a solução do catecol era incolor, em meio básico ($\text{NaOH } 0,1 \text{ mol L}^{-1}$) gerou uma coloração amarelo-alaranjada, que foi ficando mais escura com o tempo. A Figura 38 apresenta três diferentes estágios desta solução: em (A) imediatamente após a dissolução do catecol, em (B) durante o tempo do experimento e em (C) duas horas após (ao final do experimento). Também foi possível observar que a coloração tornava-se mais intensa na interface solução-ar.

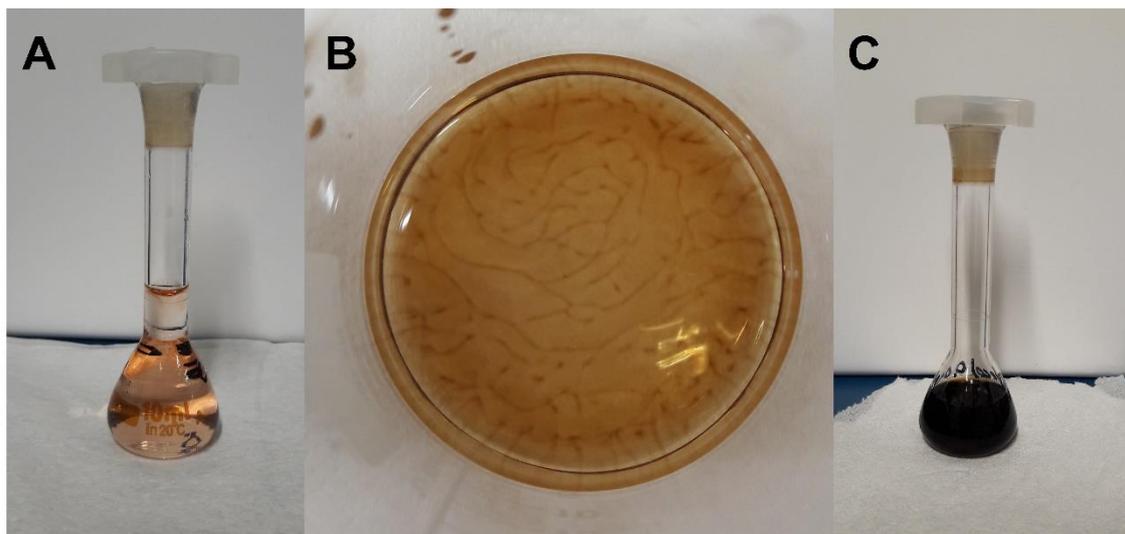


Figura 38. Fotos da solução de catecol $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ dissolvido em $\text{NaOH } 0,1 \text{ mol L}^{-1}$ em três diferentes estágios: (A) imediatamente após a dissolução do catecol, (B) durante o tempo do experimento e (C) duas horas após.

Com este estudo só foi possível constatar que a oxidação do catecol é favorecida em meio básico. O objetivo de avaliar uma possível reação entre o catecol e a adenosina não seria atingido nestas condições, pois a solução de adenosina utilizada neste experimento foi dissolvida em solução de hidróxido de amônio $2,9 \text{ mol L}^{-1}$.

4.4.2 Estudo da inibição enzimática da tirosinase pela adenosina

O intuito do próximo experimento foi de avaliar a inibição da enzima tirosinase pela adenosina. Tendo em vista que a presença de base promove a

auto-oxidação do catecol, resolveu-se excluir esta componente do sistema, dissolvendo a adenosina $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ em DMF e utilizando o catecol $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ em H_2SO_4 $0,01 \text{ mol L}^{-1}$. Os espectros apresentados na Figura 39 são os espectros obtidos para cada reagente nas seguintes concentrações: $1,5 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ para adenosina e catecol, 250 U de tirosinase e $30 \mu\text{L}$ de DMF/mL de solução, e na mistura de catecol e adenosina $1,5 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de cada. O catecol apresenta uma banda de absorção em 275 nm, a adenosina possui banda de absorção abaixo de 293 nm e possui a linha base mais alta, por consequência, a mistura catecol + adenosina também possui estas características.

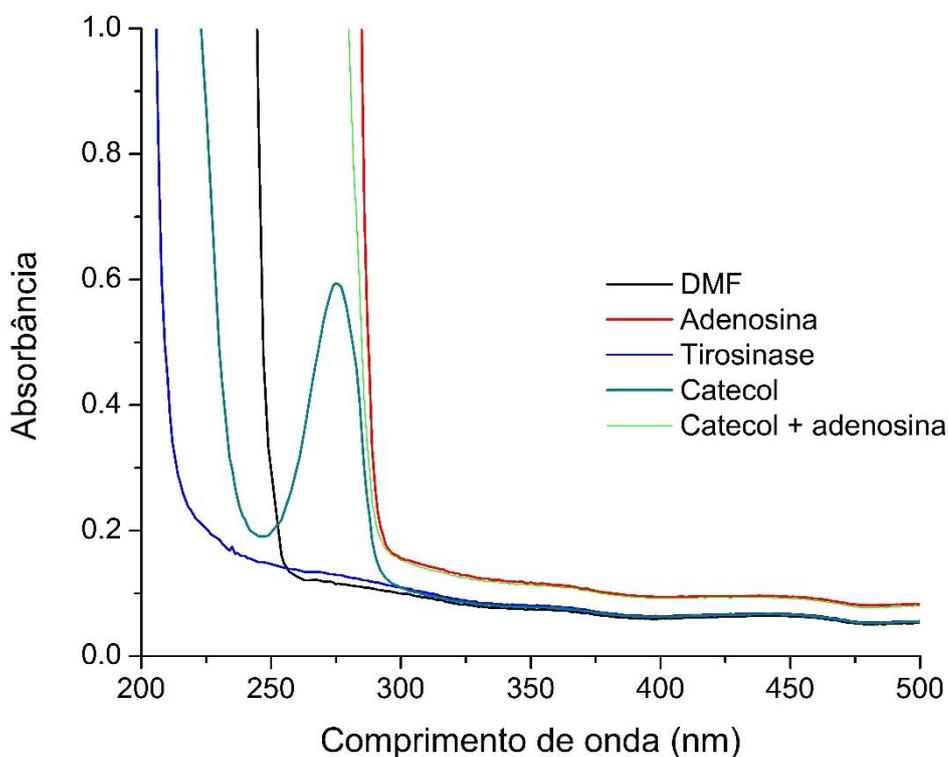


Figura 39. Espectros de absorção no UV-Vis dos reagentes utilizados para avaliar a inibição enzimática.

Os espectros foram registrados na presença de diferentes concentrações de adenosina ($1,5 \times 10^{-4}$; $3,0 \times 10^{-4}$; $6,0 \times 10^{-4}$; $9,0 \times 10^{-4}$; $1,2 \times 10^{-3}$ e $1,5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) mantendo fixas as concentrações de catecol ($1,5 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$) e da enzima (250 U). Desta forma foram mantidas as relações

molares catecol:adenosina de 1:1, 1:2, 1:4, 1:6, 1:8 e 1:10. A solução contendo somente catecol e a enzima foi utilizada como referência para avaliar a inibição. Após a adição da enzima na solução, foi esperado 2 minutos para registrar o espectro, este procedimento foi repetido para todas as soluções, a fim de que o tempo de reação da enzima fosse igual. Os espectros estão apresentados na Figura 40.

Nos seguintes pontos da curva foi adicionado primeiro a adenosina e depois a enzima, deixando estes em contato por 5 minutos, após foi adicionado o catecol e esperado os 2 minutos para registrar o espectro.

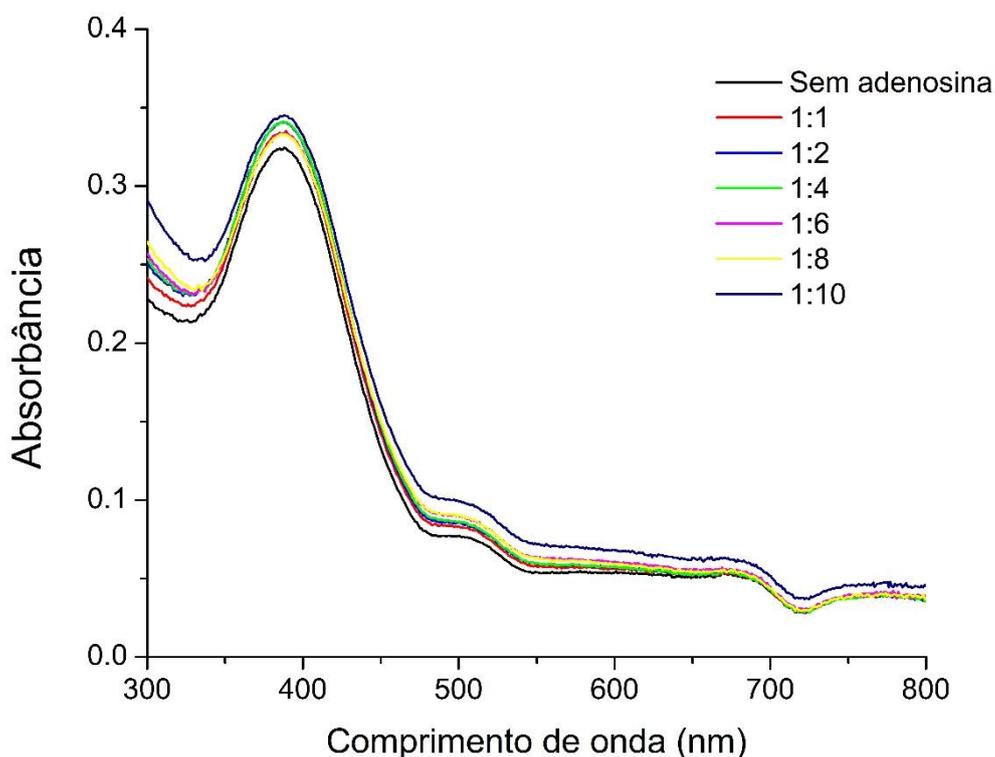


Figura 40. Espectros de absorção no UV-Vis das misturas para avaliar a inibição enzimática pela adenosina.

O comportamento observado nos espectros a partir da análise da banda em 388 nm, que corresponde à o-quinona formada, não foi o esperado para uma inibição enzimática, pois as misturas 1:1 e 1:2 apresentaram um aumento

da absorção, seguido em 1:4 da estabilização do pico e diminuição da absorção em 1:6 e 1:8, por fim a solução 1:10 apresentou um aumento da absorção. A partir desta curva não foi possível concluir a inibição enzimática, como era esperado, entretanto, houve um fator que não foi avaliado que é o tempo de contato da adenosina com o a enzima, que neste experimento foi de 5 minutos. Por uma questão de tempo, não foi possível concluir este estudo da inibição por espectroscopia no UV-Vis.

5. CONCLUSÃO

Um dos objetivos iniciais proposto neste trabalho foi a síntese das nanopartículas de ouro que foi realizada através da redução de ácido cloroáurico por citrato de sódio, um método simples e eficiente que permitiu a síntese de nanopartículas de ouro em forma de esferas com diâmetro médio de $15,0 \pm 1,1$ nm bastante homogêneas, as quais foram caracterizadas mediante microscopia eletrônica de transmissão e espectroscopia de absorção no UV-Vis. Estas AuNPs sintetizadas foram utilizadas na modificação do biossensor e apresentaram aumento do sinal analítico, além de servir como um bom suporte para a imobilização da tirosinase.

O método para imobilização da enzima mostrou-se eficiente, pois manteve a atividade enzimática e estabilidade durante pelo menos 45 dias e também não houve indícios de lixiviação da enzima para a solução durante as medidas realizadas.

Outro objetivo do trabalho foi a caracterização eletroquímica do biossensor a qual foi realizada com diferentes substratos e concluiu-se que a tentativa de determinação da adenosina pelo mecanismo de inibição enzimática utilizando como substrato a tirosina não foi bem sucedida devido às mudanças de potencial de pico de oxidação com a adição de adenosina na célula eletroquímica. Numa alternativa de substrato a ser utilizado, o catecol mostrou-se adequado e a enzima apresentou boa atividade frente a este substrato.

Conforme os objetivos, foi realizada a caracterização cinética da enzima imobilizada e foi possível determinar a constante de Michaelis-Menten aparente, a qual possui valor similar ao encontrado na literatura para outros biossensores. Além disso, comprovou-se a inibição enzimática pela adenosina mediante a curva cinética obtida.

A eletro-oxidação direta da adenosina apresentou melhor resultado quando utilizada a técnica de cronoamperometria. Embora o mecanismo por trás da melhoria em intensidade de corrente do biossensor comparado ao SPE

ainda seja desconhecido, a presença da enzima tem claramente um efeito significativo sobre a resposta do biossensor. O biossensor apresentou sensibilidade superior em comparação com SPE, AuNPs/SPE e Nafion/AuNPs/SPE. As curvas de calibração revelaram duas faixas lineares para as concentrações de adenosina, de $1,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ até $5,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ e entre $6,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ e $1,2 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$. O limite de detecção (3 desvios padrão/coeficiente angular da curva) é de $7,0 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ para a adenosina. Desta forma, foi possível atingir o objetivo principal do trabalho de fazer a determinação da adenosina utilizando o biossensor produzido e obter os parâmetros analíticos de faixa linear, sensibilidade e limite de detecção.

A determinação da adenosina com biossensor Nafion/Tyr/AuNPs/SPE descrita neste trabalho não é apenas fácil de realizar, mas também é simples, muito mais barata e requer menos tempo do que utilizando-se CLAE ou GC-MS. Desta forma, foi possível atingir os objetivos traçados para o presente trabalho. Portanto, este biossensor pode ser uma alternativa atrativa para a determinação da adenosina em amostras reais, como sangue e urina.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Haskó, G.; Cronstein, B. N. *Trends in Immunol.*, v. 25, n. 1, p. 33-39, 2004.
2. Nakav, S. et al. *PLoS ONE*, v. 3, n. 5, 2008.
3. Haskó, G. et al. *Nat Rev Drug Discov*, v. 7, n. 9, p. 759-770, 2008.
4. Spychala, J. *Pharmacol. Ther.*, v. 87, n. 2-3, p. 161-173, 2000.
5. Yang, J. et al. *J. Chromatogr. B.*, v. 780, n. 1, p. 27-33, 2002.
6. Mello, P. D. A. et al. *Mol. Biol. Cell*, v. 25, n. 19, p. 2905-2918, 2014.
7. Mujoomdar, M.; Hoskin, D.; Blay, J. *Biochem. Pharmacol.*, v. 66, n. 9, p. 1737-1747, 2003.
8. Marin, R. M.; Franchini, K. G.; Rocco, S. A. *J Sep Sci*, v. 30, n. 15, p. 2473-2479, 2007.
9. Goyal, R. N. et al. *Talanta*, v. 71, n. 3, p. 1110-1117, 2007.
10. Zhang, S.; Xia, J.; Li, X. *Anal. Chem.*, v. 80, n. 22, p. 8382-8388, 2008.
11. Goyal, R. N.; Gupta, V. K.; Chatterjee, S. *Talanta*, v. 76, n. 3, p. 662-668, 2008.
12. Goyal, R. N.; Singh, S. P. *Carbon*, v. 46, n. 12, p. 1556-1562, 2008.
13. Yan, X. et al. *Talanta*, v. 79, n. 2, p. 383-387, 2009.
14. Maduraiveeran, G.; Ramaraj, R. *J Nanopart Res*, v. 13, n. 9, p. 4267-4276, 2011.
15. Patel, M.; Dutta, A.; Huang, H. *Anal Bioanal Chem*, v. 400, n. 9, p. 3035-3040, 2011.
16. Yan, F.; Wang, F.; Chen, Z. *Sens Actuators B Chem*, v. 160, n. 1, p. 1380-1385, 2011.
17. Sun, W. et al. *Biosens Bioelectron*, v. 44, p. 146-151, 2013.
18. Shahdost-Fard, F. et al. *Biosens Bioelectron*, v. 48, n. 0, p. 100-107, 2013.

19. Perrier, S. et al. *Anal. Chem.*, v. 86, n. 9, p. 4233-4240, 2014.
20. Kesavan, S.; John, S. A. *Anal Methods*, v. 6, n. 22, p. 9022-9029, 2014.
21. Najafabadi, M. E.; Khayamian, T.; Hashemian, Z. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, v. 107, n. 0, p. 244-250, 2015.
22. Hung, S.-Y.; Shih, Y.-C.; Tseng, W.-L. *Anal. Chim. Acta*, v. 857, n. 0, p. 64-70, 2015.
23. Sun, J. et al. *Biosens Bioelectron*, v. 70, n. 0, p. 15-20, 2015.
24. Zheng, Y. et al. *J. Chromatogr. B*, v. 819, n. 1, p. 85-90, 2005.
25. Liebich, H. M. et al. *J. Chromatogr. A*, v. 1071, n. 1-2, p. 271-275, 2005.
26. Brondani, D. Desenvolvimento de biossensores para determinação de adrenalina. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis-SC, 2010.
27. Cicolatti, E. P. et al. *J Mol Catal B Enzym*, v. 99, n. 0, p. 56-67, 2014.
28. Fernandes, S. C. Biossensores eletroquímicos para compostos fenólicos usando novos materiais. Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis-SC, 2012.
29. Alfaya, A. A. S.; Kubota, L. T. *Quim Nova*, v. 25, p. 835-841, 2002.
30. Mello, L. D.; Kubota, L. T. *Food Chemistry*, v. 77, n. 2, p. 237-256, 2002.
31. Bahadır, E. B.; Sezgintürk, M. K. *Biosens Bioelectron*, v. 68, n. 0, p. 62-71, 2015.
32. Thévenot, D. R. et al. *Biosens Bioelectron*, v. 16, n. 1-2, p. 121-131, 2001.
33. Mehrvar, M.; Abdi, M. *Anal. Sci.*, v. 20, n. 8, p. 1113-1126, 2004.
34. Wang, X.; Pang, G. *Sensor Review*, v. 35, n. 1, p. 30-42, 2015.
35. Homaei, A. et al. *J Chem Biol*, v. 6, n. 4, p. 185-205, 2013/10/01 2013.
36. Martins, T. D. et al. *State of the Art in Biosensors - General Aspects*. InTech, 2013. ISBN 978-953-51-1004-0.

37. Nelson, D. L.; Cox, M. M. *Lehninger Principles of Biochemistry*. 4. W. H. Freeman, 2004. ISBN 0716743396.
38. *Enzyme Nomenclature - Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology (NC-IUBMB)*. Disponível em: < <http://www.chem.qmul.ac.uk/iubmb/enzyme/> >. Acesso em: 14/12/2016.
39. Champe, P. C.; Harvey, R. A.; Ferrier, D. R. *Bioquímica Ilustrada*. 3. Porto Alegre: Artmed, 2006. 544 ISBN 85-363-0590-8.
40. Todoli, J. L.; Hernandis, V. *J. Anal. At. Spectrom.*, v. 14, n. 9, p. 1289-1295, 1999.
41. Hocevar, M. A. *Desenvolvimento de biossensores enzimáticos amperométricos utilizando nanopartículas de polipirrol*. Dissertação de Mestrado. PPGEM, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2011.
42. Fatibello-Filho, O.; Da Cruz Vieira, I. *Quim Nova*, v. 25, n. 3, p. 455-464, 2002.
43. Sendovski, M. et al. *J Mol Biol*, v. 405, n. 1, p. 227-237, 2011.
44. Rolff, M. et al. *Chem. Soc. Rev.*, v. 40, n. 7, p. 4077-4098, 2011.
45. Serra, B. et al. *Analisis*, v. 27, n. 7, p. 592-599, 1999.
46. Campuzano, S. et al. *Anal Chim Acta*, v. 494, n. 1-2, p. 187-197, 2003.
47. Singh, S.; Jain, D. V. S.; Singla, M. L. *Sens Actuators B Chem*, v. 182, p. 161-169, 2013.
48. Campanhã Vicentini, F. et al. *Enzyme Microb Tech*, v. 84, p. 17-23, 2016.
49. Lete, C. et al. *J Electroanal Chem*, v. 744, n. 0, p. 53-61, 2015.
50. Mita, D. G. et al. *Biosens Bioelectron*, v. 23, n. 1, p. 60-65, 2007.
51. Wu, L. et al. *Biosens Bioelectron*, v. 35, n. 1, p. 193-199, 2012.
52. Wang, N. et al. *Chinese Chem Lett*, v. 25, n. 5, p. 720-722, 2014.
53. Pan, D. et al. *Anal Chim Acta*, v. 853, n. 0, p. 297-302, 2015.

54. Apetrei, I. M.; Apetrei, C. *J Food Eng*, v. 149, n. 0, p. 1-8, 2015.
55. Li, X. et al. *Sens Actuators B Chem*, v. 215, n. 0, p. 152-158, 2015.
56. Calas-Blanchard, C. et al. *Chemosphere*, v. 131, n. 0, p. 124-129, 2015.
57. Kurbanoglu, S. et al. *Biosens Bioelectron*, v. 67, n. 0, p. 670-676, 2015.
58. Kumar, S. et al. *Biosens Bioelectron*, v. 70, n. 0, p. 498-503, 2015.
59. Vidotti, M. et al. *J Brazil Chem Soc*, v. 22, p. 3-20, 2011.
60. Ding, L. et al. *Anal Chim Acta*, v. 797, n. 0, p. 1-12, 2013.
61. Hu, M. et al. *Chem. Soc. Rev.*, v. 35, n. 11, p. 1084-1094, 2006.
62. Ansari, S. A.; Husain, Q. *Biotechnol Adv*, v. 30, n. 3, p. 512-523, 2012.
63. Mohamed, H. M. *Trends Anal. Chem.*, v. 82, p. 1-11, 2016.
64. Syedmoradi, L. et al. *Biosens Bioelectron*, v. 87, p. 373-387, 2017.
65. Couto, R. A. S.; Lima, J. L. F. C.; Quinaz, M. B. *Talanta*, v. 146, p. 801-814, 2016.
66. Pacheco, W. F. et al. *Rev. Virtual Quim.*, v. Vol. 5, No 4, p. 516-537, 2013.
67. Skoog, D. A. et al. *Fundamentos de Química Analítica - Tradução da 8ª edição norte-americana*. Editora THOMSON, 2005. ISBN 8522104360.
68. Holler, F. J.; Skoog, D. A.; Crouch, S. R. *Princípios de análise instrumental*. 6 ed. Porto Alegre: Bookman, 2009. ISBN 978-85-7780-460-3.
69. Girotto, E. M.; De Paoli, M.-A. *Quim Nova*, v. 22, p. 358-368, 1999.
70. Wang, J. *Analytical Electrochemistry*. 2. Wiley-VCH, 2000. ISBN 0-471-22823-0.
71. Chavero, L. N. *Desenvolvimento e caracterização de plataformas nanoestruturadas de polipirrol para biossensores amperométricos não enzimáticos e enzimáticos*. Doutorado Centro de Ciências Físicas e Matemáticas - Programa de Pós-Graduação em Física, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis/SC, 2013.

72. Dai, M. et al. *RSC Adv*, v. 6, n. 21, p. 17016-17022, 2016.
73. Dharanivasan, G. et al. *RSC Adv*, v. 6, n. 14, p. 11773-11785, 2016.
74. Philip, D. *Spectrochim Acta A*, v. 71, n. 1, p. 80-85, 2008.
75. D'souza, O. J. et al. *RSC Adv*, v. 5, n. 111, p. 91472-91481, 2015.
76. Loizzo, M. R.; Tundis, R.; Menichini, F. *Compr Rev Food Sci F*, v. 11, n. 4, p. 378-398, 2012.
77. Husni, A. et al. *J Sci Food Agr*, v. 91, n. 9, p. 1541-1547, 2011.
78. Zahid, M. et al. *IUBMB Life*, v. 63, n. 12, p. 1087-1093, 2011.
79. Zhang, Q.; Gross, M. L. *Chem Res Toxicol*, v. 21, n. 6, p. 1244-1252, 2008.
80. Mu, Q. et al. *Analyst*, v. 139, n. 1, p. 93-98, 2014.
81. Carralero Sanz, V. et al. *Anal Chim Acta*, v. 528, n. 1, p. 1-8, 2005.
82. Boujakhrou, A. et al. *J. Mater. Chem. B*, v. 3, n. 17, p. 3518-3524, 2015.
83. Serra, B. et al. *Biosens Bioelectron*, v. 17, n. 3, p. 217-226, 2002.
84. Goyal, R. N.; Bishnoi, S.; Singh, R. K. *Indian J. Chem., Sect A*, v. 50A, p. 1026-1034, 2011.
85. Goyal, R. N.; Gupta, V. K.; Chatterjee, S. *Electrochim. Acta*, v. 53, n. 16, p. 5354-5360, 2008.
86. De Souza, S. V. C.; Junqueira, R. G. *Anal Chim Acta*, v. 552, n. 1-2, p. 25-35, 2005.