



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS FÍSICAS E MATEMÁTICAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

TÂNIA REGINA SILVA

**DESENVOLVIMENTO DE ELETRODOS
NANOESTRUTURADOS PARA A DETERMINAÇÃO DE
DOPAMINA E LEVODOPA EM FÁRMACOS**

Florianópolis – SC
2018

TÂNIA REGINA SILVA

**DESENVOLVIMENTO DE ELETRODOS
NANOESTRUTURADOS PARA A DETERMINAÇÃO DE
DOPAMINA E LEVODOPA EM FÁRMACOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito para a obtenção do título de Doutora em Química, área de concentração: Química Analítica. Orientadora: Prof^a Dr.^a Iolanda Cruz Vieira

Florianópolis – SC
2018

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Silva, Tânia Regina
DESENVOLVIMENTO DE ELETRODOS NANOESTRUTURADOS
PARA A DETERMINAÇÃO DE DOPAMINA E LEVODOPA EM
FÁRMACOS / Tânia Regina Silva ; orientador, Iolanda
Cruz Vieira, 2018.
183 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências Físicas e Matemáticas,
Programa de Pós-Graduação em Química, Florianópolis,
2018.

Inclui referências.

1. Química. 2. Eletrodos quimicamente
modificados. 3. Biossensores. 4. Nanomateriais. 5.
Lacase. I. Vieira, Iolanda Cruz. II. Universidade
Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação
em Química. III. Título.

*“Na vida, não existe nada a temer, mas a
entender.”*

(Marie Curie)

AGRADECIMENTOS

Em especial ao amor da minha vida, Henrique, por todo carinho, conselho, dedicação e paciência durante todos esses anos de vida acadêmica;

À toda minha família pelo apoio, em especial aos meus pais Jaime e Conceição, e meus sogros, Valdir e Cida;

À Prof.^a Dr.^a Iolanda Cruz Vieira pela orientação, incentivo e amizade durante todo o período em que estamos juntas;

Aos meus amigos do Laboratório de Biossensores (LaBios) pelo companheirismo, momentos de descontração e por importante ajuda sempre que precisei;

À Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) e a todos os professores do Departamento de Química, especialmente àqueles que contribuíram para minha formação pessoal e acadêmica;

Aos professores que compõe a banca avaliadora, por aceitarem o convite;

Ao Laboratório Central de Microscopia Eletrônica da Universidade Federal de Santa Catarina (LCME/UFSC), pelas análises de microscopia;

À empresa Novozymes pelo fornecimento da enzima lacase;

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo suporte financeiro.

Muito obrigada!

**LISTA DE TRABALHOS PUBLICADOS DURANTE O
DOUTORADO (2014-2018)**

Artigos publicados em revistas científicas

- ❖ SILVA, T. R.; WESTPHAL, E.; GALLARDO, H.; VIEIRA, I. C. Ionic Organic film sensor for determination of phenolic compounds. **Electroanalysis**, 26, 1801–1809, 2014.
- ❖ SILVA, T. R.; BRONDANI, D.; ZAPP, E.; VIEIRA, I. C. Electrochemical sensor based on gold nanoparticles stabilized in poly(allylamine hydrochloride) for determination of vanillin. **Electroanalysis**, 27, 465–472, 2015.
- ❖ SILVA, T. R.; VIEIRA, I. C. A biosensor based on gold nanoparticles stabilized in poly(allylamine hydrochloride) and decorated with laccase for determination of dopamine. **Analyst**, 141, 216–224, 2016.
- ❖ BRUGNEROTTO, P.; SILVA, T. R.; BRONDANI, D.; ZAPP, E.; VIEIRA, I. C. Gold nanoparticles stabilized in β -cyclodextrin and decorated with laccase applied in the construction of a biosensor for rutin. **Electroanalysis**, 29, 1031–1037, 2017.
- ❖ SILVA, T. R.; SMANIOTTO, A.; VIEIRA, I. C. Exfoliated graphite nanoplatelets and gold nanoparticles based electrochemical sensor for determination of levodopa. **Journal of Solid State Electrochemistry**, <https://doi.org/10.1007/s10008-017-3677-1>.
- ❖ ZANATO, N.; TALAMINI, L.; SILVA, T. R.; VIEIRA, I. C. Microcystin-LR label-free immunoensor based on exfoliated graphite nanoplatelets and silver nanoparticles. **Talanta**, 175, 38-45, 2017.

Resumos publicados em congressos

- ❖ SILVA, T. R.; WESTPHAL, E.; OLMEDO, H. A. G.; VIEIRA, I. C. Sensor eletroquímico constituído por filme orgânico iônico para a detecção de compostos fenólicos. In: XXI Encontro de Química da Região Sul (SBQ-Sul), 2014, Maringá, PR. Anais do XXI SBQ-Sul, 2014.
- ❖ BRUGNEROTTO, P.; SILVA, T. R.; BRONDANI, D.; ZAPP, E.; VIEIRA, I. C. Biossensor à base de nanopátículas de ouro estabilizadas em ciclodextrina e decoradas com lacase para determinação de rutina. In: XXI Encontro de Química da Região Sul (SBQ-Sul), 2014, Maringá, PR. Anais do XXI SBQ-Sul, 2014.
- ❖ SILVA, T. R.; BRONDANI, D.; ZAPP, E.; VIEIRA, I. C. Sensor eletroquímico baseado em nanopátículas de ouro estabilizadas em hidrocloreto de polialilamina para determinação de vanilina. In: XX Simpósio Brasileiro de Eletroquímica e Eletroanalítica (SIBEE), 2015, Uberlândia, MG. Anais do XX SIBEE, 2015.
- ❖ SILVA, T. R.; VIEIRA, I. C. Biossensor nanoestruturado para a detecção de dopamina. In: 18º Encontro Nacional de Química Analítica (ENQA), 2016, Florianópolis, SC. Anais do 18º ENQA, 2016.
- ❖ SILVA, T. R.; SMANIOTTO, A.; VIEIRA, I. C. Sensor eletroquímico baseado em nanoplaquetas de grafite exfoliadas e nanopátículas de ouro para a determinação de levodopa. In: XXI Simpósio Brasileiro de Eletroquímica e Eletroanalítica (SIBEE), 2017, Natal, RN. Anais do XXI SIBEE, 2017.
- ❖ SILVA, T. R.; MERIB, J.; CARASEK, E.; VIEIRA, I. C. Eletrodo de pasta de carbono modificado com líquido iônico magnético para a

determinação de bisfenol A. In: XXIV Encontro de Química da Região Sul (SBQ-Sul), 2017, Florianópolis, SC. Anais do XXIV SBQ-Sul, 2017.

❖ ZAMARCHI, F.; SILVA, T. R.; VIEIRA, I. C. Eletrodo de pasta de carbono modificado com polietilenimina para a detecção de ácido cafeico. In: XXIV Encontro de Química da Região Sul (SBQ-Sul), 2017, Florianópolis, SC. Anais do XXIV SBQ-Sul, 2017.

❖ ZANATO, N.; TALAMINE, L.; SILVA, T. R.; VIEIRA, I. C. Imunossensor para microcistina-LR empregando nanopartículas e prata e nanoplaquetas de grafite. In: XXIV Encontro de Química da Região Sul (SBQ-Sul), 2017, Florianópolis, SC. Anais do XXIV SBQ-Sul, 2017.

RESUMO

Esta Tese descreve a implementação de duas metodologias eletroanalíticas baseadas no desenvolvimento de eletrodos quimicamente modificados, construídos a partir de materiais nanoestruturados. O biossensor, preparado pela modificação interna de um eletrodo de pasta de carbono com lacase (LAC) imobilizada em nanopartículas de ouro (AuNP-PAH), é o primeiro eletrodo apresentado neste trabalho. Este eletrodo foi otimizado (50 μL de AuNP-PAH-LAC (v/v); tampão fosfato (0,1 mol L⁻¹; pH 6,0); f 10 Hz, a 60 mV e ΔE_s 5,0 mV) para a detecção de dopamina, apresentando linearidade de 0,43 a 23,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e limite de detecção de 0,26 $\mu\text{mol L}^{-1}$. O biossensor demonstrou boa seletividade e sensibilidade na determinação de dopamina em fármacos, mostrando excelente correlação com o método de referência (erro relativo < 1,4%). O segundo eletrodo proposto foi construído a partir da modificação da superfície de um eletrodo de carbono vítreo com um filme de nanoplaquetas de grafite exfoliadas (xGnP) dispersas em nanopartículas de ouro (AuNP-CMC). Este eletrodo foi otimizado (0,50% de AuNP-CMC-xGnP (m/v); ácido sulfúrico (0,1 mol L⁻¹; pH 1,2); f 30 Hz; a 50 mV e ΔE_s 6,0 mV) para a determinação de levodopa, apresentando linearidade de 2,0 a 47,6 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e limite de detecção de 0,58 $\mu\text{mol L}^{-1}$, sendo aplicado na quantificação de levodopa em fármaco, demonstrando concordância com o método comparativo (erro relativo < 6,8%).

Palavras-chave: Biossensor. Eletrodos quimicamente modificados. Lacase. Nanopartículas de ouro. Nanoplaquetas de grafite exfoliadas. Dopamina. Levodopa.

ABSTRACT

This work describes the implementation of two electroanalytic methodologies based on the development of new chemically modified electrodes constructed from nanostructured materials. The biosensor, prepared by the internal modification of a carbon paste electrode with laccase (LAC) immobilized in gold nanoparticles (AuNP-PAH), is the first electrode presented in this work. This electrode was optimized (50 μL AuNP-PAH-LAC (v/v); phosphate buffer (0.1 mol L⁻¹; pH 6.0); f 10 Hz, a 60 mV e ΔE_s 5,0 mV) for the detection of dopamine, presenting linearity of 0.43 to 23.0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ and detection limit of 0.26 $\mu\text{mol L}^{-1}$. The biosensor showed good selectivity and sensitivity in the determination of dopamine in pharmaceutical samples. The results were in agreement with those obtained using a spectrophotometric method (relative error < 1.4%). The second electrode proposed was constructed from the modification of the surface of a glassy carbon electrode with a film of exfoliated graphite nanoplatelets (xGnP) dispersed in gold nanoparticles (AuNP-CMC). This electrode was optimized (0.50% AuNP-CMC-xGnP (m/v); sulfuric acid (0.1 mol L⁻¹; pH 1.2); f 30 Hz; a 50 mV e ΔE_s 6,0 mV) for the determination of levodopa, presenting linearity of 2.0 to 47.6 $\mu\text{mol L}^{-1}$ and limit of detection of 0.58 $\mu\text{mol L}^{-1}$. The electrode was applied in the quantification of levodopa in pharmaceutical samples, demonstrating agreement with the comparative spectrophotometric method (relative error < 6.8%).

Keywords: Biosensor. Chemically modified electrodes. Laccase. Gold nanoparticles. Exfoliated graphite nanoplates. Dopamine. Levodopa.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema da estrutura e do princípio operacional de um biossensor.....	39
Figura 2. Representação esquemática do mecanismo de estabilização da estrutura de uma proteína (Adaptada de Gomes <i>et. al.</i> 2007)	42
Figura 3. (A) Representação esquemática do modelo “chave-fechadura”. (B) Representação esquemática do modelo “encaixe induzido”. E: Enzima; S: Substrato; P: Produto (Adaptado de MOTTA, 2003).....	43
Figura 4. Representação estrutural da enzima lacase e do seu sítio ativo (adaptado de RIVA, 2006)	45
Figura 5. Ilustração do ciclo catalítico da lacase (adaptado de RIVA, 2006).	46
Figura 6. Principais métodos de imobilização enzimática: (A) Confinamento, (B) Adsorção e (C) Ligação covalente. E: enzima (adaptado de SASSOLAS <i>et al.</i> , 2012)	48
Figura 7. Mecanismos de estabilização de nanopartículas metálica. (A) Estabilização estérica. (B) Estabilização eletrostática.....	53
Figura 8. Estrutura química do polieletrólito PAH.	53
Figura 9. Estrutura química do polieletrólito CMC	55
Figura 10. Representação esquemática da estrutura da grafite	56
Figura 11. Estrutura química da dopamina.	58
Figura 12. Estrutura química da levodopa	60
Figura 13. Reação de oxidação do ABTS pela LAC, com a formação do cátion radical ABTS ^{•+} (adaptado de CHILDS e BARDSLEY, 1975). .	78

Figura 14. Variação da absorvância do cátion radical ABTS ^{•+} formado na reação de oxidação do ABTS pela LAC em função do tempo.....	78
Figura 15. Estudo da atividade enzimática da LAC durante o período de estocagem (50 dias).....	80
Figura 16. (A) Imagens representativas de TEM para a dispersão de AuNP-PAH. (B) Imagens representativas de TEM para a dispersão de AuNP-PAH-LAC. Abaixo: histograma baseado no tamanho de aproximadamente 300 partículas.	82
Figura 17. Espectro UV-vis para a dispersão de AuNP-PAH e para o polímero PAH.....	83
Figura 18. CV voltamogramas para o sistema $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ (5,0 mmol L ⁻¹ , em KCl 0,1 mol L ⁻¹) empregando os eletrodos: (a) LAC/CPE, (b) CPE, (c) PAH/CPE, (d) AuNP-PAH-LAC/CPE e (e) AuNP-PAH/CPE. Os voltamogramas foram registrados em 40 mV s ⁻¹	85
Figura 19. (A) CV voltamogramas obtidos com o CPE utilizando 5,0 mmol L ⁻¹ de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ em KCl 0,1 mol L ⁻¹ , em diferentes velocidades de varredura (20 - 140 mV s ⁻¹). (A') i_p vs. $v^{1/2}$. (A'') $\log i_p$ vs. $\log v$. (B) CV voltamogramas obtidos com o biossensor utilizando as mesmas condições experimentais do CPE. (B') i_p vs. $v^{1/2}$. (C'') $\log i_p$ vs. $\log v$...	87
Figura 20. EIS para o sistema $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ empregando os eletrodos: (a) LAC/CPE, (b) CPE, (c) PAH/CPE, (d) AuNP-PAH-LAC/CPE e (e) AuNP-PAH/CPE. Amplitude da perturbação aplicada foi de 10 mV, potencial de circuito aberto, e a faixa de frequência aplicada de 100.000 a 0,1 Hz. Inserido: circuito de <i>Randles-Ershler</i>	90
Figura 21. CV voltamogramas para a dopamina (47,6 $\mu\text{mol L}^{-1}$) registrados em 40 mV s ⁻¹ utilizando os eletrodos: (a) CPE e (b) biossensor em tampão fosfato (0,1 mol L ⁻¹ ; pH 6,0)	91

Figura 22. Representação esquemática dos materiais usados como modificadores na construção do biossensor e proposta de funcionamento baseada na oxidação da dopamina catalisada pela enzima LAC com subsequente redução eletroquímica da <i>o</i> -quinona formada, sobre a superfície do biossensor.	92
Figura 23. (A) SWV voltamogramas para diferentes eletrodos: (a) CPE, (b) PAH/CPE, (c) LAC/CPE, (d) AuNP-PAH/CPE e (e) AuNP-PAH-LAC/CPE em tampão fosfato (0,1 mol L ⁻¹ ; pH 6,0) contendo 19,6 μmol L ⁻¹ de dopamina. (B) resposta relativa	94
Figura 24. (A) SWV voltamogramas para 13,8 μmol L ⁻¹ de dopamina em tampão fosfato (0,1 mol L ⁻¹ ; pH 6,0) empregando biossensores construídos a partir de: (a) 100 (b) 25 (c) 75 e (d) 50 μL de AuNP-PAH-LAC. (B) Resposta relativa	96
Figura 25. (A) voltamogramas de SWV (frequência de 10 Hz, amplitude do impulso de 60 mV e incremento de potencial de 5 mV) para a dopamina (11,9 μmol L ⁻¹) em tampão fosfato (0,1 mol L ⁻¹ ; pH: 6,0 a 8,0) e tampão acetato (0,1 mol L ⁻¹ ; pH 3,0 e 4,0). (B) influência do pH na corrente de pico resultante (expressa em resposta relativa) e influência do pH no potencial de pico para a dopamina empregando o biossensor proposto.....	97
Figura 26. Representação da reação redox da dopamina	98
Figura 27. Curvas de calibração para a dopamina em tampão fosfato (0,1 mol L ⁻¹ ; pH 6,0) utilizando: (A) LSV (velocidade de varredura de 50 mV s ⁻¹). (B) DPV (incremento de potencial de 5 mV, amplitude de pulso de 25 mV, tempo de duração do pulso 0,05 s com intervalo de 0,5 s). (C) SWV (incremento de potencial de 7 mV, amplitude de pulso de 60 mV e frequência de 25 Hz)	100

Figura 28. Otimização dos parâmetros da SWV. (A) frequência, (B) SWV voltamograma para frequência acima de 30 Hz. (C) incremento de potencial, (D) amplitude de pulso, empregando o biossensor proposto e utilizando 11,9 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de dopamina em tampão fosfato (0,1 mol L^{-1} ; pH 6,0)	103
Figura 29. (A) SWV voltamogramas (frequência 10 Hz, amplitude de pulso 60 mV e incremento de varredura de 5,0 mV) obtidos utilizando o biossensor proposto em (a) solução tampão fosfato (0,1 mol L^{-1} ; pH 6,0) (b) 0,49 (c) 0,99; (d) 1,9; (d) 3,9; (e) 5,9; (f) 7,9; (g) 9,90; (h) 11,9; (i) 13,8; (j) 15,7; (k) 17, 6; (l) 19,6; (m) 21,5; (n) 23,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$. (B) Curva de calibração utilizando: (a) biossensor; (b) CPE	105
Figura 30. Estudo de estabilidade do biossensor. Medidas realizadas por SWV em solução tampão fosfato (0,1 mol L^{-1} ; pH 6,0) e 9,90 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de dopamina.....	109
Figura 31. Espectro UV-vis para a dispersão de AuNP-CMC.....	120
Figura 32. (A) Imagens representativas de TEM para a dispersão de AuNP-CMC. (B) Imagens representativas de TEM para a dispersão de AuNP-CMC-xGnP. (C) Histograma baseado no tamanho de aproximadamente 300 partículas. (D) Ilustração das dispersões obtidas. Na sequência: AuNP-CMC, AuNP-CMC-xGnP e xGnP em água	122
Figura 33. Imagens representativas de SEM-FEG obtidas utilizando uma tensão de aceleração de 5,0 kV e ampliação de 5.000x para as superfícies: (A) GCE. (B) AuNP-CMC/GCE. (C) AuNP-CMC-xGnP/GCE.	124
Figura 34. CV voltamogramas para o sistema $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ (5,0 mmol L^{-1} , em KCl 0,1 mol L^{-1}), empregando os eletrodos: (a) GCE, (b) AuNP-CMC/GCE e (c) AuNP-CMC-xGnP/GCE.....	125

Figura 35. (A) CV voltamogramas obtidos com o GCE utilizando 5,0 mmol L ⁻¹ de [Fe(CN) ₆] ^{3-/4-} em KCl 0,1 mol L ⁻¹ , em diferentes velocidades de varredura (20 - 140 mV s ⁻¹). (A') i _p vs. v ^{1/2} . (A'') log i _p vs. log v. (B) CV voltamogramas obtidos com o eletrodo proposto nas mesmas condições experimentais. (B') i _p vs. v ^{1/2} . (C'') log i _p vs. log v.	127
Figura 36. EIS para o sistema [Fe(CN) ₆] ^{3-/4-} (5,0 mmol L ⁻¹ , em KCl 0,1 mol L ⁻¹), empregando os eletrodos: (a) GCE, (b) AuNP-CMC/GCE e (c) AuNP-CMC-xGnP/GCE. Amplitude da perturbação aplicada foi de 10 mV, potencial de circuito aberto, e a faixa de frequência aplicada de 100.000 a 0,1 Hz.	129
Figura 37. (A) CV voltamogramas para a levodopa (33,8 μmol L ⁻¹) em tampão BR (0,1 mol L ⁻¹) a 20 mV s ⁻¹ utilizando o eletrodo nanoestruturado proposto para: (A) pH: 1,0 a 5,0. (B) pH: 6,0 a 8,0. (C) Influência do pH na corrente de pico resultante (expresso como resposta relativa) e influência do pH no potencial de pico.....	131
Figura 38. Proposta de mecanismo de oxidação para a levodopa (adaptado de AKAHGAR <i>et. al.</i> 2015).....	132
Figura 39. (A) CV voltamogramas obtidos utilizando (a) AuNP-CMC-xGnP/GCE, (b) AuNP-CMC/GCE e (c) GCE em ácido sulfúrico (0,1 mol L ⁻¹ ; pH 1,2) contendo 50,0 μmol L ⁻¹ de levodopa a uma taxa de varredura de 20 mV s ⁻¹ . (B) SWV voltamogramas obtidos utilizando (a) AuNP-CMC-xGnP/GCE, (b) AuNP-CMC/GCE e (c) GCE em ácido sulfúrico (0,1 mol L ⁻¹ ; pH 1,2) contendo 19,6 μmol L ⁻¹ de levodopa. Inserido: resposta relativa.....	135
Figura 40. Representação esquemática do processo redox da levodopa na superfície do eletrodo nanoestruturado e componentes utilizados para a construção do eletrodo	136

Figura 41. (A) SWV voltamogramas para 24,4 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de levodopa em ácido sulfúrico (0,1 mol L^{-1} ; pH 1,2) utilizando eletrodos construídos a partir de: (a) 0,25, (b) 0,10, (c) 0,50, (d) 0,75 e (e) 1,0% (m/v, xGnP/AuNP-CMC). (B) Resposta relativa.138

Figura 42. (A) SWV voltamogramas para: (a) uma camada, (b) duas camadas e (c) três camadas do filme do nanocompósito, utilizando 19,6 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de levodopa em ácido sulfúrico (0,1 mol L^{-1} pH 1,2). (B) Resposta relativa139

Figura 43. (A) SWV voltamogramas para levodopa (33,8 $\mu\text{mol L}^{-1}$) em: (a) H_2SO_4 (0,1 mol L^{-1} , pH 1,2), (b) BR (0,1 mol L^{-1} , pH 2,0), (c) HCl (0,1 mol L^{-1} , pH 1,2). (B) SWV voltamogramas para: (a) PBS (0,1 mol L^{-1} , pH 7,4), (b) tampão fosfato (0,1 mol L^{-1} , pH 7,0), (c) KCl (0,1 mol L^{-1} , pH 5,3), (d) NaCl (0,1 mol L^{-1} , pH 5,5) e (e) tampão acetato (0,1 mol L^{-1} , pH 5,0). (C) Resposta relativa.....140

Figura 44. Curvas de calibração para a levodopa empregando SWV (frequência de 30 Hz, incremento de potencial de 6 mV, amplitude de pulso de 50 mV), DPV (incremento de 5 mV, amplitude de 25 mV, tempo de duração do pulso 0,05 s com intervalo de 0,5 s) e LSV (velocidade de varredura 50 mV s^{-1}).141

Figura 45. Otimização dos parâmetros da SWV: (A) frequência, (B) incremento de potencial, (C) amplitude de pulso. Estudo realizado utilizando o eletrodo proposto em ácido sulfúrico (0,1 mol L^{-1}) contendo em 24,4 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de levodopa143

Figura 46. (A) SWV voltamogramas obtidos utilizando o eletrodo nanoestruturado em ácido sulfúrico (0,1 mol L^{-1} ; pH 1,2) para diferentes concentrações de levodopa: (a) 2,0; (b) 4,97; (c) 9,90; (d) 14,7; (e) 19,6;

(f) 24,4; (g) 29,1; (h) 33,8; (i) 38,5; (j) 43,1; (k) 47,6 $\mu\text{mol L}^{-1}$. (B) Curva de calibração utilizando: (a) AuNP-CMC-xGnP/GCE, (b) GCE. 144

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Classificação das enzimas segundo o tipo de reação que catalisam	41
Tabela 2. Resumo dos parâmetros de calibração de cada técnica	99
Tabela 3. Comparação entre diferentes eletrodos descritos na literatura para determinação de dopamina.....	106
Tabela 4. Estudos de recuperação para dopamina em amostras farmacêuticas utilizando o biossensor.....	110
Tabela 5. Determinação de dopamina em amostra farmacêutica utilizando o método proposto e o método espectrofotométrico de referência.	111
Tabela 6. Comparação entre diferentes eletrodos aplicados na detecção de levodopa	142
Tabela 7. Comparação entre diferentes eletrodos utilizados na determinação de dopamina.....	146
Tabela 8. Estudo de recuperação para a levodopa em fármaco utilizando o eletrodo proposto	149
Tabela 9. Determinação de levodopa pelo método eletroquímico e pelo método espectrofotométrico (MOHAMED <i>et. al.</i> , 2009).	150

LISTA DE ACRÔNIMOS, ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

Abs – absorvância

ABTS – sal de amônio do ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico)

Ag/AgCl – Eletrodo de referência de prata/cloreto de prata

AuNP – nanopartículas de ouro

a – amplitude de pulso

CMC – carboximetilcelulose

CPE – (inglês: *carbon paste electrode*) – eletrodo de pasta de carbono

CV – (inglês: *cyclic voltammetry*)

DPV – (inglês: *differential pulse voltammetry*) – voltametria de pulso diferencial

EIS – (inglês: *electrochemical impedance spectroscopy*) – espectroscopia de impedância eletroquímica

E_{p_o} – potencial de pico de oxidação

E_{p_r} – potencial de pico de redução

EQM – eletrodo quimicamente modificado

Er – erro relativo

f - frequência

GCE – (inglês: *glassy carbon electrode*) – eletrodo de carbono vítreo

i_{p_a} – corrente de pico anódico

i_{p_c} – corrente de pico catódico

IUPAC – União internacional de química pura e aplicada (inglês: *International Union of Pure and Applied Chemistry*)

LAC – lacase

LSV – (inglês: *linear sweep voltammetry*) – voltametria de varredura linear

LOD – (inglês: *limit of detection*) – limite de detecção

LOQ – (inglês: *limit of quantitation*) – limite de quantificação

NC-IUBMB – (inglês: *Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology*) – Comitê de Nomenclatura da União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular

PAH – poli(alilamina hidrocloreada)

R_{ct} – (inglês: *resistance to charge transfer*) – resistência a transferência de carga

RSD – (inglês: *relative standard deviation*) – desvio padrão relativo

SEM-FEG – (inglês: *scanning electron microscopy with field emission gun*) – microscopia eletrônica de varredura com campo de emissão

SWV – (inglês: *square wave voltammetry*) – voltametria de onda quadrada

TEM – (inglês: *transmission electron microscopy*) – microscopia eletrônica de transmissão

UV-vis – Ultravioleta-visível

xGnP – (inglês: *exfoliated graphite nanoplatelets*) – nanoplaquetas de grafite exfoliadas

v – velocidade de varredura

ΔE_s – Incremento de potencial

Δi – Corrente de pico resultante

SUMÁRIO

APRESENTAÇÃO	35
CAPÍTULO 1: FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	37
1.1.ELETRODOS QUIMICAMENTE MODIFICADOS	37
1.2.BIOSSENSOR	38
1.3.ENZIMAS	40
<i>1.3.1.Lacase</i>	44
<i>1.3.2.Imobilização enzimática</i>	47
1.4.NANOMATERIAIS	50
<i>1.4.1.Poli(alilamina hidrociorada)</i>	53
<i>1.4.2.Carboximetilcelulose</i>	55
<i>1.4.3.Nanoplaquetas de grafite exfoliadas</i>	56
1.5.CATECOLAMINAS	57
<i>1.5.1.Dopamina</i>	58
<i>1.5.2.Levodopa</i>	60
1.6.ELETRODOS DE CARBONO	63
<i>1.6.1.Eletrodo de pasta de carbono</i>	63
<i>1.6.2.Eletrodo de carbono vítreo</i>	65
CAPÍTULO 2: OBJETIVOS	67
2.1.OBJETIVO GERAL	67
2.2.OBJETIVOS ESPECÍFICOS	67
2.2.1.Biossensor constituído por nanopartículas de ouro estabilizadas em poli(alilamina hidrociorada) e decoradas com lacase para a determinação de dopamina	67

2.2.2.Eletrodo quimicamente modificado com nanoplaquetas de grafite exfoliadas e nanopartículas de ouro estabilizadas em caboximetilcelulose para a determinação de levodopa68

CAPÍTULO 3: BIOSSENSOR CONSTITUÍDO POR NANOPARTÍCULAS DE OURO ESTABILIZADAS EM POLI(ALILAMINA HIDROCLORADA) E DECORADAS COM LACASE PARA A DETERMINAÇÃO DE DOPAMINA70

3.1.INTRODUÇÃO70

3.2.PARTE EXPERIMENTAL71

3.2.1.Regentes e soluções.....71

3.2.2.Instrumentação e eletrodos72

3.2.3.Obtenção da solução enzimática e determinação da atividade.....73

3.2.4.Síntese e caracterização das AuNP-PAH e AuNP-PAH-LAC.....74

3.2.5.Construção do biossensor75

3.2.6.Medidas eletroquímicas76

3.2.7.Preparo da amostra e determinação de dopamina em fármaco.....76

3.3.RESULTADOS E DISCUSSÕES77

3.3.1.Determinação da atividade e avaliação da estabilidade enzimática 77

3.3.2.Caracterização do nanomaterial.....80

3.3.3.Caracterização eletroquímica84

3.3.3.1.Voltametria cíclica84

3.3.3.2.Impedância eletroquímica.....88

3.3.4.Comportamento eletroquímico da dopamina.....90

3.3.5.Princípio de funcionamento do biossensor.....	91
3.3.6.Estudo da contribuição de cada modificador utilizado na construção do biossensor	92
3.3.7.Imobilização enzimática e otimização da construção do biossensor. 94	
3.3.8.Efeito do pH do eletrólito de suporte.....	96
3.3.9.Escolha e otimização da técnica voltamétrica.....	98
3.3.10.Desempenho analítico do biossensor.....	103
<i>3.3.10.1.Curva de calibração.....</i>	<i>103</i>
<i>3.3.10.2.Estudos de seletividade, precisão e estabilidade.....</i>	<i>107</i>
<i>3.3.10.3.Estudos de recuperação e aplicação analítica do método</i>	<i>109</i>
CAPÍTULO 4: ELETRODO QUIMICAMENTE MODIFICADO COM NANOPLAQUETAS DE GRAFITE EXFOLIADAS E NANOPARTÍCULAS DE OURO ESTABILIZADAS EM CARBOXIMETILCELULOSE PARA A DETERMINAÇÃO DE LEVODOPA	112
4.1.INTRODUÇÃO	112
4.2.PARTE EXPERIMENTAL.....	114
4.2.1.Reagentes e soluções.....	114
4.2.2.Instrumentação.....	115
4.2.3.Síntese e caracterização das AuNP-CMC e AuNP-CMC-xGnP.....	116
4.2.4.Construção e caracterização do eletrodo	117
4.2.5.Medidas eletroquímicas e eletrodos.....	118
4.2.6.Preparo da amostra e determinação de levodopa em fármaco.....	118
4.3.RESULTADOS E DISCUSSÕES	119

4.3.1. Caracterização do nanomaterial	119
4.3.2. Caracterização morfológica da superfície do eletrodo	123
4.3.3. Caracterização eletroquímica	124
4.3.3.1. <i>Voltametria Cíclica</i>	125
4.3.3.2. <i>Impedância eletroquímica</i>	128
4.3.4. Influência do pH no comportamento eletroquímico da levodopa	130
4.3.5. Comportamento eletroquímico da levodopa em diferentes eletrodos	133
4.3.6. Otimização das condições experimentais	136
4.3.6.1. <i>Construção do eletrodo</i>	137
4.3.6.2. <i>Estudo da natureza do eletrólito de suporte</i>	139
4.3.6.3. <i>Escolha e otimização da técnica voltamétrica</i>	140
4.3.7. Desempenho analítico do eletrodo	144
4.3.7.1. <i>Curva de calibração</i>	144
4.3.7.2. <i>Estudos de seletividade e precisão</i>	146
4.3.7.3. <i>Estudos de recuperação e aplicação analítica</i>	148
CAPÍTULO 5: CONCLUSÕES	151
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	153

APRESENTAÇÃO

Neste trabalho de Tese serão apresentados um eletrodo quimicamente modificado e um biossensor enzimático construídos a partir da modificação de substratos convencionais (carbono vítreo e pasta de carbono, respectivamente) com materiais nanoestruturados (nanopartículas de ouro, estabilizadas em dois diferentes polímeros, e nanoplaquetas de grafite exfoliadas) e enzima lacase (oriunda do fungo *Aspergillus oryzae*). Estes eletrodos foram aplicados no desenvolvimento de duas novas metodologias analíticas para a determinação de dopamina e levodopa em fármacos.

Para melhor apresentação, esta Tese está dividida em cinco capítulos. O primeiro trata de uma fundamentação teórica sobre os principais pontos trabalhados na Tese (eletrodos quimicamente modificados e biossensores, enzimas, nanomateriais, catecolaminas, ente outros). O segundo traz a apresentação dos objetivos do trabalho. Este tópico está dividido em duas partes, as quais se referem aos dois eletrodos propostos. No terceiro capítulo é descrito a metodologia aplicada no desenvolvimento do biossensor para a detecção de dopamina, construído a partir da imobilização da enzima lacase em nanopartículas de ouro estabilizadas em poli(alanina hidrocloreada). Os principais resultados obtidos e as discussões referentes a este trabalho também são encontrados nesta seção. O quarto capítulo descreve a metodologia, os resultados e as discussões referente ao eletrodo constituído por nanoplaquetas de grafite exfoliadas dispersas em nanopartículas de ouro estabilizadas em carboximetilcelulose. Este eletrodo nanoestruturado foi aplicado na

quantificação de levodopa em fármaco. Por fim, no capítulo cinco, são apresentadas as conclusões referentes aos trabalhos apresentados nesta Tese e em sequência a revisão bibliográfica.

CAPÍTULO 1: FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

1.1. ELETRODOS QUIMICAMENTE MODIFICADOS

Com o objetivo de melhorar as propriedades físico-químicas e controlar a natureza da interface eletrodo-solução, surgiram nos anos 70 os primeiros trabalhos relacionados a modificação da superfície de eletrodos (SOUZA, 1997; PEREIRA *et al.*, 2002). Os eletrodos quimicamente modificados (EQMs) podem ser construídos a partir da modificação de um substrato base (ouro, platina, carbono vítreo, pasta de carbono) com uma série de materiais (nanomateriais, biomoléculas, líquidos iônicos, polímeros, entre outros) que geralmente conferem melhoria na sensibilidade, na seletividade, na estabilidade e na condutividade do eletrodo base, o que justifica a sua aplicação (VIDAL *et al.*, 1999; PEREIRA *et al.*, 2002).

De maneira geral, os métodos mais utilizados para a incorporação de um agente modificador consistem em: (a) adsorção - dissolução do modificador em um solvente aproximado e exposição da superfície do eletrodo a esta solução; (b) eletrodeposição - deposição de uma espécie na superfície do eletrodo pela aplicação de um potencial; (c) ligação covalente - o modificador é ligado covalentemente à superfície do eletrodo e (d) recobrimento com filmes poliméricos (MURRAY *et al.*, 1980; VIDAL *et al.*, 1999).

O uso de eletrodos quimicamente modificados aliados a técnicas eletroanalíticas permite a detecção *in situ* e em tempo real de uma grande variedade de compostos, o que confere a esta metodologia certas vantagens em relação a outras técnicas de análise (como a cromatografia

e a espectrofotometria, por exemplo). Além disso, o baixo custo (instrumental e de reagentes), a facilidade na construção dos eletrodos, a portabilidade e a possibilidade de miniaturização do sistema tornam esta metodologia uma importante ferramenta tecnológica, que pode ser aplicada na análise química de várias substâncias em diversas áreas, tais como clínica, ambiental e biotecnológica (MURRAY, 1980; ABRUNA *et al.*, 1981; MELLO e KUBOTA, 2002; LOWINSOHN e BERTOTTI, 2006).

1.2. BIOSSENSOR

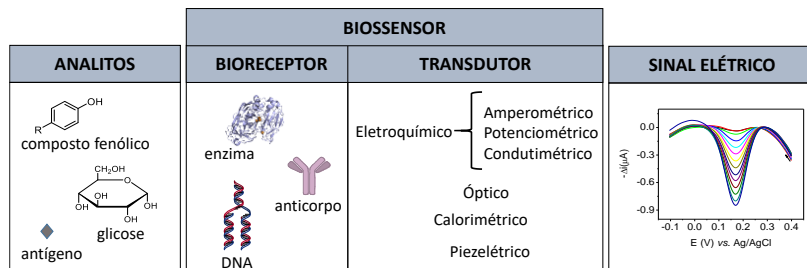
Um biossensor pode ser definido como um dispositivo de análise integrado capaz de fornecer uma informação analítica específica (qualitativa ou quantitativa) pelo uso de um elemento de reconhecimento biológico (receptor), o qual é mantido em contato direto com um componente de detecção (transdutor) (FATIBELLO-FILHO e CAPELATO, 1992; THÉVENOT *et al.*, 2001; CÂMPAS *et al.*, 2008; IUPAC, 2011).

Nestes dispositivos, a obtenção da informação analítica depende essencialmente das características da superfície, que está associada ao reconhecimento da espécie de interesse de forma seletiva. O responsável por este sistema de reconhecimento é o elemento conhecido como biorreceptor, que pode ser constituído por enzimas, anticorpos, organelas, tecidos, DNA, entre outros (MELLO e KUBOTA, 2002; D'ORAZIO, 2003; CÂMPAS *et al.*, 2008). A principal função do biorreceptor é fornecer ao eletrodo um alto grau de seletividade/especificidade a um determinado composto (ou classe de compostos), sendo capaz de

reconhecer, reagir ou ligar-se ao “analito-alvo”, resultando na variação de alguma propriedade físico-química (transferência de elétrons, variação de pH, de massa, etc) que pode ser quantificada (THÉVENOT *et al.*, 2001).

O transdutor, por sua vez, é a parte responsável pela conversão do sinal gerado pela interação entre o analito e o biorreceptor, podendo operar baseado em diferentes propriedades físico-químicas, dependendo do tipo de sensor (eletroquímico, óptico, calorimétrico, piezoelétrico, entre outros). Na construção de biossensores que empregam medidas elétricas, o transdutor corresponde ao eletrodo e ao sistema de transdução de sinal, que é capaz de identificar a mudança física ou química que ocorre na interface eletrodo/solução (FATIBELLO-FILHO e CAPELATO, 1992; MELLO e KUBOTA, 2002). Portanto, pode-se concluir que o funcionamento dos biossensores (Figura 1) é fundamentado na interação seletiva do analito com o componente biorreceptor, que é reconhecida e medida por um transdutor adequado capaz de amplificar e processar o sinal correspondente à concentração do analito na amostra (ALFAYA e KUBOTA, 2002; MELLO e KUBOTA, 2002).

Figura 1. Esquema da estrutura e do princípio operacional de um biossensor.



Quando o material biológico utilizado na construção de um biossensor é uma enzima, estes dispositivos são conhecidos como biossensores enzimáticos. Estes biossensores são amplamente explorados em aplicações analíticas devido à possibilidade de combinar a seletividade da enzima com a sensibilidade, simplicidade e relativo baixo custo de um transdutor eletroquímico (MELLO e KUBOTA, 2002; PEREIRA *et al.*, 2002; GOMES e REBELO, 2003; SU *et al.*, 2011).

1.3. ENZIMAS

Com exceção de um pequeno grupo de moléculas de RNA cataliticamente ativas (ribozimas), enzimas são proteínas especializadas na catálise de reações biológicas. Estas biomoléculas são responsáveis por acelerar diversos tipos de reações, podendo inclusive superar a eficiência de catalisadores sintéticos. Elas atuam no sentido de aumentar a velocidade da reação oferecendo um caminho alternativo (de menor energia) sem alterar o equilíbrio da reação e fazendo isto de forma seletiva (BERG *et al.*, 2002; VOET e VOET, 1995; STRYER, 1996; LEHNINGER *et al.*, 2006).

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

Tabela 1. Classificação das enzimas segundo o tipo de reação que catalisam.

Classe	Tipo de reação
Oxidoredutases	Transferência de elétrons (oxirredução)
Transferases	Transferência de grupos funcionais
Hidrolases	Hidrólise de ligações covalentes
Liases	Adição ou remoção de duplas ligações ou grupos funcionais
Isomerases	Alterações geométricas ou estruturais dentro de uma molécula
Ligases	União de duas moléculas associada à hidrólise de uma ligação da adenosina trifosfato (ATP)

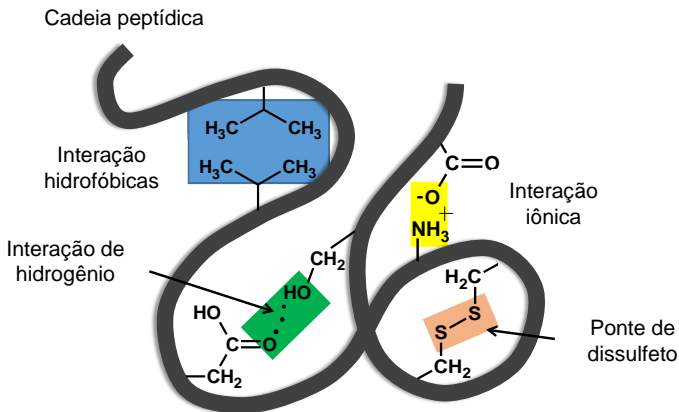
Retirado de NC-IUBMB, 1992.

As enzimas são eficientes catalisadores que apresentam especificidade ou seletividade frente a um determinado substrato ou a uma classe (STRYER, 1996; CHAMPE e HARVEY, 1996; LEHNINGER *et al.*, 2006). A maioria das enzimas possui apenas um sítio ativo, local onde ocorrem as reações com os substratos. Em geral, o sítio ativo é constituído de alguns resíduos de aminoácidos da cadeia proteica, que participam diretamente na quebra ou formação de ligações, e um grupo não-proteico de natureza inorgânica (íons metálicos) ou orgânica (vitaminas e biotina, por exemplo). Desta forma, o sítio ativo é o responsável pela atividade biológica da enzima (VOET e VOET, 1995; STRYER, 1996; LEHNINGER *et al.*, 2006; DEVLIN, 2007).

A atividade catalítica, bem como a estabilidade e especificidade, da enzima depende também da sua estrutura tridimensional (terciária ou

quaternária) que tem origem nos dobramentos das cadeias polipeptídicas da proteína (STRYER, 1996; LEHNINGER *et al.*, 2006). A estrutura proteica da enzima é mantida por um conjunto de forças, tais como ligações de hidrogênio, pontes de dissulfeto, interações iônicas (atração eletrostática) e interações hidrofóbicas (interações de *Van der Waals*, por exemplo) (Figura 2). Quando submetida à ação do calor, solventes orgânicos, ácidos e bases fortes, a enzima pode desnaturar, ou seja, essas interações que estabilizavam sua estrutura são rompidas e sua conformação espacial é perdida, tornando a enzima inativa (GOMES *et al.*, 2007; IYER e ANANTHANARAYAN, 2008).

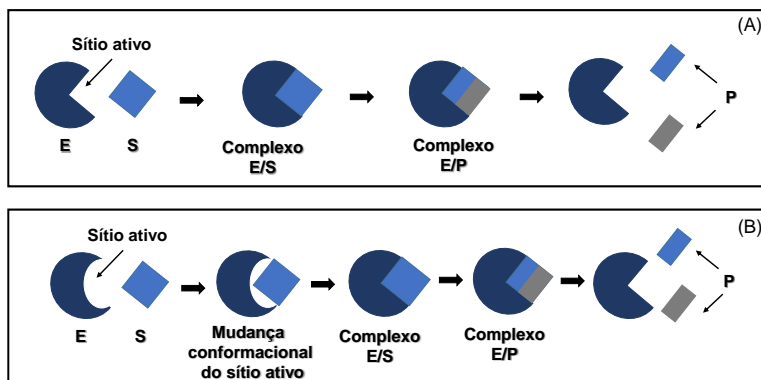
Figura 2. Representação esquemática do mecanismo de estabilização da estrutura de uma proteína (Adaptada de Gomes *et al.* 2007).



Duas teorias foram propostas na tentativa de explicar a ação catalítica das enzimas. Em 1894, Emil Fischer propôs o modelo “chave-fechadura” com o intuito de explicar a afinidade da enzima pelo substrato.

De acordo com Fischer, a reação ocorre na cavidade da enzima, conhecida como sítio ativo, formando o complexo enzima-substrato, Figura 3-A. Nesse modelo o encaixe do substrato (chave) ocorre perfeitamente no sítio ativo da enzima, que seria rígido como uma fechadura. Mais tarde, em 1958, Koshland propôs o modelo do ajuste induzido, no qual ocorre uma mudança conformacional na enzima para o encaixe do substrato, ou seja, o sítio ativo assume estruturas flexíveis moldando-se à molécula do substrato. As cadeias laterais de aminoácidos que formam os sítios ativos da enzima são reorientadas de maneira que as suas posições potencializam a ação catalítica da enzima até que o substrato esteja completamente ligado, Figura 3-B (FERSHT, 1980; LEHNINGER *et al.*, 2006; MOTTA, 2003; CAMPBELL e COMPTON, 2010).

Figura 3. (A) Representação esquemática do modelo “chave-fechadura”. (B) Representação esquemática do modelo “encaixe induzido”. E: Enzima; S: Substrato; P: Produto (Adaptado de MOTTA, 2003).

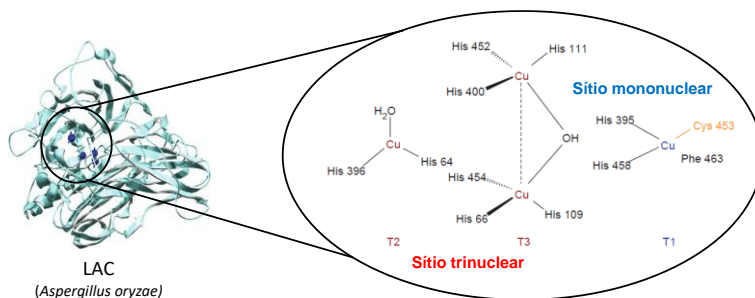


1.3.1. *Lacase*

A enzima lacase (LAC) pertence à família das oxirredutases multicobre, sendo amplamente encontrada em plantas, insetos, bactérias e fungos (MAYER e STAPLES, 2002; MOROZOVA *et al.*, 2007; GIARDINA *et al.*, 2010; FERNÁNDEZ-FERNÁNDEZ *et al.*, 2013). Esta enzima é capaz de catalisar a oxidação de uma grande variedade de substratos fenólicos tais como polifenóis, aminofenóis e poliaminas, com a redução simultânea de oxigênio molecular à água (MULCHANDANI *et al.*, 1998; RIVA, 2006; GIARDINA *et al.*, 2010; SANTHANAM *et al.*, 2011). Devido a sua alta seletividade, sensibilidade e poder de catalisar reações oxidativas, esta enzima tem sido muito utilizada como material biológico na construção de biossensores (RIVA, 2006; GIARDINA *et al.*, 2010).

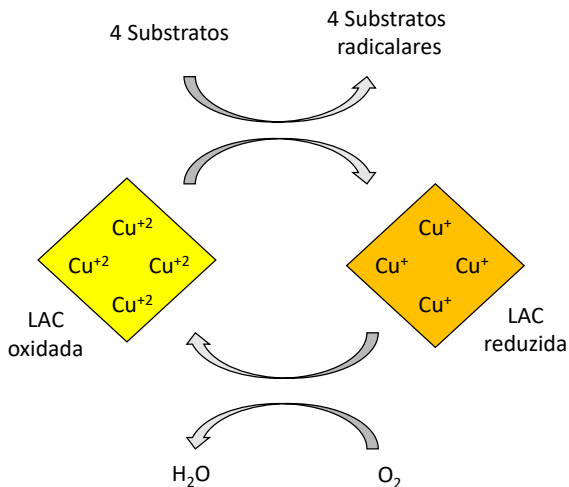
A LAC apresenta em seu sítio ativo quatro átomos de cobre de três tipos diferentes (T1, T2 e T3) que desempenham papel fundamental no mecanismo catalítico desta enzima (Figura 4). O sítio T1 da lacase (sítio mononuclear) é o receptor primário dos elétrons do substrato, sendo o local onde ocorre a oxidação. Neste sítio é gerado o cátion-radical que é transferido para os três átomos de cobre presentes nos sítios T2 e T3 (T2/T3 – sítio ou *cluster* trinuclear), onde o oxigênio molecular é reduzido à água (MAYER e STAPLES 2002, RIVA, 2006; SOLOMON *et al.*, 2008; GIARDINA *et al.*, 2010; SANTHANAM *et al.*, 2011; JENSEN *et al.*, 2012).

Figura 4. Representação estrutural da enzima lacase e do seu sítio ativo (adaptado de RIVA, 2006).



A Figura 5 mostra uma representação esquemática do ciclo catalítico da LAC ao qual compreende sucessivas transferências de elétrons entre seus átomos de cobre. A estequiometria do ciclo envolve quatro átomos de cobre com estado de oxidação +2 e quatro moléculas do substrato fenólicos. A medida que a LAC promove a oxidação de seus substratos, seus átomos de cobre sofrem redução de forma que o sítio T1 sempre esteja pronto para receber um novo substrato fenólico. Logo, o sítio T1 é quem determina a eficiência da catálise (SOARES, 1998; RIVA, 2006).

Figura 5. Ilustração do ciclo catalítico da lacase (adaptado de RIVA, 2006).



A LAC apresenta grande versatilidade sendo amplamente empregada em aplicações industriais como biorremediação, clarificação de vinho, análise de drogas, produção de etanol e na construção de biossensores aplicados a determinação de compostos fenólicos, uma vez que esta enzima catalisa reações de oxidação de diversos compostos fenólicos às suas respectivas *o*-quinonas (RIVA, 2006; MOROZOVA *et al.*, 2007; MADHAVI e LELE, 2009; FERNÁNDEZ-FERNÁNDEZ *et al.*, 2013). No entanto, estas aplicações podem ser limitadas se a enzima estiver em sua forma livre, visto que desta maneira está susceptível à degradação por diversos fatores químicos e físicos que podem limitar seu efeito catalítico e dificultar a estocagem. Esta perda na atividade da

enzima pode ser evitada por estratégias como a imobilização enzimática (JESUS, 1998).

1.3.2. Imobilização enzimática

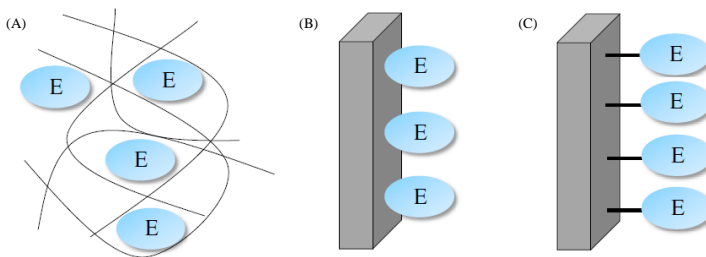
As enzimas possuem eficiência catalítica extraordinária e alto grau de especificidade por seus substratos. Porém em sua forma livre, a enzima apresenta maior suscetibilidade à degradação por fatores como temperatura, pH e agentes inibidores. Essa degradação pode afetar a atividade enzimática, reduzindo a velocidade da reação e/ou causando a inativação da enzima durante a sua utilização ou até mesmo estocagem. Neste sentido, a imobilização enzimática se torna uma estratégia interessante a fim de preservar a estabilidade e atividade catalítica da enzima por mais tempo (DURÁN *et al.*, 2002; OLIVEIRA *et al.*, 2009; FRANZOLI *et al.*, 2011; PACHECO e SOARES, 2014).

A principal vantagem em imobilizar uma enzima é a de obter um biocatalisador com menor sensibilidade a interferentes e maior estabilidade quanto às mudanças por fatores químicos, físicos ou biológicos em comparação a sua forma livre (DALLA-VECCHIA *et al.*, 2004; KIM *et al.*, 2006). Desta maneira, as enzimas podem ser aplicadas com sucesso em inúmeros processos de biotransformação, especialmente em indústrias químicas, farmacêuticas e de alimentos, incluindo a sua aplicação em biorreatores e biossensores (PEREIRA *et al.*, 2003; DALLA-VECCHIA *et al.*, 2004; KLOTZBACH *et al.*, 2008). As propriedades de imobilização de enzimas são governadas tanto pela sua estrutura como pelo material utilizado como suporte. Um suporte

critérios escolhido pode melhorar significativamente o desempenho do sistema de imobilização (JAHNZ *et al.*, 2003).

Diferentes métodos de imobilização têm sido desenvolvidos a fim de preservar a atividade catalítica das enzimas durante os processos em que são empregadas. A Figura 6 apresenta os principais métodos de imobilização de enzimas. Vale ressaltar que cada método possui características intrínsecas, fazendo-se necessário selecionar o mais adequado para cada aplicação (DALLA-VECCHIA *et al.*, 2004; MATEO *et al.*, 2007; SASSOLAS *et al.*, 2012).

Figura 6. Principais métodos de imobilização enzimática: (A) Confinamento, (B) Adsorção e (C) Ligação covalente. E: enzima (adaptado de SASSOLAS *et al.*, 2012).



No processo de imobilização por adsorção física, a enzima não sofre nenhuma alteração em sua estrutura, interagindo com um suporte insolúvel apenas por interações de baixa energia (interações de hidrogênio, iônicas, *Van der Waals*, entre outras). Este procedimento apresenta vantagens em relação a simplicidade, rapidez e baixo custo,

porém apresenta como desvantagem a possível dessorção da biomolécula (MATEO *et al.*, 2007; SASSOLAS *et al.*, 2012).

Por outro lado, na imobilização por ligação química a enzima é quimicamente ligada ao suporte por ligações covalentes (ALTUN e CETINUS, 2007). A ligação ocorre entre grupos funcionais não ativos da enzima (hidroxila, carboxila e amino, por exemplo) com os grupos reativos ligados à superfície do suporte. Em geral, este método envolve duas etapas: a ativação do suporte com um reagente específico (os suportes devem possuir grupos funcionais que possam ser ativados como, por exemplo, carboxila, amino e hidroxila) e a adição da enzima para formação da ligação. A imobilização por ligação covalente apresenta a vantagem de ser estável frente às possíveis mudanças físico-químicas, porém este tipo de imobilização pode afetar a estrutura da enzima podendo levar inclusive à inativação da biomolécula (DALLA-VECCHIA *et al.*, 2004; MATEO *et al.*, 2007; SASSOLAS *et al.*, 2012).

Na imobilização por ligação covalente cruzada, reagentes multifuncionais (glutaraldeído, por exemplo) são empregados para reagirem com os grupos livres contidos na cadeia proteica da enzima formando uma rede polimérica constituída por ligações cruzadas entre as enzimas e as moléculas do suporte. As ligações por este método são irreversíveis, apresentando uma elevada resistência a variações de temperatura e pH, propiciando suportes com alta resistência à desnaturação (MIKKELSEN e CORTÓN, 2004; SASSOLAS *et al.*, 2012).

Nas técnicas de confinamento, a enzima fica aprisionada em uma matriz polimérica (polímero insolúvel) ou em uma microcápsula. A principal desvantagem desse método está no acesso do substrato até a

enzima, que pode ser dificultado devido ao tamanho dos poros da matriz e, estes efeitos difusionais podem prejudicar a atividade enzimática (DALLA-VECCHIA *et al.*, 2004; MIKKELSEN e CORTÓN, 2004; SASSOLAS *et al.*, 2012)

Na construção de biossensores, é essencial a imobilização adequada das enzimas de modo a não afetar os seus sítios ativos e, consequentemente, sua atividade catalítica. Um biossensor deve oferecer boa seletividade, sensibilidade e estabilidade nas condições de operação (temperatura, pH, etc). Desta forma, o material empregado como suporte deve ser criteriosamente escolhido para obter um biocatalisador estável e com desempenho satisfatório. Novos materiais têm sido investigados para esta finalidade, especialmente nanomateriais como grafeno, nanotubos de carbono, nanopartículas metálicas e polímeros condutores (JIANRONG *et al.*, 2004; ANSARI e HUSAIN, 2011).

1.4. NANOMATERIAIS

Nos últimos anos, uma atenção considerável tem sido dada à aplicação de materiais nanoestruturados (obtidos em escala de 1-1000 nm) em sistemas de (bio)sensoriamento, isto porque estes materiais apresentam um conjunto exclusivo de propriedades catalíticas, eletrônicas, magnéticas e ópticas que são fortemente dependentes do seu tamanho reduzido e composição química (JIANRONG *et al.*, 2004; ARAKI, 2007; CASTAÑEDA *et al.*, 2007; ZARBIN, 2007; ZHAO *et al.*, 2013). Estas propriedades conferem a estes materiais elevada área superficial ativa, atividade catalítica e boa condutividade elétrica (CEBRIÁN *et al.*, 2011; ANSARI e HUSAIN *et al.*, 2012; TOKONAMI

et al., 2012; SILVA *et al.*, 2015), características de interesse na construção de novos eletrodos e biossensores eletroquímicos. Diferentes estruturas têm sido investigadas para esta finalidade como, por exemplo, nanopartículas metálicas, nanotubos de carbono, grafeno, nanoplaquetas de grafite, entre outros (PUMERA *et al.*, 2007; ZHANG *et al.*, 2009; FRANZOI *et al.*, 2011; BRONDANI *et al.*, 2013; SILVA *et al.*, 2015).

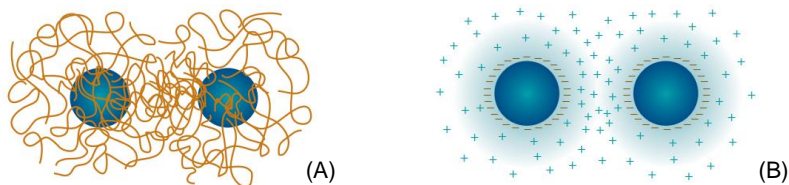
O uso de nanomateriais em biossensores, especialmente nanopartículas metálicas e filmes nanoestruturados, oferecem propriedades vantajosas que podem ser exploradas para melhorar a interação entre o bioelemento e seu substrato, minimizando possíveis mudanças estruturais e melhorando o processo catalítico (JIANRONG *et al.*, 2004). Neste contexto, as nanopartículas de ouro (AuNP) estão entre os materiais mais utilizados, pois além de apresentarem as características únicas de um nanomaterial, também oferecem um ambiente biocompatível para imobilização de enzimas oxidorreduzíveis (como a lacase, por exemplo), preservando a estrutura destas biomoléculas e favorecendo a transferência de elétrons entre a enzima e o eletrodo (GUO e DONG, 2009; FERNANDES *et al.*, 2012; BRONDANI *et al.*, 2013).

Para que possam ser eficientes em aplicações tecnológicas, os materiais nanoestruturados devem ser estáveis de modo a não perder suas propriedades ou sofrer modificações estruturais com o tempo (ZHOU *et al.*, 2005; EASTOR *et al.*, 2006; FRANZOI *et al.*, 2011; SILVA *et al.*, 2015). Devido ao seu pequeno tamanho e sua elevada área superficial, nanopartículas são termodinamicamente instáveis, tendo uma tendência de agregar e crescer espontaneamente. Desta forma, a estabilização dos nanomateriais é indispensável para evitar a aglomeração (coalescência) que leva a formação da estrutura de “*bulk*” metálico (estado de menor

energia), fazendo com que sejam perdidas suas propriedades interessantes relacionadas a dimensão nanométrica (TURKEVICH *et al.*, 1951; FRENS, 1973; BRUST *et al.*, 1995; ASLAN *et al.*, 2002).

Os principais métodos de estabilização de suspensões nanométricas envolvem a proteção estérea e/ou eletrostática a partir do emprego de diferentes materiais tais como polímeros, surfactantes, líquidos iônicos, entre outros (ASLAN *et al.*, 2002, ZHOU, 2005; EASTOE *et al.*, 2006; FRANZOI *et al.*, 2011; SILVA *et al.*, 2015). Na estabilização por efeito estéreo (Figura 7-A), as nanopartículas são revestidas com o agente estabilizante criando uma barreira mecânica que impede a coalescência das partículas. Por outro lado, na estabilização eletrostática (Figura 7-B) as nanoestruturas são envolvidas por um material carregado que impede a agregação das partículas devido às repulsões eletrostáticas. Uma combinação entre os dois métodos promove o favorecimento de dispersões muito estáveis, sendo necessário que o estabilizante seja um composto de cadeia hidrocarbônica longa e que possua carga em sua estrutura, como é o caso dos polímeros de polieletrólitos. Dentro desta classe, podemos citar como exemplo a polietilenoimina (PEI) e a poli(alilamina hidrocloreada) (PAH) que são polímeros catiônicos e a carboximetilcelulose (CMC) que é um polímero aniônico (BRONDANI *et al.*, 2013).

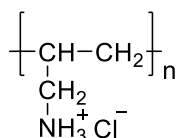
Figura 7. Mecanismos de estabilização de nanopartículas metálica. (A) Estabilização estérica. (B) Estabilização eletrostática.



1.4.1. Poli(alilamina hidrocloreada)

Polímeros que apresentam grupos ionizáveis na cadeia principal como amônio, carboxilato e sulfonato são denominados polieletrólitos. Alguns polieletrólitos são fortemente dependentes do pH da solução e, em meios polares, seus grupos ionizáveis podem dissociar, deixando a cadeia hidrocarbônica carregada e liberando íons na solução. A PAH (Figura 8) é um exemplo de polieletrólito fraco que ao ionizar adquire carga elétrica positiva, sendo desta forma, um policátion (YOO *et al.*, 1998; SHIRATORI e RUBNER, 2000; BARROS, 2006; SALVADOR, 2011). Este polímero é amplamente empregado como estabilizante em sínteses de nanopartículas metálicas, pois combina os efeitos de proteção estérica e eletrostática (SU *et al.*, 2005; SILVA *et al.*, 2015).

Figura 8. Estrutura química do polieletrólito PAH.

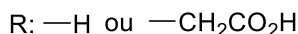
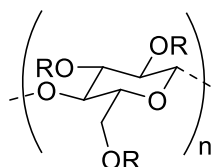


Policátions são comumente empregados na imobilização de algumas enzimas oxirredutases (como a lacase, por exemplo) pois, são capazes de interagir por meio de forças eletrostáticas com a forma aniônica dessas enzimas, em certas condições de pH. Arslan elaborou em 2009 um biossensor para a detecção de ácido úrico a partir da imobilização da enzima uricase em um filme composto por polianilina-polipirrol (PANI-PPY) na superfície de um eletrodo de platina. A faixa linear do biossensor foi de 2,5 a 85,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$, com limite de detecção de 1,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$. O biossensor desenvolvido apresentou boa estabilidade e reprodutibilidade (ARSLAN, 2009). Em 2013, Brondani e colaboradores utilizaram AuNPs revestidas com PEI como plataforma para a imobilização da enzima LAC. Esse material bionanoestruturado foi empregado em forma de filme sobre a superfície de um eletrodo de carbono vítreo e o biossensor proposto foi aplicado na quantificação de catecol em amostras de água fortificadas, exibindo boa sensibilidade e baixo limite de detecção (0,03 $\mu\text{mol L}^{-1}$) (BRONDANI *et al.*, 2013). Estes estudos publicados na literatura, demonstram que a estratégia de imobilização de enzimas em policátions pode ser bastante promissora. Vale ressaltar que a modificação de eletrodos com enzimas imobilizadas costuma trazer grandes vantagens frente aos construídos com enzima livre, visto que apresentam uma estabilidade muito superior, permitindo uma melhoria na sensibilidade e reprodutibilidade do biossensor (ROCHEFORT *et al.*, 2008; BRONDANI *et al.*, 2013).

1.4.2. Carboximetilcelulose

A carboximetilcelulose, CMC (Figura 9), um dos mais importantes derivados da celulose, é um polímero aniônico biodegradável, altamente solúvel em água, sendo amplamente utilizado nas indústrias farmacêutica e alimentícia.

Figura 9. Estrutura química do polieletrólito CMC.



O uso de polímeros biodegradáveis (quitosana, amido, CMC, entre outros) como estabilizante de nanopartículas, tem atraído muita atenção nos últimos anos devido a sua ampla disponibilidade, compatibilidade ambiental e baixo custo (HE e ZHAO *et al.*, 2007; SHI *et. al.*, 2008; AHAMED *et. al.*, 2011; PANDEY *et. al.*, 2012; CHEVIRONA *et. al.*, 2014; GASTONE *et al.*, 2014; LOFRANO *et. al.*, 2016). Além disso, estas matrizes podem favorecer a adesão dos nanomateriais às superfícies, levando à formação de filmes nanoestruturados estáveis e biocompatíveis (SHI *et. al.*, 2008; AHAMED *et. al.*, 2011; PANDEY *et. al.*, 2012).

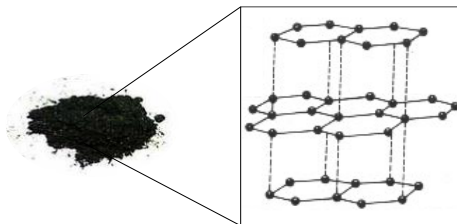
A presença de biopolímeros em suspensões permite a dispersão de outros nanomateriais como os nanotubos de carbono, nanoplaquetas de

grafite e grafeno, dando origem a nanocompósitos híbridos multifuncionais com aplicações em biomedicina, bioengenharia e química verde (LU *et. al.*, 2010; KANG *et. al.*, 2010; LI e ZHONG, 2011).

1.4.3. Nanoplaquetas de grafite exfoliadas

A grafite, Figura 10, é uma das formas alotrópicas do carbono com estrutura lamelar composta por infinitas camadas de átomos que apresentam hibridização sp^2 , conhecidas como camadas de grafeno. Esta configuração garante sua excelente condutividade eletrônica, característica muito apreciável para aplicação em eletrodos. No entanto, também é a responsável pela baixa dispersibilidade em meio aquoso, regida pelas interações de *Van der Waals* entre as camadas de grafeno que compõem sua estrutura (PUMERA, *et. al.*, 2007; BARNES, *et. al.*, 2007; SÂNDULESCU *et. al.*, 2015).

Figura 10. Representação esquemática da estrutura da grafite.



Nanoplaquetas podem ser obtidas a partir da exfoliação de grafite por um processo de custo inferior à produção de nanotubos de carbono e

grafeno (GENG *et. al.*, 2009; SĂNDULESCU *et. al.*, 2015). E, mesmo assim, as nanoplaquetas de grafite podem apresentar propriedades similares a desses materiais, como por exemplo, a elevada condutividade térmica e elétrica que são atribuídas a sua estrutura lamelar. Quando utilizada no preparo de eletrodos, as nanoplaquetas de grafite exfoliadas (xGnPs) conferem uma melhora na condutividade do dispositivo, o que acarreta em um aumento na sensibilidade de detecção. Estes eletrodos podem ser aplicados na determinação de uma grande variedade compostos de relevância ambiental, alimentar e biológica (como as catecolaminas, por exemplo) (ZANATO *et. al.*, 2017).

1.5. CATECOLAMINAS

Catecolaminas são compostos orgânicos que contém um núcleo catecol (fenol constituído por 2 grupos -OH ligados ao benzeno) ligado a um grupo amina. Dentre as principais moléculas que constituem essa classe de compostos, é possível destacar a dopamina e seus precursores (como a levodopa, por exemplo), epinefrina (adrenalina) e a noradrenalina (norepinefrina) (GOODMAN *et al.*, 2003; AMORIM *et al.*, 2007)

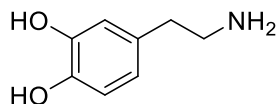
As catecolaminas desempenham importante papel como neurotransmissores e homônimos, exibindo efeitos excitatórios e inibitórios no sistema nervoso periférico e no sistema nervoso central (NALEWAJKO *et al.*, 2007; SHAI DAROVA *et al.*, 2008). Estas moléculas podem influenciar a taxa metabólica, tanto por interferência na função endócrina como na secreção de insulina, por exemplo. Além disso, são marcadores importantes para o diagnóstico de muitas doenças como

esquizofrenia e doença de Parkinson, (SZEAPONIK *et al.*, 1997; KATZUNG, 1998).

1.5.1. Dopamina

A dopamina, Figura 11, é uma catecolamina que apresenta papel fundamental no funcionamento do sistema nervoso central, pois está diretamente envolvida no controle das funções motora, endócrina, de recompensa e de cognição (OAK *et al.*, 2000; SOLICH *et al.*, 2000; CHEN e LIU, 2005; GOUYAL e BISOLI, 2011; HUANG *et al.*, 2014; IKEMOTO *et al.*, 2015). Uma desregulação do sistema dopaminérgico pode causar hiperatividade, déficit de atenção, desordens de humor e doenças neurodegenerativas (Alzheimer, esquizofrenia e Parkinson). Assim, a quantificação deste neurotransmissor é fundamental para o diagnóstico, monitoramento e intervenção farmacológica de diversos distúrbios (OAK *et al.*, 2000; MOCELLINI *et al.*, 2008; ADEKUNLE *et al.*, 2010). No Brasil sua comercialização geralmente é feita na forma de ampolas injetáveis contendo 5,0 mg mL⁻¹ de cloridrato de dopamina. Desta forma, uma atenção especial deve ser dada ao controle de qualidade dessas formulações.

Figura 11. Estrutura química da dopamina.



Diversas técnicas analíticas são empregadas para quantificar dopamina em amostras farmacêuticas e fluidos biológicos e, dentre as quais estão incluídas a espectrofotometria (SOLICH *et al.*, 2000; MONIRUZZAMAN *et al.*, 2010), a cromatografia (CHEN e LIU, 2005; FERREIRA *et al.*, 2009), a quimioluminescência (LUI *et al.*, 2012), a eletroforese capilar (VUORENSOLA *et al.*, 2003; WEI *et al.*, 2005) e os métodos eletroquímicos (SUN *et al.*, 2007; MOCELLINI *et al.*, 2008; JOSHI *et al.*, 2012; YANG *et al.*, 2012; WANG *et al.*, 2014). No entanto, muitas destas técnicas envolvem pré-tratamento das amostras, alto tempo de análise e custo elevado. Neste sentido, a aplicação de técnicas eletroanalíticas associadas com eletrodos quimicamente modificados são uma alternativa atraente devido ao seu baixo custo, rápido tempo de análise, bons limites de detecção, precisão e elevada sensibilidade (SOLICH *et al.*, 2000, CHERNYSHOV *et al.*, 2008; IZAOUEN *et al.*, 2009; ENSAFI *et al.*, 2011; GOYAL e BISHNOI, 2011).

Muitos trabalhos recentes mostram a utilização de técnicas eletroquímicas na determinação de dopamina em amostras farmacêuticas e em fluidos biológicos, combinadas ao desenvolvimento de eletrodos com diferentes estratégias de modificação (enzimas, nanomateriais, filmes organizados, entre outros) (ROSSATO *et al.*, 2001; FREIRE *et al.*, 2003; KATO *et al.*, 2005; CODOGNOTO *et al.*, 2007; MOCELLINI *et al.*, 2008; MANJUNATHA *et al.*, 2010). Raghu e colaboradores construíram um biossensor para a determinação de dopamina baseado na combinação entre a enzima peroxidase e nanotubos de carbono imobilizados em filme de poli(Gli), construído a partir da polimerização de glicina por voltametria cíclica. O método proposto apresentou boa

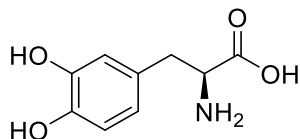
sensibilidade e baixo limite de detecção ($0,6 \mu\text{mol L}^{-1}$) (RAGHU *et al.*, 2014).

Em fluidos biológicos, a dopamina coexiste com ácido úrico e ácido ascórbico. Assim, muitos autores investigam o efeito destas substâncias sobre a resposta analítica de dopamina e propõem a determinação simultânea desses analitos (MANJUNATHA *et al.*, 2010; LIU, *et al.*, 2012; YANG, *et al.*, 2012; ZOU *et al.* 2015). Em um estudo feito por Zou e colaboradores, foi desenvolvido um biossensor funcionalizado com H-GO (compósito de hemina em folhas de grafeno) para a determinação simultânea de ácido ascórbico (AA), dopamina (DA) e ácido úrico (UA). O biossensor proposto apresentou boa seletividade, alcançando a determinação simultânea dos três tipos de moléculas com limites de detecção de $0,3 \mu\text{mol L}^{-1}$ para AA; $0,17 \mu\text{mol L}^{-1}$ para DA e $0,17 \mu\text{mol L}^{-1}$ para UA (ZOU *et al.*, 2015).

1.5.2. Levodopa

A levodopa (Figura 12) é uma catecolamina utilizada como medicamento de longo prazo para o tratamento dos sintomas da doença de Parkinson, segunda doença neurodegenerativa mais comum em todo o mundo (CONNOLLY, 2014; LIN *et al.*, 2015).

Figura 12. Estrutura química da levodopa.



O mal de Parkinson é uma doença crônica e progressiva, sendo caracterizada por um déficit de dopamina no cérebro, algo que afeta em torno 1% da população com mais de 60 anos. Clinicamente se manifesta por meio de tremor, rigidez, postura flexionada e instabilidade postural (CONNOLLY, 2014; FAHN *et. al.*, 2004). Uma terapia com levodopa, embora não seja alterado o processo neurodegenerativo subjacente, pode melhorar a qualidade de vida do portador da doença. Isto porque, a terapia com levodopa trabalha para reabastecer a dopamina que não pode ser administrada, pois não é capaz de ultrapassar a barreira hematoencefálica. A levodopa, por sua vez, é capaz de quebrar a barreira hematoencefálica quando absorvida na corrente sanguínea sendo transportada para o cérebro, onde é convertida em dopamina pela enzima dopa-descarboxilase (FAHN *et. al.*, 2004). Desta forma, o déficit de dopamina é corrigido, porém de forma inespecífica (PARKINSON STUDY GROUP, 2004; FAHN *et. al.*, 2004).

Devido a relevância clínica e farmacológica da levodopa é de suma importância o desenvolvimento de métodos analíticos precisos, simples e rápidos para a sua determinação em formulações farmacêuticas (BEITOLLAHI *et. al.*, 2011; LIN *et al.*, 2015). Vários métodos descritos na literatura para determinação de levodopa utilizam técnicas de espectrofotometria (CHAMSAZ *et. al.*, 2007; ABDEL-GHANY *et. al.*, 2017), cromatografia (MILLER *et. al.*, 1993; BRANOWSKA e PLONKA, 2008), entre outras (CHEN *et. al.*, 2005; ZHAO *et. al.*, 2007). Entretanto, as técnicas mencionadas possuem alto custo de instrumentação e reagentes. Neste sentido, os métodos eletroquímicos vêm ganhando destaque pois fornecem desempenho analítico notável

com a vantagem de apresentarem baixo custo (WANG *et. al.*, 2013; REZAEI *et. al.*, 2016).

Benvidi e colaboradores desenvolveram um eletrodo quimicamente modificado para determinar simultaneamente levodopa, ácido úrico e ácido fólico. O dispositivo foi preparado a partir da modificação de um eletrodo de carbono vítreo com uma monocamada automontada de óxido de grafeno (RGO), nanopartículas de ouro (AuNP) e 2-(3,4-di-hidroxi fenil) benzotiazole (DHB). O método apresentou boa repetibilidade, estabilidade e baixo limite de detecção para levodopa ($18,0 \text{ nmol L}^{-1}$) (BENVIDI *et. al.*, 2015). No trabalho de Takeda e colaboradores um novo eletrodo para a detecção de levodopa e carbidopa foi construído a partir da modificação da superfície de um eletrodo de carbono vítreo com nanotubos de carbono de paredes múltiplas funcionalizadas (MWCNT) imobilizados em um filme de poli(alilamina hidrocloreto)(PAH). As curvas de calibração obtidas por voltametria de pulso diferencial foram lineares de $2,0$ a $27,0 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ para a levodopa e de $2,0$ a $23,0 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ para a carbidopa, com limites de detecção de $0,84 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ e $0,65 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$, respectivamente. O método proposto foi empregado com sucesso para a determinação de levodopa e carbidopa (com a um nível de confiança de 95%) (TAKEDA *et. al.*, 2016). Um eletrodo para a detecção de levodopa baseado em um filme de quitosana com dopagem de grafeno impresso, foi desenvolvido por Lin e colaboradores. O eletrodo exibiu seletividade e baixo limite de detecção para a levodopa ($0,012 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$), demonstrando ser promissor para a determinação deste analito em amostras farmacêuticas e plasma sanguíneo humano com recuperações variando de 95,0 a 108,0% (LIN, *et. al.*, 2015).

1.6. ELETRODOS DE CARBONO

Por apresentarem características interessantes como ampla janela de potencial, inércia eletroquímica e boa estabilidade térmica, eletrodos a base de carbono costumam ser muito utilizados em eletroanálises. Outro ponto positivo da utilização deste substrato, está na possibilidade de modificar seu material interno/superfície com uma grande variedade de compostos (materiais nanoestruturados, biomateriais, polímeros, líquidos iônicos, entre outros), característica muito apreciável quando se busca o desenvolvimento de EQMs e biossensores cada vez mais sensíveis (SZUNERITS e BOUKHERROUB, 2008; OISHI, 2009). Dentre os substratos mais utilizados nos eletrodos de carbono, destacam-se o carbono vítreo, a pasta de carbono, o diamante dopado com boro e os eletrodos de carbono impressos (SZUNERITS e BOUKHERROUB, 2008).

1.6.1. Eletrodo de pasta de carbono

O eletrodo de pasta de carbono (CPE – *carbono paste electrode*) consiste basicamente em uma pasta homogeneizada, formada por pó de grafite com alta pureza química e baixa capacidade de adsorção de impurezas eletroativas e um aglutinante não condutor (óleo mineral, em geral), que impede que a pasta seja lixiviada para a solução. O contato elétrico desse eletrodo é estabelecido por um fio de cobre (PEREIRA *et al.*, 2002).

Os eletrodos preparados a base de pasta de carbono apresentam algumas vantagens sobre os demais substratos (ouro, platina, carbono

vítreo) como baixo custo e facilidade de renovação da superfície. Além disso, é possível realizar uma grande variedade de modificação do seu material interno com materiais biológicos, nanomateriais, complexos metálicos, moléculas anfifílicas, por exemplo. Estas modificações podem ajudar a diminuir o limite de detecção e aumentar a seletividade das determinações (LUI e ABRUÑA *et al.*, 1989; OLIVEIRA *et al.*, 2006; FRANSOI *et al.*, 2011; ZAPP *et al.*, 2011; PUSH *et al.*, 2013).

O CPE também pode ser construído com a substituição (total ou parcial) do óleo mineral por um líquido iônico hidrofóbico (IL - *ionic liquid*) que melhora as propriedades do eletrodo, devido especialmente a alta condutividade desses materiais, incluindo aumento da sensibilidade analítica e da reversibilidade das reações (LUI *et al.*, 2005; WEI e IVASKA, 2008; FRANZOI *et al.*, 2011; OPALLO e LESNIEWSKI, 2011).

Sun e colaboradores desenvolveram um eletrodo a base de pasta de carbono com substituição total do aglutinante (parafina, neste caso) pelo líquido iônico hexafluorofosfato de n-butil piridina (BPPF₆). Este eletrodo foi aplicado na determinação de dopamina em amostras farmacológicas injetáveis. O eletrodo demonstrou limite de detecção de 0,70 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e baixa interferência sendo capaz de distinguir compostos que normalmente coexistem em fluidos biológicos (ácido ascórbico, ácido úrico e dopamina) (SUN *et al.*, 2007). Zapp e colaboradores propuseram um biossensor, a base de pasta de carbono, composto por nanopartículas de ouro estabilizadas em líquido iônico hidrofóbico (Au-BMI.PF₆) e enzima peroxidase imobilizada em argila para a determinação de compostos fenólicos em amostras de chá preto. Após a otimização do método, o biossensor apresentou limite de detecção de 0,11

$\mu\text{mol L}^{-1}$ e boa repetibilidade entre as medidas. Neste caso, o aglutinante (óleo mineral nujol) foi substituído parcialmente pelo IL (ZAPP *et al.*, 2011).

1.6.2. Eletrodo de carbono vítreo

O carbono vítreo pode ser considerado um material com grande importância tecnológica pois apresenta propriedades muito atrativas nas quais se destacam a excelente condutividade elétrica e térmica, a biocompatibilidade, a inércia química, a baixa porosidade (impermeabilidade a gás), a superfície polida e a boa rigidez mecânica, podendo ser aplicado nas indústrias médicas, aeroespacial e química, por exemplo (BOTELHO *et al.*, 2001; GONÇALVES, 2007).

O carbono vítreo está entre os substratos mais utilizados em eletroanálises, pois oferece ampla janela de potencial de trabalho, baixa corrente capacitiva, boa condutividade e biocompatibilidade, além de ser quimicamente inerte. Estas características também favorecem a modificação da superfície de eletrodos de carbono vítreo (GCE) com materiais que são capazes de melhorar ainda mais o desempenho deste eletrodo (SUN, 2006; ZUCONELLI, 2009).

Wang e colaboradores depositaram folhas de grafeno sobre a superfície de um GCE e utilizaram este eletrodo modificado na detecção de levodopa e carbidopa em fármacos. As correntes de pico mostraram uma resposta linear para ambas as catecolaminas na faixa de 1-16 $\mu\text{mol L}^{-1}$ com limite de detecção de 0,80 $\mu\text{mol L}^{-1}$ para a levodopa e 1,80 $\mu\text{mol L}^{-1}$, para a carbidopa (WANG *et al.*; 2013). Zanato e colaboradores utilizaram um GCE como plataforma para a fabricação de um

imunossensor sem marcação (*label-free*) para a microcistina-LR, baseado em nanoplaquetas de grafite exfoliadas e nanopartículas de prata. O imunossensor foi aplicado na detecção de MC-LR em água do mar com limite de detecção de $0,017 \text{ ng mL}^{-1}$ (ZANATO *et. al.*; 2017).

CAPÍTULO 2: OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Aplicar materiais nanoestruturados (nanopartículas metálicas e nanoplaquetas de grafite exfoliadas) no desenvolvimento de novos eletrodos para a determinação de dopamina e levodopa em fármacos.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

2.2.1. Biossensor constituído por nanopartículas de ouro estabilizadas em poli(alilamina hidrocloreada) e decoradas com lacase para a determinação de dopamina

- Obter uma solução enzimática da LAC, produzida por microrganismos geneticamente modificados (*Aspergillus oryzae*), a partir de microesferas;
- Determinar a atividade da enzima pelo método espectrofotométrico;
- Sintetizar nanopartículas de ouro (AuNP) estabilizadas em poli(alilamina hidrocloreada) (PAH);
- Caracterizar o nanomaterial por microscopia eletrônica de transmissão (TEM), potencial Zeta e espectrofotometria UV-Vis;
- Imobilizar a enzima no suporte nanoestruturado;
- Construir um biossensor a partir da modificação interna de um eletrodo de pasta de carbono com LAC imobilizada em AuNP-PAH;

- Otimizar os parâmetros experimentais do método: natureza e pH do eletrólito suporte, proporção dos modificadores e parâmetros da técnica voltamétrica escolhida;
- Investigar a contribuição de cada material modificador, separadamente, sobre o desempenho analítico do biossensor;
- Realizar estudos eletroquímicos (CV e EIS) para caracterizar o biossensor;
- Avaliar a seletividade do método proposto por estudos de interferentes;
- Avaliar a precisão por estudos de repetibilidade (intra-dia e inter-dia) e repetibilidade entre eletrodos;
- Avaliar a estabilidade do biossensor proposto;
- Aplicar o biossensor na determinação de dopamina em formulações farmacêuticas e comparar os resultados com um método oficial ou comparativo.

2.2.2. Eletrodo quimicamente modificado com nanoplaquetas de grafite exfoliadas e nanopartículas de ouro estabilizadas em carboximetilcelulose para a determinação de levodopa

- Sintetizar nanopartículas de ouro (AuNP) estabilizadas em carboximetilcelulose (CMC);
- Preparar um nanocompósito híbrido (AuNP-CMC-xGnP), a partir da dispersão de xGnP em AuNP-CMC;
- Caracterizar os nanomateriais por TEM, potencial Zeta e espectrofotometria UV-vis;

- Caracterizar a morfologia da superfície do eletrodo nanoestruturado por microscopia eletrônica de varredura com emissão de campo (SEM-FEG);
- Construir um eletrodo a partir da modificação da superfície de um eletrodo de carbono vítreo com filme de AuNP-CMC-xGnP;
- Otimizar os parâmetros experimentais do método (natureza e o pH do eletrólito de suporte, proporção dos modificadores e os parâmetros da técnica voltamétrica escolhida);
- Construir diferentes eletrodos a fim de investigar a contribuição individual de cada nanomaterial utilizado como modificador;
- Realizar estudos eletroquímicos (CV e EIS) para a caracterização do eletrodo;
- Avaliar a seletividade da metodologia por estudos de interferentes;
- Investigar a precisão a partir de estudos de repetibilidade (intra-dia e entre eletrodos);
- Aplicar o eletrodo proposto na quantificação de levodopa em amostra de fármaco e comparar os resultados com um método espectrofotométrico utilizado como referência.

CAPÍTULO 3: BIOSSENSOR CONSTITUÍDO POR NANOPARTÍCULAS DE OURO ESTABILIZADAS EM POLI(ALILAMINA HIDROCLORADA) E DECORADAS COM LACASE PARA A DETERMINAÇÃO DE DOPAMINA

Publicado em: Analyst, 141, 216–224, 2016.

3.1. INTRODUÇÃO

Nos últimos anos uma atenção considerável tem sido dada à aplicação de AuNPs em sistemas de biossensoriamento (CASTAÑEDA *et. al.*, 2007; ANSARI e HUSAIN, 2012). Isso porque, além de apresentarem atividade catalítica e boa condutividade elétrica, estas nanopartículas também apresentam biocompatibilidade, baixa citotoxicidade e ampla área superficial para interação com biomoléculas, o que as tornam excelentes plataformas para a imobilização de enzimas como a lacase, por exemplo (PUMERA *et. al.*, 2011). Devido a sua capacidade de catalisar reações de oxidação, a LAC é frequentemente utilizada na construção de biossensores para a quantificação de uma grande variedade de compostos fenólicos, nos quais incluem as catecolaminas como a dopamina (RIVA, 2006; FERNANDES *et. al.*, 2013).

A dopamina desempenha importante papel no sistema nervoso central, controlando funções endócrinas e motoras (GOUYAL e BISOLI, 2011). Desta forma, o desenvolvimento de métodos sensíveis capazes de quantificar dopamina é fundamental para auxiliar no diagnóstico e na intervenção farmacológica de uma série de doenças (OAK *et al.*, 2000; ADEKUNLE *et al.*, 2010).

Neste trabalho, AuNP-PAH foram sintetizadas, caracterizadas e utilizadas como plataforma para a imobilização da LAC. O nanomaterial, AuNP-PAH-LAC, foi aplicado com sucesso no desenvolvimento de um novo biossensor para a determinação de dopamina em amostras farmacêuticas por SWV.

3.2. PARTE EXPERIMENTAL

3.2.1. Regentes e soluções

Todos os reagentes utilizados no preparo das soluções foram obtidos comercialmente em grau analítico e não passaram por etapas extras de purificação. As soluções foram preparadas diariamente utilizando água ultrapura, obtida de um sistema Milli-Q (Millipore, EUA) com resistividade de $18,2 \text{ M}\Omega \text{ cm}^{-1}$.

Poli(alilamina hidrocloreada) (PAH, $\text{MM} \approx 58\,000 \text{ g mol}^{-1}$), ácido cloroáurico (HAuCl_4), borohidreto de sódio (NaBH_4), ferricianeto de potássio ($\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$), ferrocianeto de potássio ($\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$), 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato) (ABTS), ácido ascórbico, ácido cítrico, ácido úrico, glicose, cafeína, dopamina, carbidopa, epinefrina e levodopa foram obtidos de Sigma-Aldrich. Enzima LAC, produzida por microrganismos geneticamente modificados (*Aspergillus oryzae*), foi fornecida pela Novozymes (Dinamarca) sob o nome comercial Denilite II BASE.

Solução padrão aquosa de dopamina ($1,0 \text{ mmol L}^{-1}$) foi preparada diariamente antes de cada estudo. Soluções de menor concentração foram preparadas a partir desta solução estoque, por diluição apropriada.

Soluções de outras catecolaminas (epinefrina, levodopa e carbidopa) foram preparadas de maneira semelhante e utilizadas no estudo de interferentes. Soluções tampão fosfato ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$), preparada pela mistura de monohidrogenofosfato e dihidrogenofosfato de potássio, e tampão acetato ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$), preparada pela mistura de acetato de sódio e ácido acético, foram utilizadas nos estudos de pH. O ajuste do pH destas soluções foi realizado, quando necessário, através da adição de hidróxido de sódio, ácido fosfórico ou ácido acético. Soluções aquosas de NaBH_4 (20 mmol L^{-1}), HAuCl_4 ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$) e PAH (0,25 %; m/v) foram utilizadas na síntese das nanopartículas de ouro. Duas amostras de cloridrato de dopamina injetável ($5,0 \text{ mg mL}^{-1}$) (A e B) foram fornecidas pelo Hospital Universitário da Universidade Federal de Santa Catarina (HU-UFSC).

Para a construção do biossensor foi utilizado pó de grafite (Acheson 38, Fisher Scientific) como condutor, óleo mineral nujol (Aldrich) como agente aglutinante e AuNP-PAH-LAC como modificador.

3.2.2. Instrumentação e eletrodos

Medidas de voltametria de onda quadrada (SWV), voltametria de pulso diferencial (DPV), voltametria linear (LSV) e voltametria cíclica (CV) foram realizadas em um potenciostato/galvanostato (Autolab PGSTAT 101) acoplado ao software NOVA (versão 1.10) para a aquisição dos dados. Medidas de espectrometria de impedância eletroquímica (EIS) foram realizadas em um potenciostato/galvanostato (Autolab PGSTAT128N) com módulo de impedância FRA. Medidas de

pH foram realizadas utilizando um pHmetro da Micronal modelo B-475 contendo um eletrodo de vidro combinado. Um banho de ultrassom, Unique 1400A, foi utilizado no preparo das soluções e amostras. As imagens de TEM foram realizadas no Laboratório Central de Microscopia Eletrônica da Universidade Federal de Santa Catarina (LCME-UFSC) utilizando um microscópio eletrônico JEOL JEM-1011 operando a 100 keV. O potencial Zeta foi obtido utilizando um sistema de Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, UK). Medidas espectrofotométricas foram obtidas com um espectrofotômetro UV-vis Cary 60 (Agilent Technologies, EUA).

3.2.3. Obtenção da solução enzimática e determinação da atividade

Para o preparo da solução enzimática, 5,0 g de LAC imobilizadas em microcápsulas foram maceradas no decorrer de 30 minutos com auxílio de almofariz e pistilo. Este material foi transferido a um béquer contendo 50 mL de solução tampão acetato ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$; pH 5,0), onde foi submetido a agitação magnética durante 25 minutos à temperatura ambiente ($\approx 25 \text{ }^\circ\text{C}$). Na sequência, a mistura foi filtrada utilizando um papel filtro preguiado de porosidade de 14,0 mM e armazenada em um frasco âmbar sob refrigeração a baixa temperatura ($\approx 4 \text{ }^\circ\text{C}$) para preservar a atividade enzimática. A solução enzimática obtida foi utilizada como fonte de LAC para a construção dos biossensores.

A atividade da enzima foi determinada por espectrofotometria UV-vis em 420 nm acompanhando a variação da absorvância da reação de oxidação do substrato ABTS (verde claro) pela LAC, com formação do cátion radical $\text{ABTS}^{\cdot+}$ (azul-esverdeado forte). Em uma cubeta de quartzo

com capacidade para 3,0 mL foram adicionados 2,8 mL da solução de ABTS ($0,50 \text{ mmol L}^{-1}$) e 0,20 mL da solução enzimática diluída (100x). As medidas de absorvância foram realizadas em triplicatas e sua média utilizada para construir o gráfico de absorvância vs. tempo (min). Os valores foram registrados a cada 20 segundos, do início da reação, até que se completasse 3 minutos (MINUSSI *et al.*, 2003; COUTO *et al.*, 2006).

3.2.4. Síntese e caracterização das AuNP-PAH e AuNP-PAH-LAC

AuNP-PAH foram sintetizadas a partir do seguinte procedimento: 200 μL de uma solução aquosa de HAuCl_4 ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$) foram adicionados a 10,0 mL de uma solução aquosa de PAH 0,25% (m/v), mantendo agitação mecânica durante 10 minutos. Após este tempo, 400 μL de uma solução aquosa de NaBH_4 ($0,02 \text{ mol L}^{-1}$) foram adicionados vigorosamente a mistura, mantendo a agitação mecânica por aproximadamente 45 minutos. Ao final da reação, obteve-se uma dispersão com coloração vermelha intensa característica de AuNPs. A formação de AuNP-PAH foi confirmada por espectrometria UV-vis e TEM. Após a síntese, a dispersão de AuNP-PAH foi pré-concentrada 10 vezes, com o auxílio de uma centrifuga (15000 rpm à 4°C) (SILVA *et al.*, 2015).

A caracterização do nanomaterial foi feita por espectrofotometria UV-vis, potencial Zeta e TEM. As amostras para as análises de TEM foram preparadas por deposição das dispersões em um “gride” de cobre revestido com carbono. O tamanho médio das partículas foi determinado por contagem de aproximadamente 300 partículas, usando o software ImageJ (SCHNEIDER *et al.*, 2012).

A imobilização da enzima no nanomaterial foi realizada pela mistura da solução enzimática com a dispersão de AuNP-PAH pré-concentrada (1:1, v/v), acompanhada pela mudança na cor da dispersão de vermelha para violeta. AuNP-PAH-LAC foram utilizadas na construção de um novo biossensor para a determinação de dopamina.

3.2.5. Construção do biossensor

O biossensor proposto foi preparado a partir da modificação do material interno de um eletrodo de pasta de carbono (CPE) no decorrer de 4 etapas. Primeiro, 50 μ L da dispersão de AuNP-PAH-LAC (1:1, v/v) foram adicionados a 150 mg de grafite em pó (etapa de adsorção do nanomaterial no material condutor). Esta mistura ficou em um dessecador sob vácuo por aproximadamente 30 minutos (etapa de secagem). Na etapa de homogeneização, 50 mg de óleo mineral (nujol) foram adicionados e a mistura macerada por 10 minutos com o auxílio de almofariz e pistilo. Por fim, a pasta obtida foi transferida para uma seringa de plástico (capacidade: 1,0 mL; diâmetro interno: 1,0 mm) e um fio de cobre foi inserido para estabelecer o contato elétrico (etapa de construção). O biossensor preparado (AuNp-PAH-LAC/CPE) foi utilizado como o eletrodo de trabalho e aplicado no desenvolvimento de uma metodologia eletroanalítica para a determinação de dopamina em fármacos.

Outros eletrodos também foram construídos, de maneira semelhante ao biossensor proposto, a fim de avaliar a contribuição de cada modificador separadamente. Quatro diferentes eletrodos foram preparados: um eletrodo de pasta de carbono convencional (CPE – eletrodo sem modificação), um eletrodo modificado com PAH

(PAH/CPE), um eletrodo modificado com AuNP-PAH (AuNP-PAH/CPE) e um biossensor modificado com LAC livre (LAC/CPE). Todas as proporções dos modificadores utilizados na construção dos eletrodos foram estudadas a fim de se obter a melhor resposta analítica.

3.2.6. Medidas eletroquímicas

As medidas eletroquímicas (CV, SWV, DPV, LSV e EIS) foram realizadas à temperatura ambiente ($\approx 25\text{ }^{\circ}\text{C}$) em uma célula contendo 10,0 mL do eletrólito de suporte e o volume requerido da solução padrão ou da amostra. Todos os experimentos foram feitos empregando o sistema convencional de três eletrodos: o biossensor como eletrodo de trabalho, uma placa de platina como eletrodo auxiliar e um eletrodo de Ag/AgCl (KCl 3,0 mol L⁻¹) como eletrodo de referência. Antes das medidas as soluções foram agitadas por 60 segundos.

3.2.7. Preparo da amostra e determinação de dopamina em fármaco

Amostras de cloridrato de dopamina injetável (A e B) foram fornecidas pelo Hospital Universitário da Universidade Federal de Santa Catarina (HU-UFSC) e aplicadas na determinação de dopamina utilizando o biossensor proposto e um método de referência (UNITED STATES PHARMACOPEIA NATIONAL FORMULARY, 1995). O método de adição padrão foi utilizado para a determinação de dopamina empregando a SWV com seus parâmetros otimizados (frequência de 10 Hz, amplitude de 60 mV e incremento de 5 mV). Alíquotas das amostras previamente preparadas e diluídas foram transferidas para uma célula

eletroquímica contendo 10 mL do eletrólito de suporte (tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹; pH 6,0) e o teor de dopamina foi determinado após sucessivas adições de uma solução padrão de dopamina (1,0 mmol L⁻¹). Todas as medidas foram realizadas em triplicatas e a quantificação foi baseada nas correntes resultantes (em potencial de aproximadamente +0,17 V vs. Ag/AgCl). Para fins de comparação, as amostras também foram analisadas pelo método espectrofotométrico padrão recomendado pela farmacopéia americana para a determinação de dopamina em amostras farmacêuticas.

3.3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

3.3.1. Determinação da atividade e avaliação da estabilidade enzimática

A atividade enzimática (unidades mL⁻¹) pode ser definida como a quantidade de enzima necessária para oxidar 1 μmol de substrato por minuto nas condições estabelecidas no ensaio (temperatura, pH e concentração do substrato). Desta forma, a atividade da enzima é um parâmetro importante para avaliar a sua atividade catalítica (BOURBONNAIS *et al.*, 1998).

A atividade da LAC foi determinada por espectrofotometria UV-vis no comprimento de onda de 420 nm, acompanhando a variação de absorvância no decorrer da reação de oxidação do substrato ABTS ($\epsilon = 36.000 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), que possui cor verde clara, pela enzima, com formação do cátion radical ABTS^{•+} (Figura 13), que apresenta cor azul esverdeada intensa, conforme descrito na seção 3.2.3.

Figura 13. Reação de oxidação do ABTS pela LAC, com a formação do cátion radical ABTS^{•+} (adaptado de CHILDS e BARDSLEY, 1975).

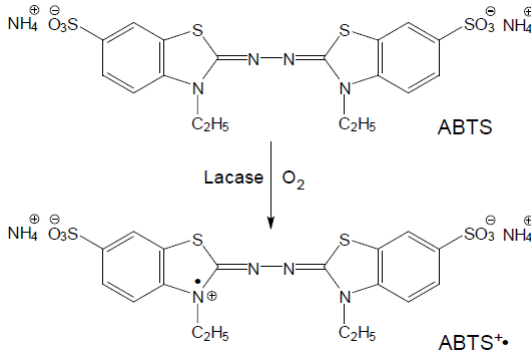
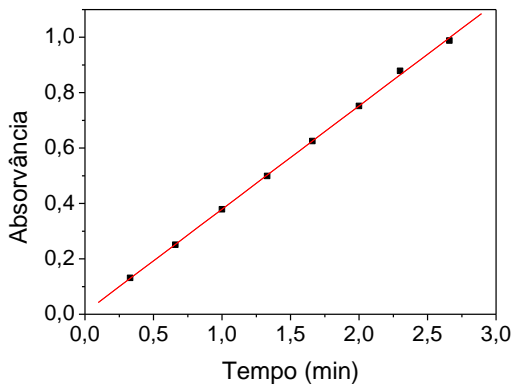


Figura 14. Variação da absorvância do cátion radical ABTS^{•+} formado na reação de oxidação do ABTS pela LAC em função do tempo.



$$Atividade = \frac{\Delta Abs \ t^{-1}}{\epsilon \ b} \times V_t \times \frac{1}{V_e} \times 1000 \times FD \quad (1)$$

Onde:

Atividade = atividade enzimática (unidade mL⁻¹; unidade = μmol min⁻¹)

ΔAbs t⁻¹ = variação da absorvância com o tempo (min⁻¹)

ε 420nm = absorvância molar do ABTS (36.000 L mol⁻¹ cm⁻¹)

b = caminho óptico (1 cm)

VT = volume total utilizado no ensaio (mL)

VE = volume da solução enzimática (mL)

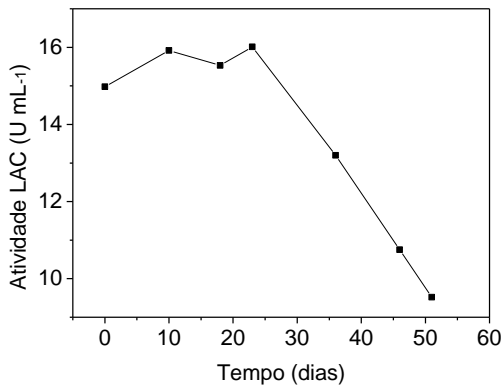
FD = fator de diluição (diluição da solução de LAC: 100x)

A partir da inclinação do gráfico de absorvância *vs.* tempo (Figura 14), foi possível calcular a atividade da LAC de acordo com a equação 1. Considerando a equação da reta: $Abs = 6,45 \times 10^{-3} \pm 5,92 \times 10^{-3} + 0,373 \pm 3,63 \times 10^{-3} t$, ($r^2 = 0,9997$) onde Abs corresponde a absorvância e t ao tempo em minutos, o valor médio obtido nesse estudo foi de aproximadamente 15,5 unidades de LAC por mililitro de solução enzimática. Este valor é considerado apropriado para este tipo de enzima e está de acordo com os obtidos na literatura por Brondani e colaboradores (17,1 U/mL) e Franzoi (14,6 U/mL) (FRANZOI, 2011; BRONDANI *et al.*, 2013)

Para avaliar a estabilidade da solução enzimática (estocada sob refrigeração à 4 °C) com o decorrer do tempo, corridas cinéticas foram realizadas em um período de 50 dias desde a preparação da solução. Os resultados deste estudo estão apresentados na Figura 15, que fornece a relação entre a atividade enzimática e o período de estocagem da solução. Como pode ser observado, nos primeiros 25 dias não houve perda significativa da atividade. Porém, uma diminuição considerável da atividade enzimática foi observada após esse período, sendo reduzida a

cerca de 60% de seu valor inicial em 50 dias. Portanto, para assegurar uma boa reprodutibilidade e desempenho analítico, os biossensores foram construídos com soluções enzimáticas estocadas em um período inferior a 25 dias.

Figura 15. Estudo da atividade enzimática da LAC durante o período de estocagem (50 dias).



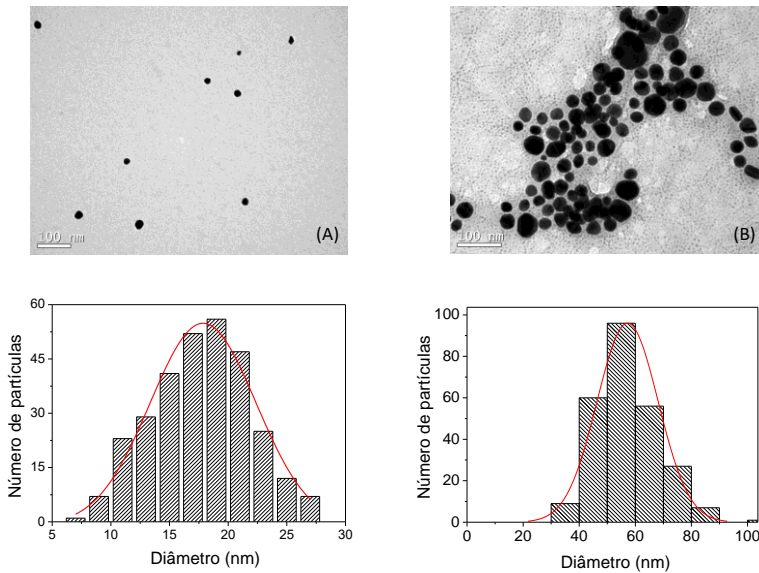
3.3.2. Caracterização do nanomaterial

A caracterização das AuNP-PAH e AuNP-PAH-LAC foi realizada por espectrofotometria UV-vis, TEM e medidas de potencial Zeta.

A microscopia eletrônica de transmissão permite caracterizar a morfologia dos materiais. Desta forma, o TEM é uma das técnicas mais utilizadas para caracterizar nanomateriais pois possibilita visualizar a distribuição, forma e tamanho das partículas (WILLIAMS e CARTER, 1996). A Figura 16 apresenta as imagens de TEM para as dispersões de AuNP-PAH (vermelha) e AuNP-PAH-LAC (violeta). Como pode ser

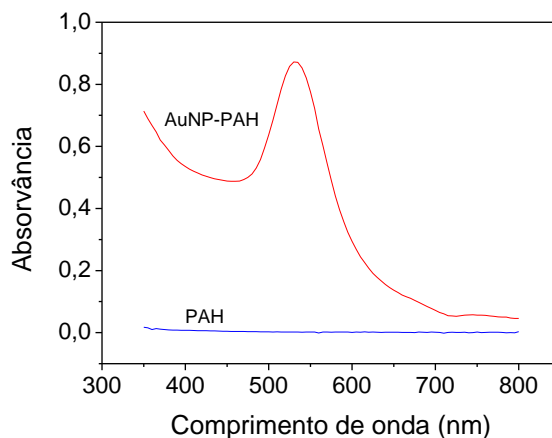
observado, as AuNP-PAH (Figura 16-A) possuem forma esférica e estão bem dispersas na rede polimérica sem apresentar sinais de agregação. O diâmetro médio dessas partículas foi estimado em aproximadamente $17,8 \pm 0,3$ nm, a partir de conjuntos de 300 partículas escolhidas arbitrariamente das micrografias de TEM. Por outro lado, a dispersão AuNP-PAH-LAC (Figura 16-B) apresentou algumas agregações (diâmetro médio cerca de $57,4 \pm 0,2$ nm). Este aumento no tamanho das partículas é atribuído a presença das moléculas aniônicas de LAC ($pI < 4$), que interagem com a superfície positiva das AuNP-PAH sob as condições utilizadas na imobilização ($pH \approx 6,0$). Os histogramas representados na Figura 18 mostram a distribuição de tamanho das partículas, que pode ser razoavelmente bem ajustado por uma curva de Gauss.

Figura 16. (A) Imagens representativas de TEM para a dispersão de AuNP-PAH. (B) Imagens representativas de TEM para a dispersão de AuNP-PAH-LAC. Abaixo: histograma baseado no tamanho de aproximadamente 300 partículas.



Na Figura 17 é possível observar o espectro UV-vis da dispersão com banda plasmônica de superfície em aproximadamente 530 nm (banda característica de nanopartículas de ouro). A presença da banda plasmônica do ouro indica a formação de nanopartículas metálicas. Isto porque, o efeito plasmon de superfície ocorre quando as dimensões do condutor são reduzidas e os elétrons livres na banda de condução sofrem efeitos ressonantes (frequência em que os elétrons de condução oscilam em resposta a radiação eletromagnética incidente) (SANTO *et. al.*, 2016).

Figura 17. Espectro UV-vis para a dispersão de AuNP-PAH e para o polímero PAH.



O potencial Zeta é uma técnica utilizada para investigar a estabilidade de dispersões coloidais e reflete a carga efetiva das partículas. Quanto maior o potencial Zeta, maior é a carga superficial das nanopartículas e, portanto, maior é a repulsão eletrostática entre elas. Como as partículas possuem a mesma carga elas se repelem e essa força de proteção supera a tendência de agregação por forças atrativas (como *Van der Waals*, por exemplo), tornando a dispersão estável (HUNTER, 1988). O potencial Zeta das AuNP-PAH foi estimado em $+56,5 \pm 2,1$ mV ($n = 3$), indicando uma superfície carregada positivamente. Considerando que valores de potencial a cima de ± 30 mV são associados a suspensões estáveis, é possível concluir que as nanopartículas sintetizadas apresentaram boa estabilidade. Esta estabilidade pode ser atribuída a efeitos de proteção estéricos e eletrostáticos gerados pelas moléculas de PAH que envolvem as AuNPs.

3.3.3. Caracterização eletroquímica

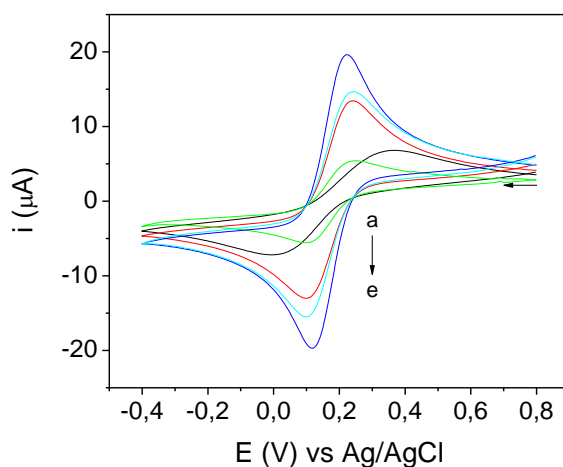
A caracterização eletroquímica dos eletrodos foi realizada por CV e EIS empregando 5,0 mmol L⁻¹ do par redox [Fe(CN)₆]^{3-/4-} (considerado como sonda eletroquímica padrão para estes tipos de análises) preparado em KCl 0,1 mol L⁻¹. Estes estudos permitiram avaliar, separadamente, a contribuição de cada modificador utilizado na construção do biossensor.

3.3.3.1. Voltametria cíclica

A CV é uma técnica eletroquímica muito utilizada em análises qualitativas pois fornece informações acerca da cinética e termodinâmica de processos redox, auxiliando na caracterização de eletrodos (BARD e FAULKNER, 2001). A Figura 18 mostra os voltamogramas cíclicos para o sistema [Fe(CN)₆]^{3-/4-} utilizando diferentes eletrodos: (a) LAC/CPE, (b) CPE, (c) PAH/CPE, (d) AuNP-PAH-LAC/CPE e (e) AuNP-PAH/CPE. Como mostrado, um par de picos redox bem definido foi observado nos eletrodos modificados: PAH/CPE, AuNP-PAH-LAC/CPE e AuNP-PAH/CPE. Estes eletrodos apresentaram um aumento na corrente de pico e uma diminuição entre a distância dos potenciais de pico (ΔE_p) em relação ao eletrodo sem modificação (b), o que indica um favorecimento cinético e termodinâmico da reação de oxirredução nestas superfícies. Também é possível notar que o eletrodo AuNP-PAH/CPE apresentou corrente maior que o AuNP-PAH-LAC/CPE. Isto porque, a enzima LAC presente no biossensor é capaz de catalisar reações de oxidação de uma série de compostos (em especial compostos fenólicos), porém não

contribui muito para a oxidação de alguns complexos metálicos, como o $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$, por exemplo.

Figura 18. CV voltamogramas para o sistema $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ ($5,0 \text{ mmol L}^{-1}$, em $\text{KCl } 0,1 \text{ mol L}^{-1}$) empregando os eletrodos: (a) LAC/CPE, (b) CPE, (c) PAH/CPE, (d) AuNP-PAH-LAC/CPE e (e) AuNP-PAH/CPE. Os voltamogramas foram registrados em 40 mV s^{-1} .



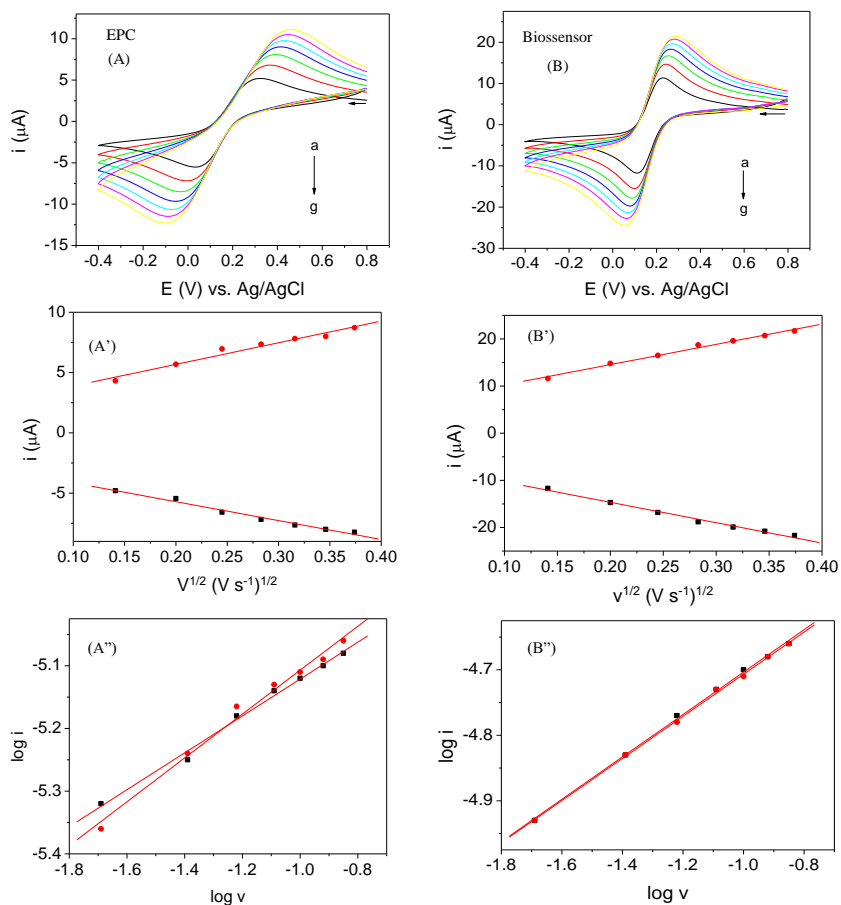
3.3.3.1.1. Estudo de velocidade

A Figura 19 mostra a influência da velocidade de varredura (v) sobre o perfil voltamétrico da sonda redox $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$, obtido por CV, na superfície do biossensor e no eletrodo sem modificação (CPE). As medidas foram realizadas na faixa de 20 a 140 mV s^{-1} (com intervalos de 20 mV s^{-1}). Como pode ser observado na Figura 19-A' e B', as correntes de redução e oxidação aumentaram linearmente com o aumento da raiz

quadrada da velocidade de varredura (linearização da equação de *Randles-Sevcik*) para os dois eletrodos investigados, indicando que o sistema é controlado pela difusão da espécie eletroativa nestas superfícies. Além disso, o mecanismo de transporte de massa também foi investigado pelo gráfico de $\log i_p$ vs. $\log \nu$ (Figura 19-A'' e B''). Inclinações de 0,323 (espécie oxidada) e 0,324 (espécie reduzida) para o biossensor e 0,349 (espécie oxidada) e 0,294 (espécie reduzida) para o CPE confirmam que o processo redox nessas superfícies é controlado exclusivamente por difusão, uma vez que, estes valores estão próximos ao esperado na literatura para processos regidos por este transporte de massa (inclinações de $\approx 1,0$ correspondem a adsorção e inclinações de $\approx 0,5$ a difusão (GOSSER, 1993)).

Comparando os voltamogramas obtidos nas diferentes superfícies (com e sem modificação), também é possível observar um aumento considerável nas correntes de pico e uma diminuição da distância entre os potenciais (ΔE_p) para o biossensor proposto em relação ao CPE, indicando que o processo redox é mais favorecido nesta superfície.

Figura 19. (A) CV voltamogramas obtidos com o CPE utilizando 5,0 mmol L⁻¹ de [Fe(CN)₆]^{3-/4-} em KCl 0,1 mol L⁻¹, em diferentes velocidades de varredura (20 - 140 mV s⁻¹). (A') i_p vs. $v^{1/2}$. (A'') $\log i_p$ vs. $\log v$. (B) CV voltamogramas obtidos com o biossensor utilizando as mesmas condições experimentais do CPE. (B') i_p vs. $v^{1/2}$. (B'') $\log i_p$ vs. $\log v$.



3.3.3.2. Impedância eletroquímica

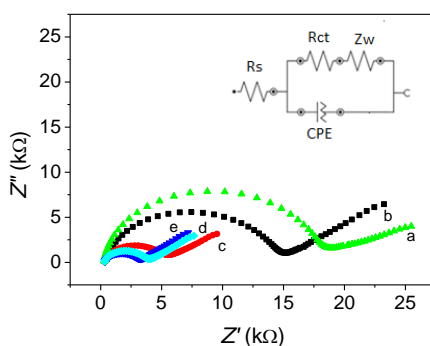
A EIS foi a técnica utilizada para investigar as alterações de impedância causadas pela presença de diferentes modificadores na superfície do eletrodo. Esta técnica ajuda a avaliar as propriedades da interface eletrodo/solução, principalmente no que diz respeito à cinética de transferência de elétrons.

Os fenômenos localizados na interface eletrodo/solução são representados pelo circuito de *Randles-Ershler* (inserido na Figura 20-A). Este circuito considera a separação dos eventos capacitivos dos associados ao processo de transferência de elétrons que é representado pela resistência de transferência de carga (R_{ct}), resistência da solução (R_s) e resistência referente ao processo de difusão linear conhecida como impedância de Warburg (R_w). Nos diagramas de Nyquist (representados na Figura 20), a R_{ct} corresponde a parte semicircular e pode ser calculada a partir do diâmetro do semicírculo, enquanto que a parte linear representa os processos de difusão. Quanto menor for a R_{ct} , menor será a resistência à transferência de cargas e melhor será o controle cinético na superfície do eletrodo (FENG *et al.*, 2005; ZHAO *et al.*, 2008). Esta melhora na transferência de cargas é um processo esperado para eletrodos modificados em comparação ao eletrodo base (sem modificação).

Por conseguinte, um estudo de EIS utilizando $5,0 \text{ mmol L}^{-1}$ da sonda redox $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ foi realizado a fim de avaliar o efeito dos modificadores na resistência a transferência de carga (R_{ct}) dos diferentes eletrodos construídos. A Figura 20 mostra os diagramas de Nyquist e o circuito de *Randles-Ershler* obtidos para os eletrodos estudados. Como é possível observar, o eletrodo modificado com a enzima livre (LAC/CPE,

Figura 20-a) causou um aumento considerável na R_{ct} (18,8 k Ω) em relação ao eletrodo sem modificação (CPE, R_{ct} 15,1 k Ω). Este aumento já era esperado pois, macromoléculas como a LAC, em geral, bloqueiam a superfície de eletrodos (por causa do seu tamanho) aumentando a resistência à transferência de cargas. Por outro lado, modificação com AuNP-PAH (Figura 20-e) causou um decréscimo significativo da R_{ct} (3,05 k Ω), em relação ao CPE, sendo este o eletrodo que apresentou a melhor transferência de cargas. Isto pode ser explicado pela elevada condutividade das AuNP-PAH. Quando a LAC foi imobilizada no nanomaterial (AuNP-PAH-LAC/CPE, Figura 20-d) um ligeiro aumento da R_{ct} (3,74 k Ω) em comparação ao eletrodo AuNP-PAH/CPE foi observado, devido a presença da macromolécula (coerente com os resultados apresentados na Figura 18). Ainda assim, o valor da R_{ct} foi muito inferior ao obtido com os eletrodos CPE e LAC/CPE, devido à presença do nanomaterial, comprovando assim a efetiva imobilização da enzima. Por fim, o PAH/CPE (Figura 20-c) também apresentou R_{ct} (5,02 k Ω) menor que o CPE devido à presença de cargas na estrutura deste polímero.

Figura 20. EIS para o sistema $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ empregando os eletrodos: (a) LAC/CPE, (b) CPE, (c) PAH/CPE, (d) AuNP-PAH-LAC/CPE e (e) AuNP-PAH/CPE. Amplitude da perturbação aplicada foi de 10 mV, potencial de circuito aberto, e a faixa de frequência aplicada de 100.000 a 0,1 Hz. Inserido: circuito de *Randles-Ershler*.

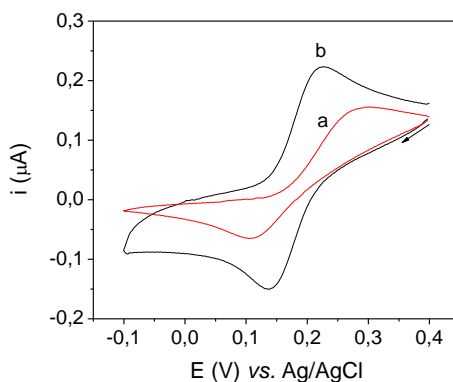


3.3.4. Comportamento eletroquímico da dopamina

O comportamento eletroquímico da dopamina na superfície do biossensor proposto e na superfície do CPE foi investigado por CV, a fim de avaliar o perfil voltamétrico e o tipo de reação (reversível, irreversível ou quase-reversível) em cada eletrodo. Nos voltamogramas da Figura 21 é possível observar que a reação de oxirredução da dopamina é favorecida na superfície do biossensor pois, apresenta maior corrente de pico e melhor perfil voltamétrico em relação ao eletrodo sem modificação. A reversibilidade da reação também é melhorada nesta superfície, seguindo um perfil quase reversível com ΔE_p de 0,085 V, enquanto a distância entre os picos para o CPE é de 0,177 V. Outro parâmetro que também vale ressaltar é a razão entre as correntes de pico (i_{pa}/i_{pc}) que para o biossensor

foi de aproximadamente 1,0, indicando que a quantidade de espécies que reduziram também oxidaram nesta superfície. Estes resultados mostram que o biossensor proposto é promissor para a determinação deste analito.

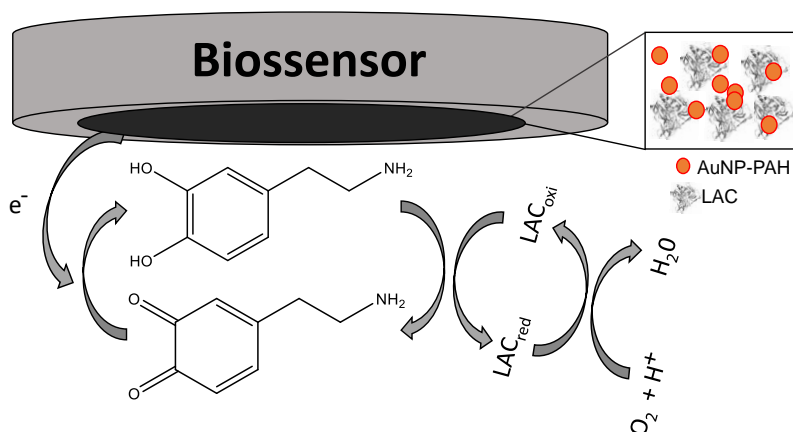
Figura 21. CV voltamogramas para a dopamina ($47,6 \mu\text{mol L}^{-1}$) registrados em 40 mV s^{-1} utilizando os eletrodos: (a) CPE e (b) biossensor em tampão fosfato ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$; pH 6,0).



3.3.5. Princípio de funcionamento do biossensor

O princípio de funcionamento do biossensor é ilustrado na Figura 22 e baseia-se no processo de oxidação enzimática. Neste processo, a dopamina em contato com a LAC (imobilizada em AuNP-PAH), na presença de oxigênio molecular, é oxidada para a sua respectiva *o*-quinona e, subsequentemente reduzida eletroquimicamente na superfície do biossensor a um potencial de $+0,17 \text{ V vs. Ag/AgCl}$. A corrente obtida na redução eletroquímica da *o*-quinona é proporcional à concentração de dopamina e utilizada na quantificação deste analito.

Figura 22. Representação esquemática dos materiais usados como modificadores na construção do biossensor e proposta de funcionamento baseada na oxidação da dopamina catalisada pela enzima LAC com subsequente redução eletroquímica da *o*-quinona formada, sobre a superfície do biossensor.

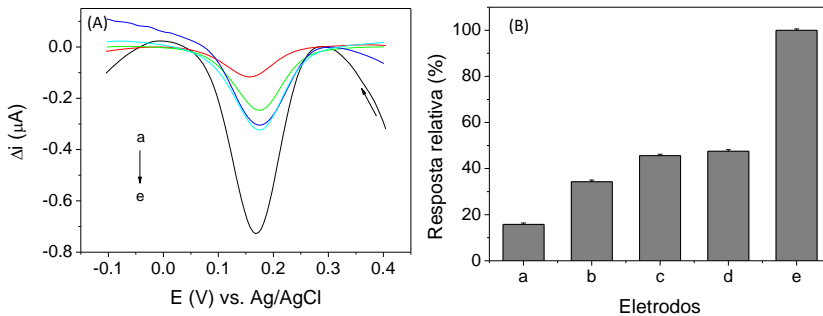


3.3.6. Estudo da contribuição de cada modificador utilizado na construção do biossensor

Para estudar a contribuição de cada modificador, diferentes eletrodos foram preparados e o seu desempenho comparado ao eletrodo sem modificação (CPE). Os eletrodos investigados foram: CPE, PAH/CPE, LAC/CPE, AuNP-PAH/CPE e AuNP-PAH-LAC/CPE. As medidas eletroquímicas foram realizadas por SWV, em triplicata, na faixa de potencial de -0,1 a 0,4 V vs. Ag/AgCl e utilizando $19,6 \mu\text{mol L}^{-1}$ de dopamina em tampão fosfato ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$; pH 6,0).

A Figura 23-A mostra os voltamogramas de onda quadrada obtidos para a dopamina utilizando os diferentes eletrodos. Em todos os casos, os eletrodos que possuíam modificadores contribuíram para a cinética da reação redox da dopamina. O uso do polímero PAH como modificador (PAH/CPE, Figura 23-b) permitiu um aumento na corrente superando a obtida com o CPE em quase o dobro (Figura 23-a). Isto porque, este polímero é capaz de melhorar a condutividade do eletrodo e, além disso, a presença de PAH também pode facilitar a pré-concentração do analito na superfície do eletrodo por interações de hidrogênio. Já o uso da enzima LAC em sua forma livre (LAC/CPE, Figura 23-c) provocou um aumento na corrente resultante da dopamina 3 vezes maior do que o CPE, conforme esperado, pois a enzima atua como um catalisador na oxidação de compostos fenólicos, facilitando o processo redox da dopamina. A elevada condutividade e as propriedades catalíticas das AuNP-PAH fizeram com que o eletrodo AuNP-PAH/CPE (Figura 23-d) apresentasse um ganho de corrente equivalente ao do LAC/CPE. Observados a contribuição de cada modificador, quando foi feita a combinação entre a enzima e as AuNP-PAH (AuNP-PAH-LAC/CPE, Figura 23-e) o resultado foi ainda melhor, obtendo uma resposta muito superior às obtidas com os demais eletrodos, sendo de quase 7 vezes maior que a do eletrodo sem modificação, revelando promissora utilização deste material. Isto pode ser atribuído à eficiente imobilização da enzima no nanomaterial, que favorece a estabilidade da LAC sem afetar a atividade enzimática, combinado as propriedades das AuNPs-PAH como a elevada condutividade, por exemplo. Esse comportamento foi observado em outros estudos relatados na literatura (PUSH *et al.*, 2013; BRONDANI *et al.*, 2013).

Figura 23. (A) SWV voltamogramas para diferentes eletrodos: (a) CPE, (b) PAH/CPE, (c) LAC/CPE, (d) AuNP-PAH/CPE e (e) AuNP-PAH-LAC/CPE em tampão fosfato ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$; pH 6,0) contendo $19,6 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ de dopamina. (B) resposta relativa.



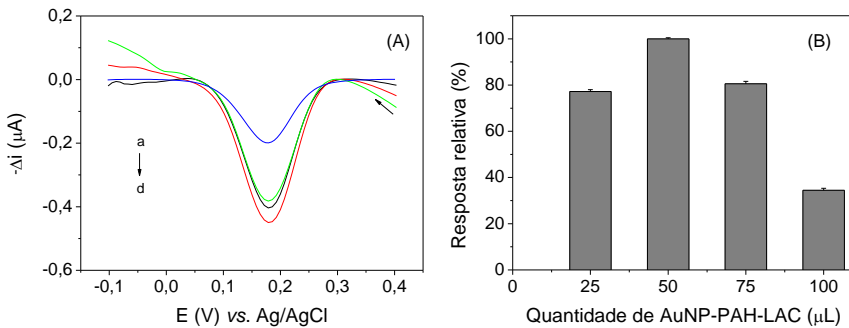
3.3.7. Imobilização enzimática e otimização da construção do biossensor

A imobilização da enzima no suporte nanoestruturado foi realizada pela mistura (1:1, v/v) da solução enzimática com a dispersão de AuNP-PAH pré-concentrada 10 vezes, conforme descrito no procedimento experimental da seção 3.2.4. A imobilização foi acompanhada pela variação da cor da dispersão das nanopartículas que passou de vermelho intenso para violeta, alterando o tamanho das partículas (confirmadas pelas micrografias de TEM, seção 3.3.2). Propõe-se que a imobilização da enzima no suporte nanoestruturado ocorra a partir de interações eletrostáticas entre o polímero PAH ($pK_a \sim 8-9$), que reveste a superfície das AuNPs e é carregado positivamente, e a LAC ($pI < 4$) na sua forma aniônica (HUBLIK e SCHINNER, 2000; BRONDANI *et al.*, 2013). Esta

hipótese é suportada pelos resultados encontrados nas medidas de potencial Zeta, que indicaram uma carga superficial positiva para as AuNP-PAH (seção 3.3.2).

Após a imobilização da enzima, diferentes biossensores foram preparados e investigados por SWV utilizando $13,8 \mu\text{mol L}^{-1}$ de dopamina em tampão fosfato ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$; pH 6,0). As proporções avaliadas foram: 25, 50, 75 e $100 \mu\text{L}$ da dispersão AuNP-PAH-LAC (1:1, v/v), que correspondem a 0,398, 0,796, 1,195 e 1,593 unidades de enzima por biossensor, respectivamente. Conforme indica a Figura 24, o biossensor que obteve melhor resposta analítica para a dopamina foi o construído com a proporção de $50 \mu\text{L}$ de AuNP-PAH-LAC (0,796 U de LAC/biossensor). Portanto, este biossensor foi selecionado e utilizado nos demais estudos como eletrodo de trabalho. Neste estudo pode-se constatar que quantidades superiores a 0,796 unidades de LAC por biossensor acarretam em uma perda de resposta de corrente. Isto porque, macromoléculas como a LAC podem bloquear a superfície de eletrodos, em certas quantidades, dificultando a transferência de elétrons. Esta hipótese foi avaliada e comprovada por estudos de EIS (seção 3.3.3.2).

Figura 24. (A) SWV voltamogramas para $13,8 \mu\text{mol L}^{-1}$ de dopamina em tampão fosfato ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$; pH 6,0) empregando biossensores construídos a partir de: (a) 100 (b) 25 (c) 75 e (d) 50 μL de AuNP-PAH-LAC. (B) Resposta relativa.



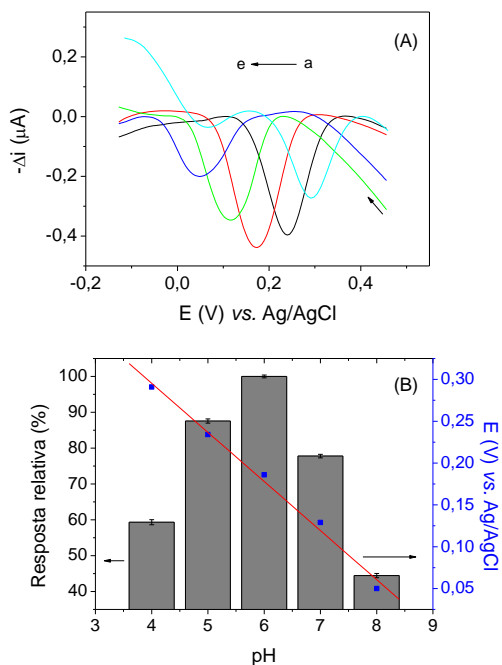
3.3.8. Efeito do pH do eletrólito de suporte

A escolha adequada do eletrólito de suporte é essencial para a obtenção de uma boa sensibilidade do método eletroquímico. Isto porque, o eletrólito suporte interfere diretamente nas propriedades da interface eletrodo-solução (controlando a força iônica, evitando a migração da espécie eletroativa, aumentando a condutividade do meio, entre outros). Por outro lado, o pH pode influenciar diretamente no comportamento eletroquímico do analito alterando sua corrente de pico e posição de potencial (AGOSTINHO *et al.*, 2004). Desta forma, um estudo variando o pH do eletrólito de suporte foi realizado a fim de melhorar o desempenho analítico do método.

O efeito do pH do eletrólito de suporte sobre a resposta analítica da dopamina foi investigado por SWV, utilizando soluções tampão

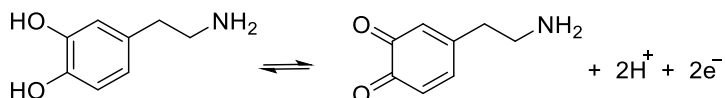
fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH de 6,0-8,0) e tampão acetato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 4,0 e 5,0). Na Figura 25-A é possível observar que tanto o potencial quanto a corrente são dependentes do pH. A maior corrente de pico resultante para a dopamina foi obtida com tampão fosfato ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$; pH 6,0), sendo este eletrólito escolhido para todas as demais etapas deste trabalho.

Figura 25. (A) voltamogramas de SWV (frequência de 10 Hz, amplitude do impulso de 60 mV e incremento de potencial de 5 mV) para a dopamina ($11,9 \mu\text{mol L}^{-1}$) em tampão fosfato ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$; pH: 6,0 a 8,0) e tampão acetato ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$; pH 3,0 e 4,0). (B) influência do pH na corrente de pico resultante (expressa em resposta relativa) e influência do pH no potencial de pico para a dopamina empregando o biossensor proposto.



A Figura 25-B também mostra uma relação linear entre o potencial de redução (E_{pr}) e o pH do eletrólito de suporte ($E_{pr} = 0,530 \pm 1,94 \times 10^{-2} - 0,0587 \pm 3,15 \times 10^{-3} \text{ pH}$ com $r^2 = 0,997$). Na medida que o pH aumenta, o potencial é deslocado em sentido à valores menores, o que indica um envolvimento de prótons na reação redox da dopamina (Figura 26). O declive de $-58,7 \text{ mV pH}^{-1}$ (valor muito próximo ao esperado pela equação de Nernst, $59,2 \text{ mV/n}$) indica que o número de elétrons e prótons envolvidos na reação redox da dopamina é o mesmo, tal como descrito na literatura (GIACOMELLI *et al.*, 2002; SILVA *et al.*, 2014; SILVA *et al.*, 2015).

Figura 26. Representação da reação redox da dopamina.



3.3.9. Escolha e otimização da técnica voltamétrica

A fim de avaliar a técnica voltamétrica mais adequada (que apresenta maior sensibilidade) para o desenvolvimento do método, um estudo comparativo foi realizado empregando LSV, DPV e SWV. Foram construídas curvas de calibração (Figura 27) para cada uma das técnicas empregando o biossensor proposto e utilizando uma solução estoque de dopamina $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ em uma faixa de concentração de 10 a $29 \mu\text{mol L}^{-1}$. As medidas foram realizadas em triplicata e em tampão fosfato ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$; pH 6,0).

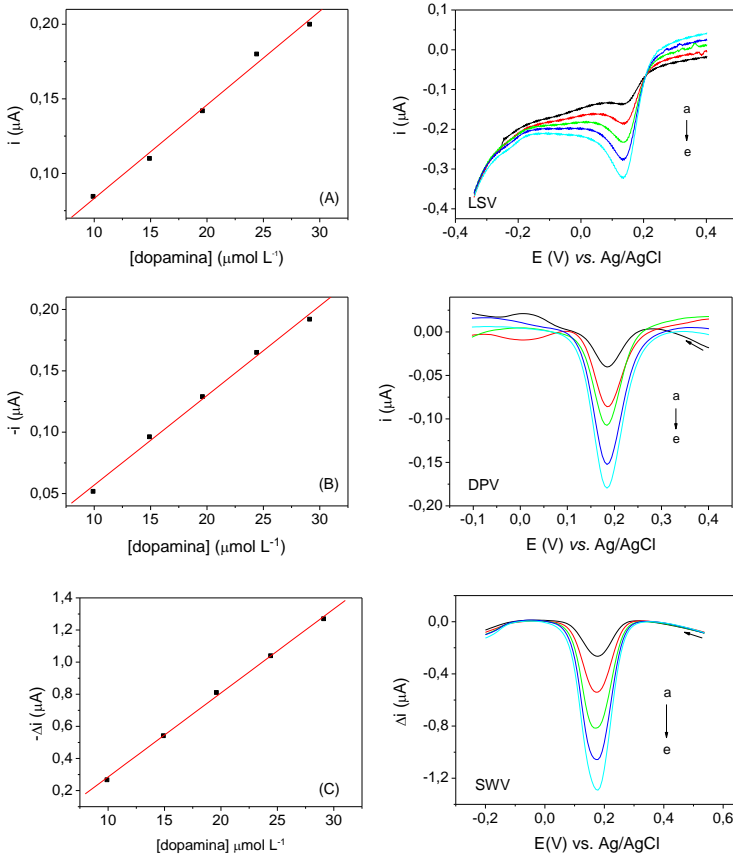
A Tabela 2 fornece os parâmetros de calibração obtidos para cada técnica investigada. A partir dos resultados apresentados é possível observar que a técnicas mais sensível foi a SWV, pois apresentou maior inclinação da curva de calibração e menor limite de detecção para a dopamina (calculado pelos parâmetros de calibração com nível de confiança de 95%). Isto porque, diferente da DPV e da LSV que fornecem apenas a corrente de redução ou oxidação dependendo do sentido da varredura de potencial, a SWV é capaz de detectar a diferencial entre as correntes ($\Delta_i = ip_a - (-ip_c)$), permitindo a obtenção de um valor maior que o das correntes isoladas, já que as correntes possuem sinais contrários. Por este motivo, a resposta de corrente para a dopamina utilizando a SWV é maior, já que a reação redox da dopamina segue um perfil quase-reversível nas condições de estudo. Além disso, a SWV também oferece a vantagem de ser uma técnica mais rápida que as demais e, portanto, foi a técnica selecionada para o desenvolvimento analítico da metodologia proposta.

Tabela 2. Resumo dos parâmetros de calibração de cada técnica.

Técnica	Equação da reta	r^2	LOD
			($\mu\text{mol L}^{-1}$)
SWV	$-\Delta_i = -2,38 \times 10^{-7} \pm 2,41 \times 10^{-8} + 0,05230 [\text{DA}]$	0,9993	1,38
DPV	$-i = -1,60 \times 10^{-8} \pm 6,31 \times 10^{-9} + 0,00729 [\text{DA}]$	0,9974	2,60
LSV	$-i = -2,04 \times 10^{-8} \pm 6,78 \times 10^{-9} + 0,00628[\text{DA}]$	0,9960	3,21

[DA] = concentração de dopamina.

Figura 27. Curvas de calibração para a dopamina em tampão fosfato (0,1 mol L⁻¹; pH 6,0) utilizando: (A) LSV (velocidade de varredura de 50 mV s⁻¹). (B) DPV (incremento de potencial de 5 mV, amplitude de pulso de 25 mV, tempo de duração do pulso 0,05 s com intervalo de 0,5 s). (C) SWV (incremento de potencial de 7 mV, amplitude de pulso de 60 mV e frequência de 25 Hz).

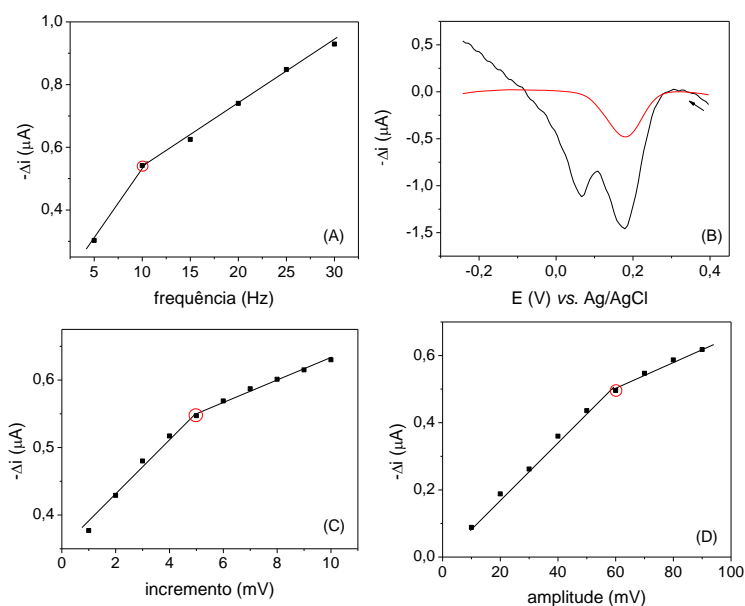


Após selecionar a melhor técnica, foi realizada a otimização dos seus parâmetros experimentais (frequência (f), incremento de potencial (ΔE_s) e amplitude de pulso (a)) a fim de obter o melhor desempenho analítico (sinergismos entre a melhor resolução de pico e a sensibilidade). Sabe-se que os parâmetros experimentais da SWV interferem diretamente no perfil dos picos voltamétricos e por isso, a importância em estudá-los. A amplitude de pulso (geralmente variada de 10-100 mV) está diretamente relacionada à resolução do pico, enquanto o incremento está relacionado ao espaço entre os pontos de potenciais (variado em pequenos intervalos, 1-10 mV). A frequência (geralmente variada de 10-100 Hz), por sua vez, é o parâmetro que define a velocidade de varredura da técnica ($v = f \times \Delta E_s$).

A otimização dos parâmetros experimentais foi feita fixando dois parâmetros em valores intermediários e variando apenas um por vez. Estes estudos foram realizados em triplicata empregando $11,9 \mu\text{mol L}^{-1}$ de dopamina em tampão fosfato ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$; pH 6,0). A frequência foi o primeiro parâmetro investigado, uma vez que, testes preliminares mostraram que este parâmetro possuía uma maior interferência/influência sobre a reação redox da dopamina. Foi observado que em frequências mais altas (acima de 40 Hz) ocorria uma distorção do pico redox da dopamina (aparecimento de pico duplo) indicando que em frequências altas não há tempo suficiente para que a reação ocorra completamente nas condições de trabalho (Figura 28-B). Desta forma, a frequência foi investigada no intervalo de 5 a 30 Hz (Figura 28-A). Para este estudo o incremento de potencial e a amplitude foram fixados em valores intermediários de 5 mV e 50 mV, respectivamente. A melhor frequência obtida neste estudo foi a de 10 Hz pois, até esta frequência um

comportamento linear entre o parâmetro e a corrente foi observado, assegurando um transporte de massa à superfície do eletrodo controlado por difusão. Em seguida, foi realizado a otimização do incremento na faixa de 1 a 10 mV, tendo a frequência fixada em 10 Hz (melhor frequência) e a amplitude em 50 mV. De acordo com o gráfico (Figura 28-C), o comprometimento linear entre a corrente e o parâmetro foi obtido até 5 mV, sendo este o valor fixado para o incremento de potenciais. Por fim, a amplitude de pulso foi avaliada na faixa de 10 a 100 mV, fixando os demais parâmetros em seus melhores valores. A melhor amplitude foi obtida em 60 mV (Figura 28-D).

Figura 28. Otimização dos parâmetros da SWV. (A) frequência, (B) SWV voltamograma para frequência acima de 30 Hz. (C) incremento de potencial, (D) amplitude de pulso, empregando o biossensor proposto e utilizando $11,9 \mu\text{mol L}^{-1}$ de dopamina em tampão fosfato ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$; pH 6,0).



3.3.10. Desempenho analítico do biossensor

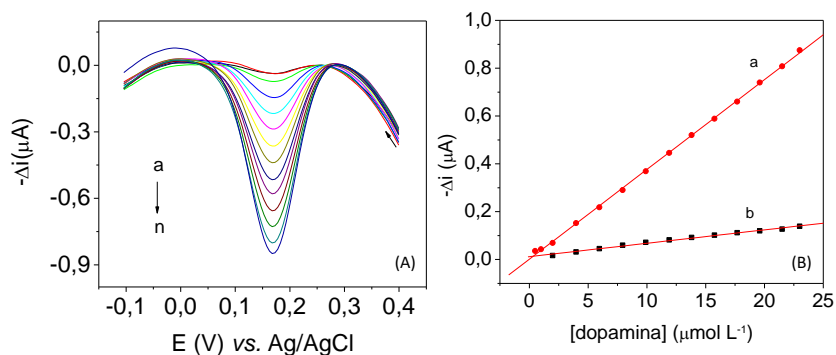
3.3.10.1. Curva de calibração

Curvas de calibração para a dopamina (Figura 29) foram construídas a partir das melhores condições experimentais (estabelecidas anteriormente), utilizando o biossensor proposto e o eletrodo não

modificado (CPE) em uma faixa de potencial de -0,1 a + 0,4 V *vs.* Ag/AgCl. As curvas foram construídas por SWV, em triplicata, a partir do gráfico de corrente de pico resultante *vs.* a concentração de dopamina.

A curva de calibração obtida utilizando o biossensor (a) apresentou linearidade de 0,49 a 23,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e a seguinte equação de regressão: $-\Delta i = 1,07 \times 10^{-9} \pm 3,45 \times 10^{-9} + 3,75 \times 10^{-2} \pm 2,59 \times 10^{-4}$ [dopamina] ($r^2 = 0,999$), onde Δi corresponde a corrente de pico resultante e [dopamina] a concentração de dopamina em mol L^{-1} . O limite de detecção (LOD), considerado como três vezes o desvio padrão da intercepção/inclinação, foi calculado como 0,26 $\mu\text{mol L}^{-1}$ com nível de confiança de 95%, enquanto o limite de quantificação (LOQ), calculado como dez vezes o desvio padrão da intercepção/inclinação, foi de 0,92 $\mu\text{mol L}^{-1}$. A curva de calibração obtida utilizando o eletrodo não modificado (b) foi linear de 1,9 a 23,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e apresentou a seguinte equação de regressão: $-\Delta i = 1,78 \times 10^{-8} \pm 2,36 \times 10^{-9} + 5,60 \times 10^{-3} \pm 1,64 \times 10^{-4}$ [dopamina] ($r^2 = 0,996$), com LOD de 1,26 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Comparado com o CPE, o biossensor mostrou LOD significativamente menor e maior sensibilidade, que pode ser observada a partir da inclinação da curva de calibração. Isto demonstra que o biossensor é adequado para a determinação de dopamina, uma vez que, apresenta melhor desempenho analítico que o eletrodo convencional.

Figura 29. (A) SWV voltamogramas (frequência 10 Hz, amplitude de pulso 60 mV e incremento de varredura de 5,0 mV) obtidos utilizando o biossensor proposto em (a) solução tampão fosfato (0,1 mol L⁻¹; pH 6,0) (b) 0,49 (c) 0,99; (d) 1,9; (d) 3,9; (e) 5,9; (f) 7,9; (g) 9,90; (h) 11,9; (i) 13,8; (j) 15,7; (k) 17, 6; (l) 19,6; (m) 21,5; (n) 23,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$. (B) Curva de calibração utilizando: (a) biossensor; (b) CPE.



O desempenho do biossensor proposto foi comparado ao de outros eletrodos modificados, aplicados a determinação de dopamina, publicados na literatura. De acordo com a Tabela 3, é possível perceber que, de modo geral, o AuNP-PAH-LAC/CPE apresentou LOD mais baixo.

Tabela 3. Comparação entre diferentes eletrodos descritos na literatura para determinação de dopamina.

Eletrodo	Faixa linear ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	LOD ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Ref.
HRP-MWCNTsSiSG/Poly(Gly)/CPE	15 - 865	0,6	RAGHU <i>et. al.</i> , 2014
RGO-AuNPs CSHMs/GCE	1,0 - 2000	0,3	LUI <i>et.</i> <i>al.</i> , 2012
Laccase/SiO ₂ -PA/GCE	0,99 – 103,1	0,26	WANG <i>et. al.</i> , 2014
MAO/GCE	5 - 400	20,00	JOSHI <i>et.</i> <i>al.</i> , 2012
AuNPs@PANI/CS/GCE	10 -1700	5,0	YANG <i>et.</i> <i>al.</i> , 2012
IL-CPE	1 -800	0,7	SUN <i>et.</i> <i>al.</i> , 2007
AuNP-PAH-LAC/CPE	0,49 – 23,0	0,26	Este estudo

HRP: peroxidase de rabanete; MWCNTs: nanotubos de carbono multicamadas; SiSG: sílica sol-gel; Poly(Gly): glicina polimerizada; RGO: óxido de grafeno reduzido; CSHMs: membranas híbridas de quitosana/sílica sol-gel; GCE: eletrodo de carbono vítreo; SiO₂-PA: sílica funcionalizada com ácido fítico; MAO: monoamina oxidase; PANI: polianilina; CS: nanocompósito de core-shell; IL: líquido iônico.

3.3.10.2. *Estudos de seletividade, precisão e estabilidade*

Para avaliar a seletividade do método, foi investigado a influência de diferentes espécies consideradas potencialmente interferentes (levodopa, carbidopa, epinefrina, ácido úrico e ácido ascórbico) na resposta eletroquímica da dopamina. Os estudos foram realizados por SWV comparando a resposta de uma solução padrão de dopamina de 9,90 $\mu\text{mol L}^{-1}$ com as obtidas em diferentes concentrações das substâncias potencialmente interferente. Os índices de concentração estudados foram fixados em 1:1, 1:5 e 1:10 ([dopamina]: [interferente]). Este estudo tornou-se especialmente importante para avaliar a possibilidade de determinar dopamina em fluidos biológicos como sangue e urina, uma vez que, os compostos estudados sofrem reação de oxidação a um potencial muito próximo ao da dopamina, podendo causar sobreposição de picos levando a uma medida superestimada. No entanto, os estudos demonstraram que nenhuma das substâncias avaliadas interferem significativamente no desempenho do eletrodo, apresentando variação de sinal <10% para as concentrações mais altas. Portanto, este biossensor pode ser usado para a determinação de dopamina na presença de levodopa, carbidopa, epinefrina, ácido úrico e ácido ascórbico sem que estas substâncias causem interferência significativa na resposta analítica.

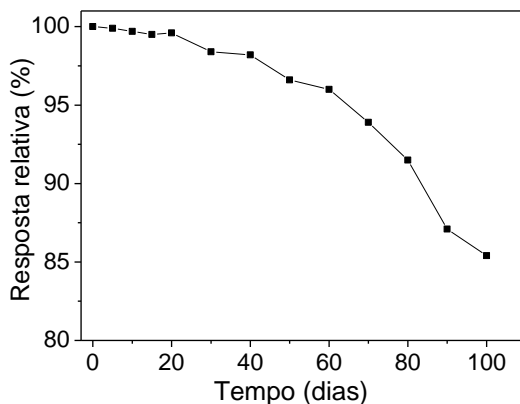
A precisão da metodologia foi avaliada a parti dos testes de repetibilidade intra-day (medidas sucessivas realizadas no mesmo dia, com o mesmo eletrodo) e inter-day (medidas realizadas em dias diferentes, utilizando as mesmas condições experimentais e o mesmo eletrodo) pelo desvio padrão relativo (RSD) entre as medições. Os estudos intra-day foram realizados a partir de dez medidas consecutivas

(n = 10), utilizando as mesmas condições experimentais, com solução de dopamina na concentração de $19,6 \mu\text{mol L}^{-1}$. O RSD obtido neste teste foi de 4,95%. Os estudos inter-day foram realizados pela medida eletroquímica de uma solução contendo $9,90 \mu\text{mol L}^{-1}$ de dopamina em 10 diferentes dias. O RSD obtido para este caso foi de 4,82%. Desta forma, pode-se concluir que os valores de RSD determinados nestes estudos demonstram a boa precisão do método. Além disso, a repetibilidade entre eletrodos também foi investigada pela comparação de resposta de três biossensores preparados de forma independente usando o mesmo procedimento, para avaliar o processo de construção do biossensor. Este estudo foi realizado utilizando uma solução de dopamina de $9,90 \mu\text{mol L}^{-1}$, por SWV. O RSD obtido foi 4,21%, indicando que uma boa repetibilidade foi obtida no processo de construção dos biossensores.

A estabilidade do biossensor frente a resposta eletroquímica da dopamina foi investigada por SWV por um período de aproximadamente 100 dias de estocagem (onde ficou armazenado sob refrigeração à $4 \text{ }^\circ\text{C}$) empregando as mesmas condições de trabalho. A Figura 30, mostra os resultados obtidos nessas análises. Como pode ser observado, o biossensor manteve cerca de 95,0% de sua resposta de corrente inicial (medida realizada no primeiro dia) durante os primeiros 60 dias de testes e, ao final do estudo (medida realizada no último dia), teve perda de resposta um pouco mais significativa que atingiu quase 15%, chegando a aproximadamente 85% da resposta inicial. No entanto, os resultados desse estudo são considerados aceitáveis devido a boa repetibilidade das medidas nos primeiros 60 dias. Também vale destacar que cerca de 200 medidas foram feitas utilizando o mesmo biossensor, no período de estudo. A boa estabilidade do biossensor pode ser atribuída à eficiente

imobilização da enzima no nanosupor, que favorece a conservação da estrutura e atividade da LAC.

Figura 30. Estudo de estabilidade do biossensor. Medidas realizadas por SWV em solução tampão fosfato ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$; pH 6,0) e $9,90 \mu\text{mol L}^{-1}$ de dopamina.



3.3.10.3. Estudos de recuperação e aplicação analítica do método

O biossensor proposto foi aplicado na determinação de dopamina em duas diferentes amostras de cloridrato de dopamina injetáveis (A e B). Os estudos de recuperação e determinação foram realizados por SWV, em triplicata, utilizando o método de adição de padrão.

Os ensaios de recuperação são importantes pois avaliam a exatidão de um dado método analítico. Consistem basicamente da adição de diferentes concentrações conhecidas do analito sobre uma amostra, seguida pela determinação dessa concentração adicionada (BRITO *et al.*,

2003). As medidas de recuperação foram obtidas por adição de quatro diferentes concentrações de padrão de dopamina (2,9, 5,9, 8,8 e 10,8 $\mu\text{mol L}^{-1}$) para cada amostra. Os percentuais de recuperação foram calculados comparando as concentrações adicionadas e recuperadas da solução padrão de dopamina. As recuperações obtidas para as amostras variaram de 97,6 a 105,5% demonstrando baixa interferência da matriz da amostra e exatidão satisfatória da metodologia proposta (Tabela 4).

Tabela 4. Estudos de recuperação para dopamina em amostras farmacêuticas utilizando o biossensor.

Amostra ^a	Dopamina ($\mu\text{mol L}^{-1}$)		
	Adicionado	Recuperado ^b	Recuperação (%) ^c
A	2,9	2,9 \pm 0,2	97,7
	5,9	6,1 \pm 0,2	105,5
	8,8	8,7 \pm 0,1	99,7
	10,8	10,7 \pm 0,2	98,3
B	2,9	2,8 \pm 0,1	97,6
	5,9	5,9 \pm 0,2	100,6
	8,8	8,7 \pm 0,1	99,8
	10,8	10,8 \pm 0,1	101,5

^aA e B = cloridrato de dopamina injetável; ^bMédia \pm desvio padrão (n = 3); ^c Recuperação = (valor encontrado/valor adicionado) x 100%.

Além disso, para verificar a eficiência do método, essas amostras também foram utilizadas na quantificação de dopamina empregando o biossensor proposto, via técnica eletroanalítica (SWV) e o método espectrofotométrico oficial (UNITED STATES PHARMACOPEIA NATIONAL FORMULARY, 1995) para fins comparativos. Os resultados obtidos também foram comparados com os valores informados no rótulo do medicamento (Tabela 5). Como pode ser observado, o teor de dopamina determinado pelo biossensor foi consistente com o especificado no rótulo (erro relativo de 1,4%) e com o determinado pelo método oficial (erro relativo de 2,5%). Estes resultados indicam que o método desenvolvido é adequado para a determinação da dopamina em formulações farmacêuticas, podendo ser estendido a outros tipos de amostras como em fluidos biológicos (sangue e urina), por exemplo.

Tabela 5. Determinação de dopamina em amostra farmacêutica utilizando o método proposto e o método espectrofotométrico de referência.

Amostra ^a	Dopamina (mg mL ⁻¹)				
	Rótulo	Método comparativo ^b	Método proposto ^b	Er ₁ (%) ^c	Er ₂ (%) ^d
A	5,00	5,10 ± 0,05	5,06 ± 0,07	0,78	1,2
B	5,00	5,20 ± 0,05	5,07 ± 0,07	2,5	1,4

^aA e B = cloridrato de dopamina injetável; ^b média ± desvio padrão (n = 3); ^cErro relativo = |(método comparativo- método proposto)/método comparativo| x 100 %; ^dErro relativo = |(rótulo- método proposto)/rótulo| x 100 %.

CAPÍTULO 4: ELETRODO QUIMICAMENTE MODIFICADO COM NANOPLAQUETAS DE GRAFITE EXFOLIADAS E NANOPARTÍCULAS DE OURO ESTABILIZADAS EM CARBOXIMETILCELULOSE PARA A DETERMINAÇÃO DE LEVODOPA

Publicado em: Journal of Solid State Electrochemistry,

<https://doi.org/10.1007/s10008-017-3677-1>

4.1. INTRODUÇÃO

AuNPs estão entre as nanoestruturas mais utilizadas no desenvolvimento de eletrodos modificados, pois apresentam características interessantes como: grande área superficial, elevada atividade catalítica e condutividade elétrica, que estão associadas ao seu tamanho e composição (KERMAN *et. al.*, 2008; CAMPBELL e COMPTON, 2010). O uso de polímeros biodegradáveis (quitosana e amido, por exemplo) como estabilizantes de nanopartículas tem atraído atenção dos eletroquímicos nos últimos anos, uma vez que, a incorporação de nanopartículas em matrizes biopoliméricas costuma favorecer a adesão dos nanomateriais à superfície de eletrodos, levando à formação de filmes nanoestruturados estáveis e biocompatíveis (SHI *et. al.*, 2008; ZHAO *et. al.*, 2009; PANDEY *et. al.*, 2012). Além disso, a presença de biopolímeros em suspensões de AuNPs também permite a dispersão de outros nanomateriais como nanotubos de carbono e grafeno, por exemplo, dando origem a nanocompósitos híbridos multifuncionais (PARVEEN *et. al.*, 2015). Estes nanocompósitos apresentam propriedades atraentes para aplicação em eletrodos como, por exemplo, a elevada condutividade elétrica (KANG *et. al.*, 2010; LU *et. al.*, 2010). No

entanto, estes materiais geralmente são de alto custo. Uma alternativa economicamente viável para a substituição desses compostos são as nanoplaquetas de grafite exfoliada (xGnP), que preservam parcialmente as propriedades elétricas úteis do grafeno em sua estrutura, uma vez que, são constituídas por algumas camadas de grafeno empilhadas (LU *et. al.*, 2010; LI e ZHONG, 2011). A modificação de eletrodos convencionais com filmes de nanocompostos híbridos pode aumentar a área do eletrodo, bem como melhorar as suas propriedades eletrônicas (PARVEEN *et. al.*, 2015; BENVÍD *et. al.*, 2015), gerando novos dispositivos destinados a monitorar uma variedade de compostos eletroquimicamente ativos (complexos metálicos, biomoléculas, compostos fenólicos, como as catecolaminas, por exemplo), em amostras de interesse alimentar, clínico e/ou farmacêutico.

A levodopa é uma catecolamina muito utilizada como medicamento para o tratamento da doença de Parkinson, uma das doenças neurodegenerativa mais comum em todo o mundo. Devido a sua relevância clínica e farmacológica é de suma importância o desenvolvimento de métodos analíticos precisos, simples e rápidos para a sua determinação em formulações farmacêuticas e fluidos biológicos (FAHN, 2006; CONNOLLY e LANG, 2014). Neste sentido, os métodos eletroquímicos vem se destacando cada vez mais, pois oferecem desempenho analítico notável, além de simplicidade e baixo custo (KIM *et. al.*, 2008; BEITOLLAHI *et. al.*, 2011; LIN *et. al.*, 2015).

Considerando a relevância do desenvolvimento de rotas sintéticas ecológicas para a obtenção de nanopartículas metálicas, neste trabalho é proposto a síntese de um nanocompósito híbrido de AuNPs e xGnP obtido utilizando carboximetilcelulose (CMC), um polímero biodegradável,

como estabilizador e dispersante. Este nanocompósito foi aplicado na construção de um eletrodo quimicamente modificado rápido e sensível para determinação de levodopa em formulações farmacêuticas.

4.2. PARTE EXPERIMENTAL

4.2.1. Reagentes e soluções

Carboximetilcelulose sódica (CMC, $MM \approx 265 \text{ g mol}^{-1}$), ácido cloroáurico (HAuCl_4), borohidreto de sódio (NaBH_4), ferricianeto de potássio ($\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$), ferrocianeto de potássio ($\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$), ácido ascórbico, ácido cítrico, ácido úrico, glicose, cafeína, dopamina, carbidopa e levodopa foram obtidos de Sigma-Aldrich. As nanoplaquetas de grafite exfoliadas (xGnP) foram adquiridas da XG-Science. Todos os reagentes foram obtidos comercialmente em grau analítico e não passaram por etapas extras de purificação.

Solução padrão de levodopa ($1,0 \text{ mmol L}^{-1}$) foi preparada diariamente antes de cada estudo, em uma mistura de água:etanol (7:3, v/v). Soluções de menor concentração foram preparadas a partir deste estoque, por diluição apropriada. Ácido clorídrico (HCl), ácido sulfúrico (H_2SO_4), cloreto de sódio (NaCl), cloreto de potássio (KCl), soluções tampão acetato (pH 5,0), tampão Britton-Robinson (pH 1,0-8,0), solução tampão fosfato salino (pH 7,4) e soluções tampão fosfato (pH 7,0) foram utilizadas como eletrólitos de suporte na otimização do método (todas as soluções foram preparadas com uma concentração de $0,1 \text{ mol L}^{-1}$). Solução de borohidreto de sódio (NaBH_4 , 20 mmol L^{-1}), carboximetilcelulose (CMC, 0,15 %; m/v) e cloreto de ouro trihidratado

(HAuCl_4 , $0,1 \text{ mol L}^{-1}$) foram utilizadas na síntese das nanopartículas de ouro. Amostra de medicamento a base de levodopa (200/50 mg levodopa/cloridrato de benserazida), indicado aqui como amostra A, foi comercialmente obtida em uma farmácia de Florianópolis (Santa Catarina, Brasil). Todas as soluções aquosas foram preparadas com água ultrapura, obtida a partir de um sistema Milli-Q (Millipore, EUA), com uma resistividade de $18,2 \text{ M}\Omega \text{ cm}^{-1}$.

Para a construção dos eletrodos modificados, foi utilizado como base um eletrodo de carbono vítreo (GCE) com diâmetro de $2,0 \pm 0,1 \text{ mm}$, obtido da Metrohm.

4.2.2. Instrumentação

As análises de TEM foram realizadas em um microscópio eletrônico de transmissão JEOL JEM-1011 operando a 100 keV. A caracterização morfológica da superfície dos eletrodos foi realizada por microscopia eletrônica de varredura com emissão de campo (SEM-FEG), utilizando um microscópio eletrônico JEOL JSM-6701F operando com uma tensão de aceleração de 5,0 kV. As análises de TEM e SEM-FEG foram realizadas no Laboratório Central de Microscopia Eletrônica da Universidade Federal de Santa Catarina (LCME-UFSC). O potencial Zeta dos nanomateriais foi medido usando um sistema de Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments). As medidas espectrofotométricas foram realizadas em um espectrômetro UV-vis Cary 60 (Agilent Technologies, EUA) com uma célula de quartzo (caminho óptico de 1,0 cm). Medidas de voltametria (LSV, CV e SWV) e EIS foram realizadas em um potenciostato/galvanostato (Autolab PGSTAT128N) equipado com

módulo de impedância FRA (Eco Chemie, Holanda) e acoplado ao software NOVA (versão 1.10) para a aquisição dos dados. Medidas de pH foram realizadas utilizando um pHmetro da Micronal modelo B-475 contendo um eletrodo de vidro combinado. Um banho de ultrassom, Unique 1400A, foi utilizado no preparo das soluções e amostras.

4.2.3. Síntese e caracterização das AuNP-CMC e AuNP-CMC-xGnP

As AuNPs estabilizadas em CMC (AuNP-CMC) foram sintetizadas pelo seguinte procedimento: 400 μL de uma solução aquosa de HAuCl_4 ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$) foram adicionados a 10 mL de uma solução aquosa de CMC (0,15% (m/v), mantendo agitação mecânica por 10 min. Após este tempo, foram adicionados vigorosamente 800 μL de uma solução aquosa de NaBH_4 ($0,02 \text{ mol L}^{-1}$). A reação foi mantida sob agitação mecânica durante 24 horas à temperatura ambiente ($\approx 25 \text{ }^\circ\text{C}$). Ao final, uma dispersão com cor vermelha intensa foi obtida, indicando a formação de AuNP-CMC, que foi confirmada por espectroscopia de UV-vis e TEM. As AuNP-CMC formadas foram utilizadas posteriormente para dispersar as xGnP. O nanocompósito híbrido obtido (AuNP-CMC-xGnP) foi aplicado na construção de um novo eletrodo nanoestruturado para a determinação de levodopa.

Os nanomateriais foram caracterizados por espectroscopia UV-vis, potencial Zeta e TEM. As amostras de TEM foram preparadas por deposição das dispersões em um *gride* de cobre revestido com carbono. Os *grides* foram colocados sob papel de filtro para remover o excesso de material e seco à vácuo em um dessecador. O tamanho médio das

partículas foi determinado por contagem de aproximadamente 300 partículas, usando o software ImageJ (SCHNEIDER, *et al.*, 2012).

4.2.4. Construção e caracterização do eletrodo

Antes da preparação do eletrodo nanoestruturado, um eletrodo de carbono vítreo (GCE, diâmetro $2,0 \pm 0,1$ mm) foi mecanicamente polido por 3 minutos utilizando uma suspensão aquosa de alumina (granulometria de $0,05 \mu\text{m}$) e feltro. Em seguida, a superfície foi lavada com água ultrapura e etanol, concluindo a etapa de limpeza do GCE. O eletrodo quimicamente modificado foi preparado pelo método “*drop coating*” que consistiu no gotejamento de uma alíquota de $2,0 \mu\text{L}$ da dispersão AuNP-CMC-xGnP sobre a superfície do GCE limpa. O eletrodo foi deixado em um dessecador, sob vácuo, por 10 minutos para a eliminação do solvente (água). Este eletrodo foi referido aqui como AuNP-CMC-xGnP/GCE e utilizado como eletrodo de trabalho durante os experimentos. Um eletrodo modificado apenas com AuNP-CMC (AuNP-CMC/GCE) também foi construído, de forma semelhante, para avaliar a contribuição das nanopartículas metálicas de forma isolada.

A caracterização morfológica da superfície do AuNP-CMC-xGnP/GCE foi realizada por SEM-FEG enquanto a caracterização eletroquímica foi feita por CV e EIS. As medidas de CV foram registradas em solução de KCl ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$) contendo $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ $5,0 \text{ mmol L}^{-1}$ e varrendo o potencial de $-0,3$ a $+0,8 \text{ V}$ a uma taxa de varredura de $20\text{-}140 \text{ mV s}^{-1}$. As medidas de EIS foram realizadas utilizando a mesma sonda redox ($[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$) em modo de circuito aberto, com uma amplitude de 10 mV e uma faixa de frequência de $0,1$ a $100\,000 \text{ Hz}$.

4.2.5. Medidas eletroquímicas e eletrodos

Os experimentos voltamétricos foram realizados utilizando um sistema convencional de três eletrodos: uma placa de platina como eletrodo auxiliar, Ag/AgCl (KCl 3,0 mol L⁻¹) como eletrodo de referência e o eletrodo nanoestruturado proposto (AuNP-CMC-xGnP/GCE) como eletrodo de trabalho. Todas as experiências foram realizadas em uma célula eletroquímica contendo 10 mL do eletrólito de suporte (H₂SO₄ 0,1 mol L⁻¹) e o volume necessário de solução do analito (solução padrão ou amostra).

As medidas de SWV foram realizadas varrendo o potencial de +0,3 para +0,7 V a uma frequência de 30 Hz, amplitude de pulso de 50 mV e incremento de potencial de 6 mV. As medidas de CV foram registradas em uma faixa de potencial de -0,3 a +0,7 V a uma taxa de varredura de 20 mV s⁻¹. As experiências foram realizadas à temperatura ambiente (≈ 25 ° C) e reportadas vs. Ag/AgCl (KCl 3,0 mol L⁻¹). Um tempo de agitação de 60 s foi usado para homogeneizar as soluções antes das medidas.

4.2.6. Preparo da amostra e determinação de levodopa em fármaco

Um medicamento comercial prescrito para o tratamento da doença de Parkinson (contendo 200 mg de levodopa por cápsula, indicado aqui como A) foi adquirido em uma farmácia local da cidade de Florianópolis e utilizado como amostra para a determinação de levodopa. Para o preparo da amostra, o conteúdo de duas cápsulas foi dissolvido em 500 mL de uma mistura de água:etanol (7:3, v/v). Após 30 min em um banho de

ultrassom, a amostra foi filtrada a vácuo para remover os excipientes (não solúveis). A solução obtida foi utilizada na determinação de levodopa pela metodologia eletroquímica proposta e por um método comparativo (espectrofotometria UV-vis), a partir do método de adição de padrão. Os resultados foram expressos como o valor médio de três determinações.

Para as análises voltamétricas, alíquotas da amostra do fármaco foram transferidas para uma célula eletroquímica contendo 10 mL do eletrólito de suporte (H_2SO_4 0,1 mol L^{-1}). O teor de levodopa foi quantificado usando SWV após adições sucessivas de uma solução padrão de levodopa (1,0 mmol L^{-1}). Todas as medidas foram realizadas a temperatura ambiente ($\approx 25^\circ \text{C}$) e a quantificação foi baseada nas correntes de pico resultantes (a um potencial de aproximadamente +0,540 V vs. Ag/AgCl). Para fins de comparação, as amostras também foram analisadas por um método espectrofotométrico utilizado como referência ($\lambda = 280 \text{ nm}$) (MOHAMED *et. al.*, 2009).

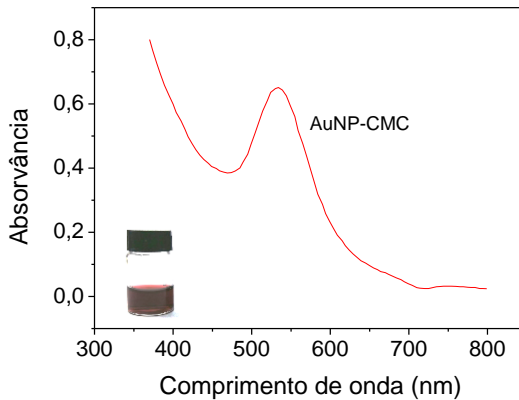
4.3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.3.1. Caracterização do nanomaterial

A caracterização das AuNP-CMC e AuNP-CMC-xGnP foi realizada por espectrofotometria UV-vis, TEM e medidas de potencial Zeta. A partir da análise do espectro UV-vis das AuNP-CMC, representado na Figura 31, é possível constatar a formação de partículas metálicas com tamanho nanométrico pela presença da banda plasmônica de superfície em aproximadamente 532 nm. Também vale ressaltar que a

cor vermelha intensa da dispersão sintetizada (imagem inserida na Figura 31) é bem característica de nanopartículas de ouro.

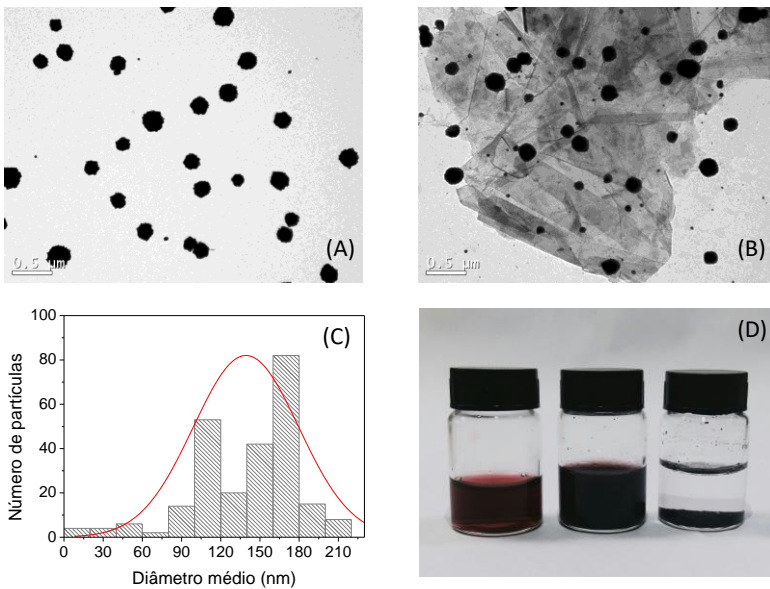
Figura 31. Espectro UV-vis para a dispersão de AuNP-CMC.



A Figura 32 apresenta as micrografias de TEM obtidas para as AuNP-CMC e AuNP-CMC-xGnP. Nela é possível observar que as AuNP-CMC são nanométricas, esféricas e estão bem dispersas no biopolímero utilizado como estabilizante (Figura 32-A). Estas partículas apresentaram diâmetro médio de aproximadamente $140,0 \pm 0,2$ nm, que foi estimado por um conjunto de 300 partículas encontradas em áreas arbitrariamente escolhidas das imagens TEM. A distribuição de tamanho das nanopartículas obtidas é mostrada no histograma da Figura 32-C. Por outro lado, as xGNPs que constituem o nanocompósito (AuNP-CMC-xGnP) foram observadas nas imagens de TEM como retângulos compostos por múltiplas camadas de grafeno, variando de dezenas a centenas de nanômetros. Esta estrutura lamelar típica de nanoplaquetas

de grafite pode ser observada na Figura 32-B, bem como a presença de AuNPs anexadas às folhas de grafeno. A Figura 32-D mostra fotografias das dispersões de AuNP-CMC, AuNP-CMC-xGnP e xGnP em água (da esquerda para à direita). Como pode ser observado, as AuNPs apresentaram cor vermelha intensa (característica de nanopartículas de ouro) e, coloração preta após adição das xGnPs, resultando em uma dispersão de AuNP-CMC-xGnP. Por fim, pode-se notar que as xGnPs não são dispersas diretamente em água, devido as interações de *Van der Waals* entre as camadas de grafeno que constituem sua estrutura, confirmando o importante papel das AuNP-CMC para esta finalidade.

Figura 32. (A) Imagens representativas de TEM para a dispersão de AuNP-CMC. (B) Imagens representativas de TEM para a dispersão de AuNP-CMC-xGnP. (C) Histograma baseado no tamanho de aproximadamente 300 partículas. (D) Ilustração das dispersões obtidas. Na sequência: AuNP-CMC, AuNP-CMC-xGnP e xGnP em água.

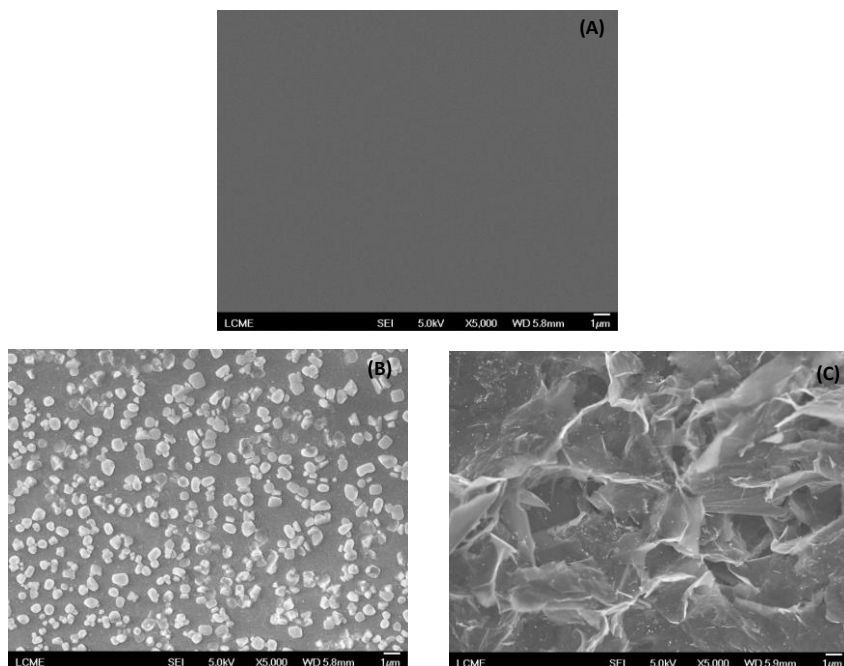


O potencial Zeta das AuNP-CMC e AuNP-CMC-xGnP foi estimado, respectivamente, como $-30,40 \text{ mV} \pm 0,09$ e $-16,1 \text{ mV} \pm 0,7 \text{ mV}$ indicando uma superfície carregada negativamente em ambos os casos. Isto se deve, principalmente, pela presença de grupos carboxílicos da CMC que estão em sua maioria desprotonados ($-\text{COO}^-$; $\text{pka} \approx 4,0$) no pH da suspensão ($\text{pH} \approx 5,5$) e que envolvem a superfície das AuNPs, pelo menos parcialmente.

4.3.2. Caracterização morfológica da superfície do eletrodo

As características morfológicas da superfície dos eletrodos GCE, AuNP-CMC/GCE e AuNP-CMC-xGnP/GCE foram investigadas por SEM-FEG. A partir das imagens de SEM-FEG (Figura 33), é possível observar três diferentes morfologias correspondentes a cada etapa de modificação. Para o GCE (Figura 33-A), observa-se uma área bem uniforme, oposta às representadas na Figura 33-B e C, referentes a modificação da superfície de carbono vítreo com AuNP-CMC e AuNP-CMC-xGnP, respectivamente. Na Figura 33-B é possível notar a presença de partículas de AuNP-CMC bem distribuídas sobre a superfície (sem formação de grandes agregados). Enquanto, na Figura 33-C uma morfologia superficial caracterizada por uma mudança notável na estrutura do material é observada. Isto se deve, especialmente, a presença das xGnP no nanocompósito que apresenta estrutura lamelar, também observada nas micrografias de TEM (Figura 32-B). A partir das imagens de SEM-FEG pode-se concluir que o filme de AuNP-CMC-xGnP recobre completamente a superfície do GCE e que a rugosidade observada nesta superfície parece contribuir para um aumento na área do eletrodo.

Figura 33. Imagens representativas de SEM-FEG obtidas utilizando uma tensão de aceleração de 5,0 kV e ampliação de 5.000x para as superfícies: (A) GCE. (B) AuNP-CMC/GCE. (C) AuNP-CMC-xGnP/GCE.



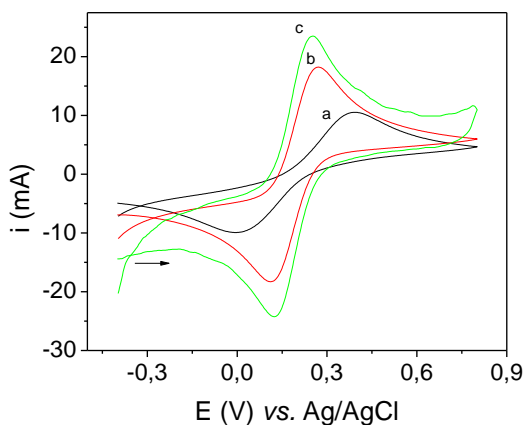
4.3.3. Caracterização eletroquímica

A caracterização eletroquímica dos eletrodos foi realizada por CV e EIS utilizando $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ ($5,0 \text{ mmol L}^{-1}$ em $\text{KCl } 0,1 \text{ mol L}^{-1}$) como sonda redox. Estes estudos permitiram investigar os fenômenos da interface eletrodo/solução e, desta forma, foi possível avaliar a influência de cada modificador sobre o comportamento eletroquímico dos eletrodos.

4.3.3.1. Voltametria Cíclica

A Figura 34 mostra os voltamogramas cíclicos obtidos para diferentes eletrodos a uma taxa de velocidade de 20 mV s^{-1} . Como mostrado, um par de picos redox bem definido, relativo à $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$, foi observado empregando os eletrodos: (b) AuNP-CMC/GCE e (c) AuNP-CMC-xGnP/GCE. Esses eletrodos apresentaram aumento na corrente de pico e diminuição na distância entre os potenciais de pico (ΔE_p) em relação ao eletrodo sem modificação (a), o que indica um favorecimento cinético e termodinâmico da reação nessas superfícies. Desta maneira, pode-se concluir que os nanomateriais utilizados na modificação do GCE são promissores e podem ser aplicados no desenvolvimento de eletrodos quimicamente modificados.

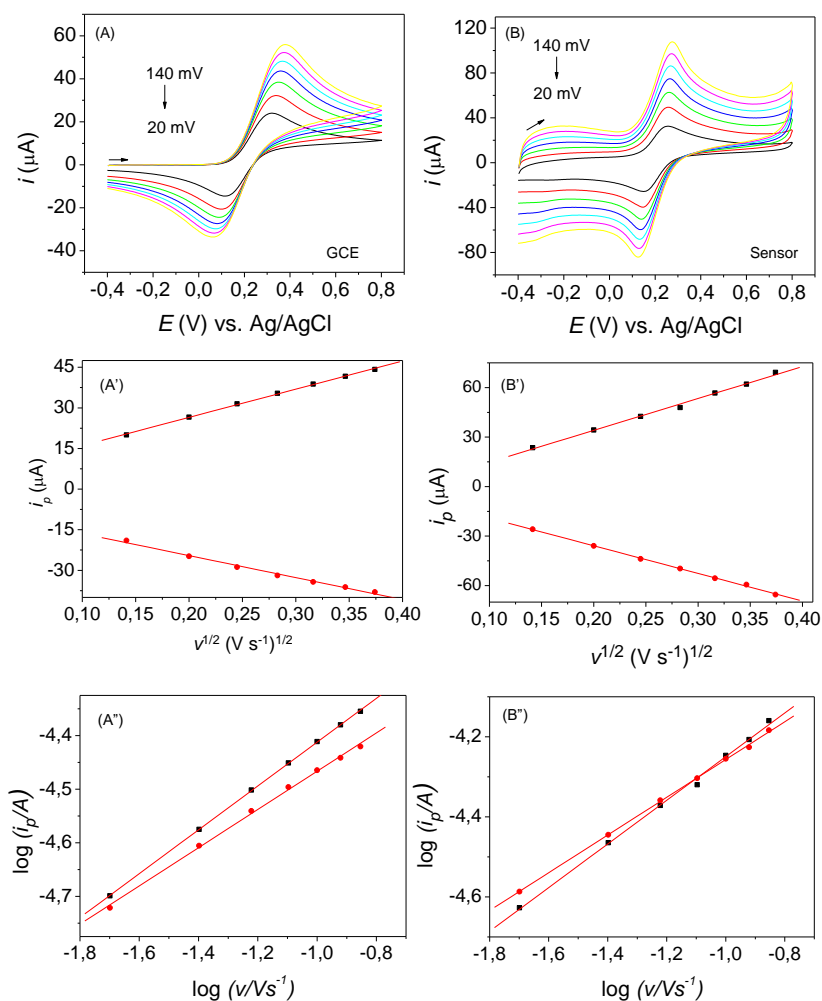
Figura 34. CV voltamogramas para o sistema $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ ($5,0 \text{ mmol L}^{-1}$, em $\text{KCl } 0,1 \text{ mol L}^{-1}$), empregando os eletrodos: (a) GCE, (b) AuNP-CMC/GCE e (c) AuNP-CMC-xGnP/GCE.



4.3.3.1.1. Estudo de velocidade

A Figura 35 mostra a influência da velocidade de varredura (ν) sobre o comportamento eletroquímico da sonda redox $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ na superfície de um GCE e na superfície do eletrodo proposto. As medidas foram realizadas por CV, na faixa de 20 a 140 mV s^{-1} (com intervalos de 20 mV s^{-1}). Neste estudo, foi possível observar que as correntes de pico aumentaram linearmente com a raiz quadrada da velocidade de varredura (Figura 35-A' e B'). Esta relação indica que o transporte da espécie eletroativa do seio da solução para a superfície do eletrodo é controlado por difusão. Outra maneira de avaliar o transporte de massa predominante se dá a partir do coeficiente angular do plot $\log i_p$ vs. $\log \nu$, que sugere um processo redox controlado por difusão quando a inclinação da reta é de 0,5 e adsorção quando próximo de 1,0 (GOSSER, 1993). Para o eletrodo AuNP-CMC-xGnP/GCE (Figura. 35-B'') a inclinação das curvas foram de 0,545 para a espécie anódica e 0,471 para a catódica, indicando que o processo redox é regido por difusão. O mesmo processo também foi observado para o GCE (inclinação de 0,409 para a espécie anódica e 0,356 para a catódica).

Figura 35. (A) CV voltamogramas obtidos com o GCE utilizando 5,0 mmol L⁻¹ de [Fe(CN)₆]^{3-/4-} em KCl 0,1 mol L⁻¹, em diferentes velocidades de varredura (20 - 140 mV s⁻¹). (A') i_p vs. $v^{1/2}$. (A'') $\log i_p$ vs. $\log v$. (B) CV voltamogramas obtidos com o eletrodo proposto nas mesmas condições experimentais. (B') i_p vs. $v^{1/2}$. (B'') $\log i_p$ vs. $\log v$.



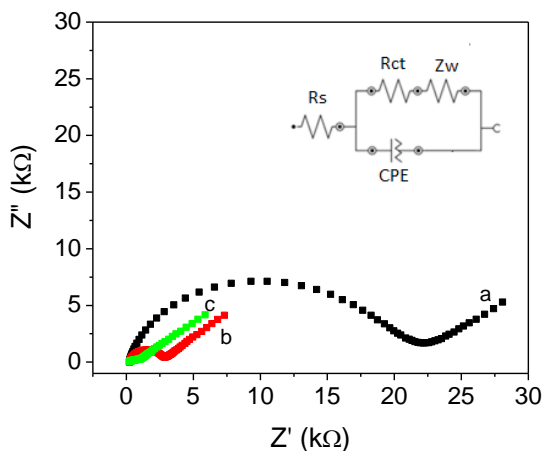
As áreas dos eletrodos também foram estimadas por CV através da resposta redox das espécies de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ e de acordo com a linearização da equação de *Randles-Sevcik*: $i_p = 2,69 \times 10^5 \text{ A D}^{1/2} n^{3/2} c v^{1/2}$ (Figura 35-A' e B'), onde: i_p corresponde a corrente de pico (A), A representa a área eletroativa do eletrodo (cm^2), D o coeficiente de difusão da espécie $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ ($6,2 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$), n o número de elétrons transferidos na reação redox, v a velocidade de varredura (V s^{-1}) e c a concentração de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ (mol cm^{-3}). As áreas médias foram calculadas como $0,058 \pm 0,002 \text{ cm}^2$ para o eletrodo nanostruturado e $0,015 \pm 0,001 \text{ cm}^2$ para GCE. Este aumento de área (quase 4x), obtido com a modificação do substrato, contribui para o aumento da sensibilidade na detecção da espécie eletroativa e está de acordo com os resultados obtidos por SEM-FEG (seção 4.3.2). Vale ressaltar ainda que um aumento nas correntes de pico e uma diminuição na distância entre os potenciais de pico (ΔE_p) foram observados nos voltamogramas cíclicos (Figura 35-B) para o eletrodo proposto em relação ao GCE, indicando que a reação de transferência de elétrons foi favorecida na superfície do AuNP-CMC-xGnP/GCE.

4.3.3.2. Impedância eletroquímica

A EIS foi realizada a fim de avaliar o efeito de cada nanomaterial utilizado como modificador na resistência à transferência de carga (R_{ct}) dos diferentes eletrodos construídos. A R_{ct} está diretamente relacionada à cinética de transferência de elétrons da sonda redox, neste caso $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$, na superfície dos eletrodos e corresponde ao diâmetro do semi-círculo no gráfico de Nyquist (Figura 37).

A Figura 36 mostra os diagramas de Nyquist obtidos para diferentes eletrodos: (a) GCE, (b) AuNP-CMC/GCE e (c) AuNP-CMC-xGnP/GCE. Pode-se observar uma taxa de transferência de elétrons mais rápida para AuNP-CMC-xGnP/GCE (R_{ct} 1,37 $k\Omega$) e AuNP-CMC/GCE (R_{ct} 2,66 $k\Omega$) em comparação ao eletrodo não modificado (GCE, R_{ct} 21,0 $k\Omega$), indicando que os nanomateriais facilitam o processo de transferência de carga, especialmente devido à alta condutividade das AuNPs e xGnPs. Estes resultados são corroborados pelos estudos de CV (seção 4.3.3.1).

Figura 36. EIS para o sistema $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ (5,0 mmol L^{-1} , em KCl 0,1 mol L^{-1}), empregando os eletrodos: (a) GCE, (b) AuNP-CMC/GCE e (c) AuNP-CMC-xGnP/GCE. Amplitude da perturbação aplicada foi de 10 mV, potencial de circuito aberto, e a faixa de frequência aplicada de 100.000 a 0,1 Hz.



4.3.4. Influência do pH no comportamento eletroquímico da levodopa

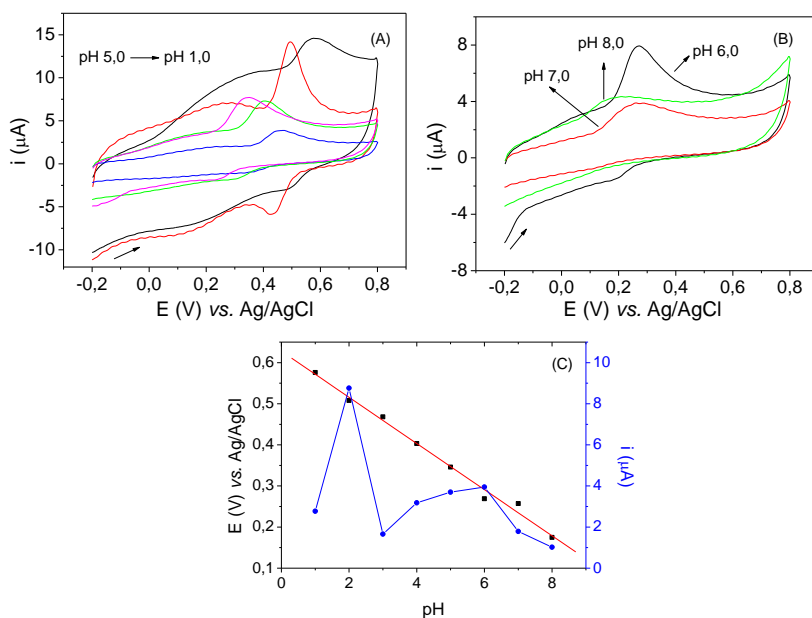
O efeito do pH no comportamento eletroquímico da levodopa foi estudado por CV a uma velocidade de varredura de 20 mV s⁻¹, empregando o eletrodo nanoestruturado proposto. Os estudos foram realizados em triplicata utilizando 33,8 μmol L⁻¹ de levodopa em tampão Britton Robison (BR) 0,1 mol L⁻¹ na faixa de pH de 1,0 a 8,0.

Na Figura 37 é possível observar que tanto o potencial quanto a corrente de pico são dependentes do pH do meio. O potencial de pico de oxidação (E_{po}) desloca para valores menores a medida que o pH aumenta, o que indica um envolvimento de prótons no processo de oxidação da levodopa (Figura 37-C). Esta mudança no potencial segue uma tendência linear, representada pela seguinte equação: $E_{po} = 0,630 \pm 1,07 \times 10^{-2} - 0,0561 \pm 2,13 \times 10^{-3} \text{ pH}$ ($r^2 = 0,996$). O declive de $-56,1 \text{ mV pH}^{-1}$ indica que o número de prótons e elétrons transferidos na reação eletroquímica da levodopa é o mesmo (em concordância com o estimado pela equação de Nernst, 59 mV n^{-1} , para reações que envolvem igual número de prótons e elétrons).

De acordo com os voltamogramas cíclicos apresentados na Figura 37, é possível notar que a reação redox da levodopa parece ser favorecida (apresenta maior corrente de pico, menor ΔE_p e melhor reversibilidade) em pH baixo (especialmente em pH 2,0). Também se observa que a reversibilidade da reação muda à medida que o pH aumenta, mostrando comportamento quase reversível em soluções com $\text{pH} \leq 6,0$ e comportamento irreversível a valores de pH mais elevados (Figura 37-B). Uma diminuição considerável nas correntes de pico referentes a redução

da levodopa é observada à medida que o pH aumenta. Isto se deve, provavelmente, pela ciclização do grupo amina presente na estrutura da levodopa, que é uma reação dependente do pH e do tempo.

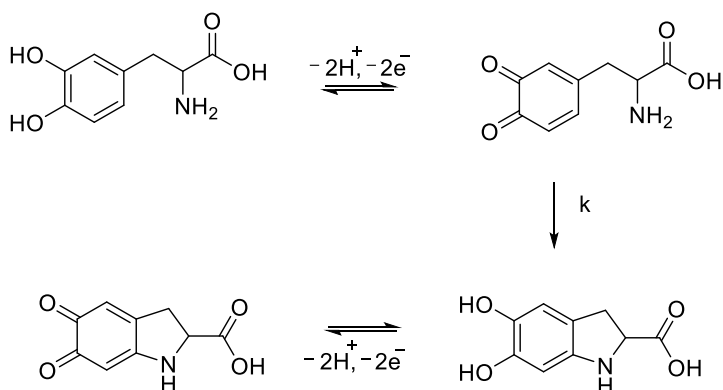
Figura 37. (A) CV voltamogramas para a levodopa ($33,8 \mu\text{mol L}^{-1}$) em tampão BR ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$) a 20 mV s^{-1} utilizando o eletrodo nanoestruturado proposto para: (A) pH: 1,0 a 5,0. (B) pH: 6,0 a 8,0. (C) Influência do pH na corrente de pico resultante (expresso como resposta relativa) e influência do pH no potencial de pico.



Ciolkowsk e colaboradores (CIOLKOWSK *et. al.* 1994) propuseram um mecanismo para a oxidação da levodopa que envolve dois

prótons e dois elétrons (Figura 38). Nesta proposta, os autores também demonstram a possibilidade de uma reação de ciclização da amina que é dependente da constante k . Segundo o mecanismo, a *o*-quinona produzida na oxidação da levodopa contém tanto um anel deficiente em elétrons quanto uma amina doadora de elétrons e, desta forma, pode ser reduzida diretamente ou pode passar por uma etapa de ciclização da amina que apresenta uma limitação cinética (k). Isto ocorre quando o grupo amina é desprotonado (dependência do pH) e a molécula sofre adição de 1,4 Michael seguida de ciclização. Acredita-se que a reação de oxidação da levodopa, nas condições de trabalho do método proposto ($\text{pH} \approx 2,0$), ocorra por via direta para a formação da *o*-quinona. No entanto, à medida que o pH aumenta a reação torna-se menos reversível (aumento considerável no ΔE_p) seguindo o mecanismo de ciclização e confirmando a limitação cinética da reação eletroquímica (AKAHGAR *et. al.* 2015).

Figura 38. Proposta de mecanismo de oxidação para a levodopa (adaptado de AKAHGAR *et. al.* 2015).



4.3.5. Comportamento eletroquímico da levodopa em diferentes eletrodos

Diferentes eletrodos foram preparados para avaliar a contribuição de cada modificador, separadamente, no comportamento eletroquímico da levodopa e seus desempenhos comparados ao eletrodo sem modificação (GCE). Os eletrodos investigados foram: (a) AuNP-CMC-xGnP/GCE, (b) AuNP-CMC/GCE e (c) GCE. As medidas eletroquímicas foram realizadas por CV (Figura 39-A) e por SWV (Figura 39-B), em triplicata, usando 50,0 e 19,6 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de levodopa, respectivamente, em solução de ácido sulfúrico (0,1 mol L^{-1} ; pH 1,2).

Nos voltamogramas cíclicos representados na Figura 39-A nota-se um deslocamento do potencial de pico oxidação da levodopa para potenciais menores utilizando os eletrodos modificados (com deslocamento de aproximadamente 150 mV para o eletrodo nanoestruturado proposto, por exemplo). Isto indica um favorecimento termodinâmico da reação de oxidação com esses eletrodos, em relação ao GCE, provando que a reação necessita de menor energia para ocorrer nessas superfícies. A reversibilidade da reação também foi melhorada, especialmente para AuNP-CMC-xGnP/GCE, que exibiu um ΔE_p de aproximadamente 0,054 V enquanto o eletrodo não modificado exibiu ΔE_p de 0,457 V, caracterizando uma reação irreversível. Um aumento considerável na corrente de pico anódica também foi observado com o eletrodo proposto em comparação aos demais, apontando um favorecimento cinético. Estes resultados indicam que o melhor efeito electrocatalítico foi observado para o AuNP-CMC-xGnP/GCE, demonstrando potencial aplicação deste eletrodo para detecção de levodopa.

A Figura 39-B apresenta os voltamogramas de onda quadrada obtidos empregando os mesmos eletrodos utilizados na CV, onde também pode ser observado que os modificadores (a e b) contribuíram tanto para a cinética como para a termodinâmica da reação redox da levodopa. No entanto, o eletrodo construído apenas pelo filme de AuNP-CMC não contribuiu de forma apreciável para o aumento da corrente de pico (aproximadamente 22%) porém, a reação tornou-se termodinamicamente mais favorável nessa superfície em relação ao GCE, já que a posição do pico se deslocou em direção a um menor potencial. Além disso, as AuNPs-CMC são fundamentais para a estabilidade do filme depositado na superfície do eletrodo, pois melhoram a adesão e impedem que o filme seja lixiviado para a solução. Em concordância com os resultados de CV, a maior corrente de pico para a levodopa também foi obtida utilizando o AuNP-CMC-xGnP/GCE. O eletrodo contendo o filme do nanocompósito (curva a) apresentou um ganho de corrente de aproximadamente 43 vezes em relação ao eletrodo sem modificação (curva c). Esses resultados sugerem um processo de oxidação mais rápido na superfície do eletrodo, o que pode ser atribuído ao nanomaterial utilizado na modificação da superfície, que resultou em um aumento considerável na condutividade e na área do eletrodo. Um esquema representativo da reação redox que ocorre na superfície do eletrodo proposto está descrito na Figura 40. A corrente resultante no final do processo (oxidação da levodopa para a sua respectiva *o*-quinona, seguida da redução eletroquímica do produto formado) foi proporcional à concentração de levodopa em solução e foi utilizada para sua quantificação.

Figura. 39. (A) CV voltamogramas obtidos utilizando (a) AuNP-CMC-xGnP/GCE, (b) AuNP-CMC/GCE e (c) GCE em ácido sulfúrico ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$; pH 1,2) contendo $50,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ de levodopa a uma taxa de varredura de 20 mV s^{-1} . (B) SWV voltamogramas obtidos utilizando (a) AuNP-CMC-xGnP/GCE, (b) AuNP-CMC/GCE e (c) GCE em ácido sulfúrico ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$; pH 1,2) contendo $19,6 \mu\text{mol L}^{-1}$ de levodopa. Inseto: resposta relativa.

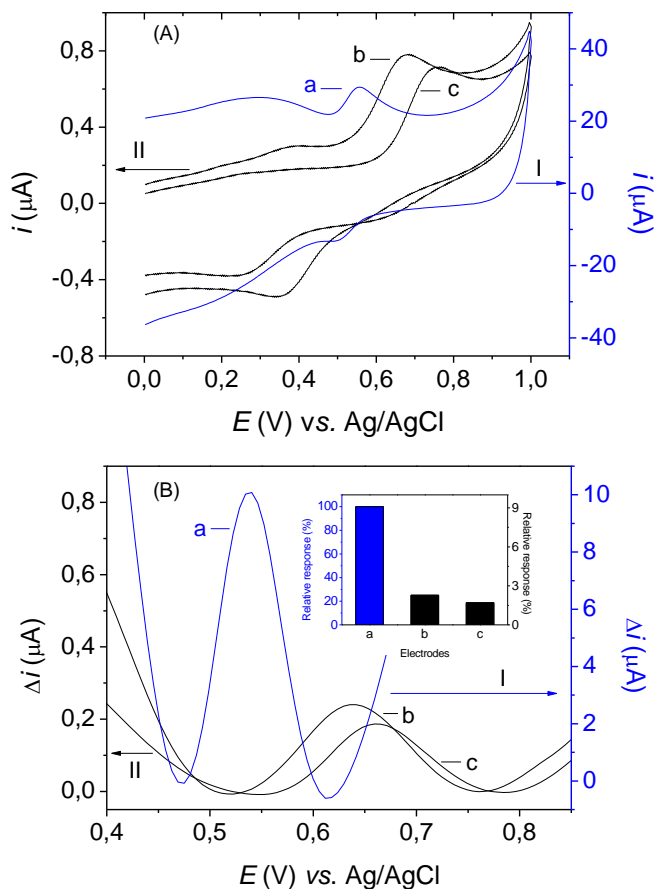
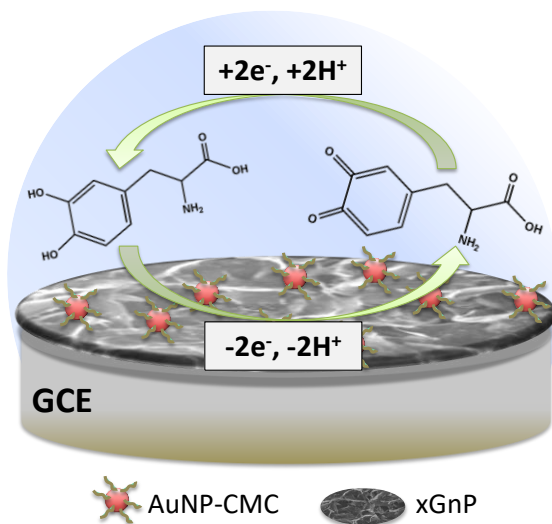


Figura 40. Representação esquemática do processo redox da levodopa na superfície do eletrodo nanoestruturado e componentes utilizados para a construção do eletrodo.



4.3.6. Otimização das condições experimentais

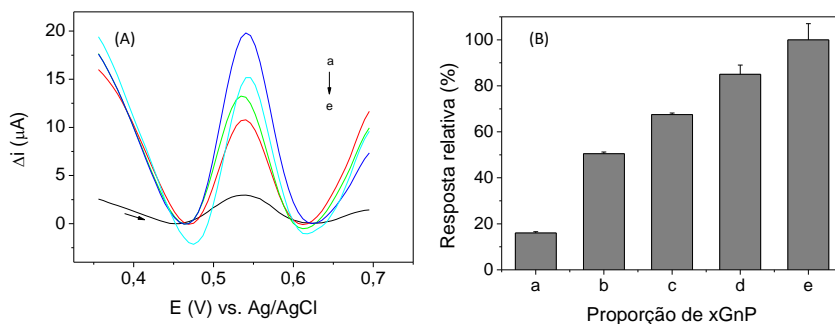
A fim de otimizar a construção do eletrodo e as condições experimentais do método proposto, parâmetros como: proporção dos modificadores e espessura do filme nanoestruturado, natureza e pH do eletrólito suporte, escolha e otimização da técnica eletroanalítica foram investigados, em triplicata, para obter o melhor desempenho analítico (melhor sensibilidade e definição de pico para a determinação de levodopa).

4.3.6.1. Construção do eletrodo

O nanocompósito (AuNP-CMC-xGnP) utilizado como modificador na construção do eletrodo nanoestrurado foi preparado pela dispersão das xGnPs nas AuNP-CMC em diferentes proporções. As proporções investigadas foram: 0,10; 0,25; 0,50; 0,75 e 1,00% (m/v, xGnP/AuNP-CMC). Neste estudo apenas a quantidade de xGnP foi variada, mantendo fixo o volume de AuNP-CMC. Isto porque, testes preliminares mostraram que as AuNPs-CMC não contribuem consideravelmente para o aumento do sinal analítico da levodopa (seção 4.3.5, Figura 39). Porém, são essenciais para a construção do eletrodo, uma vez que, facilitam a dispersão das xGnPs e favorecem a adesão do nanocompósito na superfície de carbono vítreo.

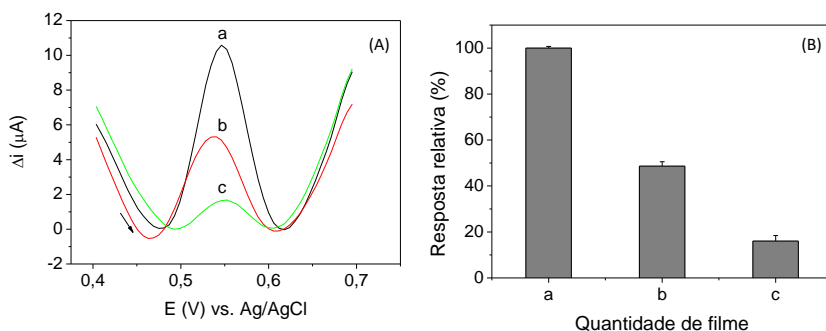
Conforme indica a Figura 41, os eletrodos que obtiveram as melhores respostas foram os construídos com 0,75 % e 1,00 %. No entanto, esses eletrodos não apresentaram estabilidade e repetibilidade entre as medidas, ocorrendo perda da resposta de corrente a medida que aumentava o número de medidas com o mesmo eletrodo. Logo, optou-se por trabalhar com o eletrodo construído na proporção de 0,50 % (Figura 41-B, eletrodo c) que além de apresentar boa resposta analítica para a levodopa, também mostrou excelente estabilidade, mesmo após um muitas medidas (pelo menos 10 medidas sucessivas).

Figura 41. (A) SWV voltamogramas para $24,4 \mu\text{mol L}^{-1}$ de levodopa em ácido sulfúrico ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$; pH 1,2) utilizando eletrodos construídos a partir de: (a) 0,25, (b) 0,10, (c) 0,50, (d) 0,75 e (e) 1,0% (m/v, xGnP/AuNP-CMC). (B) Resposta relativa.



Outro parâmetro investigado na construção do eletrodo foi a quantidade do filme nanoestruturado, que foi avaliada pela construção de três eletrodos contendo: uma, duas e três camadas de AuNP-CMC-xGnP (0,5%, m/v) (onde cada camada era feita a partir do gotejamento de $2,0 \mu\text{L}$ da dispersão do nanocompósito). O estudo foi realizado por SWV utilizando $19,6 \mu\text{mol L}^{-1}$ de levodopa em ácido sulfúrico ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$; pH 1,2). Como pode ser observado na Figura 42, a melhor resposta de corrente para a levodopa foi obtida com o eletrodo construído com apenas uma camada do filme (eletrodo a). Neste estudo pode-se concluir que a medida que aumenta o número de camadas do filme, diminui a resposta de corrente. Isto acontece porque grandes quantidades do filme torna o eletrodo mais instável e conseqüentemente as medidas menos precisas, uma vez que, parte do filme acaba lixiviando para a solução.

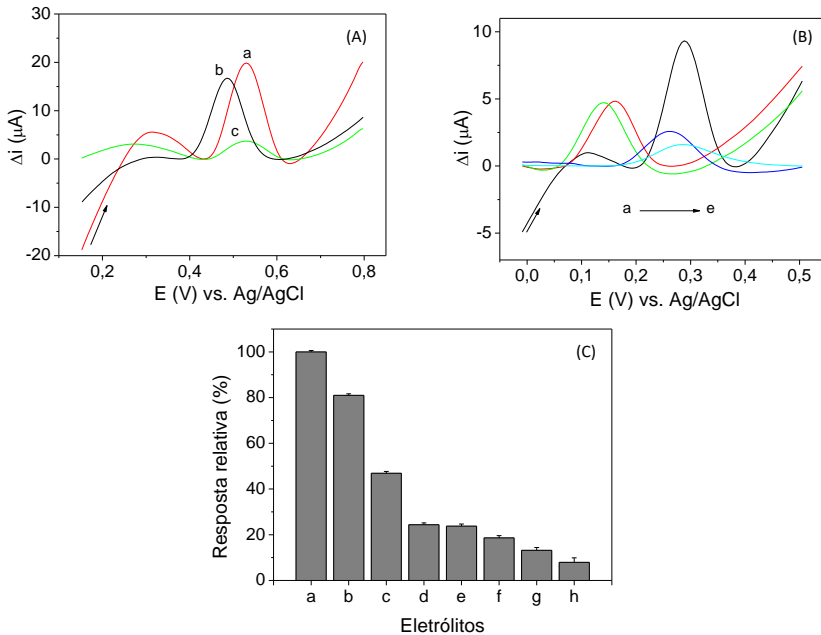
Figura 42. (A) SWV voltamogramas para: (a) uma camada, (b) duas camadas e (c) três camadas do filme do nanocompósito, utilizando $19,6 \mu\text{mol L}^{-1}$ de levodopa em ácido sulfúrico ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 1,2). (B) Resposta relativa.



4.3.6.2. Estudo da natureza do eletrólito de suporte

Para investigar a influência da natureza do eletrólito de suporte na resposta eletroquímica da levodopa, foram avaliados: KCl (pH 5,3), NaCl (pH 5,5), HCl (pH 1,2), H_2SO_4 (pH 1,2), BR (pH 2,0), tampão acetato (pH 5,0), tampão fosfato (pH 7,0) e PBS (pH 7,4), todos em concentração $0,1 \text{ mol L}^{-1}$. Os estudos foram realizados por SWV, em triplicata, utilizando $33,8 \mu\text{mol L}^{-1}$ de levodopa. Como pode ser observado na Figura 43 o eletrólito que apresentou melhor resposta de corrente foi o ácido sulfúrico ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 1,2), sendo selecionado como eletrólito de suporte nos demais estudos. Estes resultados mostram concordância com o estudo do comportamento da levodopa com a variação de pH apresentado na seção 4.3.4., onde indica um favorecimento da reação redox da levodopa em pH ácido.

Figura 43. (A) SWV voltamogramas para levodopa ($33,8 \mu\text{mol L}^{-1}$) em: (a) H_2SO_4 ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 1,2), (b) BR ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 2,0), (c) HCl ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 1,2). (B) SWV voltamogramas para: (a) PBS ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 7,4), (b) tampão fosfato ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 7,0), (c) KCl ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 5,3), (d) NaCl ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 5,5) e (e) tampão acetato ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 5,0). (C) Resposta relativa.



4.3.6.3. Escolha e otimização da técnica voltamétrica

A fim de escolher entre as técnicas eletroanalíticas de LSV, DPV e SWV a que apresentaria maior sensibilidade na detecção de levodopa, um estudo comparativo foi realizado utilizando o eletrodo proposto em

ácido sulfúrico ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$; pH 1,2) e solução estoque de levodopa $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$. Para melhor avaliação, foram construídas curvas de calibração (Figura 44) para cada uma das técnicas na faixa de concentração de $4,97$ a $47,6 \mu\text{mol L}^{-1}$. Os parâmetros de calibração obtidos estão apresentados na Tabela 6.

Figura 44. Curvas de calibração para a levodopa empregando SWV (frequência de 30 Hz, incremento de potencial de 6 mV, amplitude de pulso de 50 mV), DPV (incremento de 5 mV, amplitude de 25 mV, tempo de duração do pulso 0,05 s com intervalo de 0,5 s) e LSV (velocidade de varredura 50 mV s^{-1}).

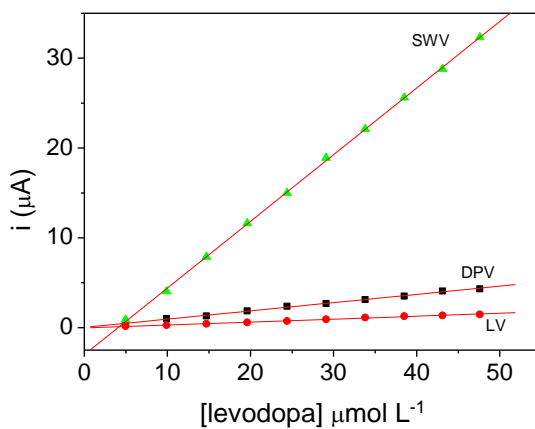


Tabela 6. Resumo dos parâmetros de calibração de cada técnica.

Técnica	Equação da reta	r^2	LOD ($\mu\text{mol L}^{-1}$)
SWV	$\Delta_i = -2,55 \times 10^{-6} \pm 1,32 \times 10^{-7} + 0,739$ [LD]	0,999	0,58
DPV	$i = 3,10 \times 10^{-8} \pm 5,56 \times 10^{-8} + 0,0918$ [LD]	0,998	1,82
LSV	$i = 3,66 \times 10^{-8} \pm 2,69 \times 10^{-8} + 0,0328$ [LD]	0,997	2,44

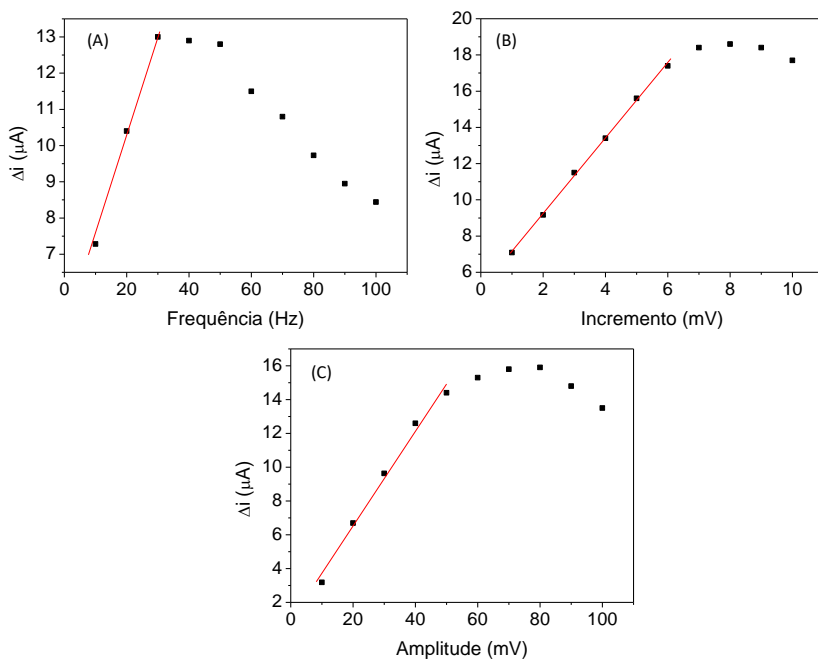
[LD] = concentração de levodopa

A partir dos resultados apresentados na Tabela 6 é possível observar que a técnica mais sensível e adequada para a detecção de levodopa é a SWV. A SWV apresentou maior sensibilidade (observada pela inclinação da curva de calibração) e menor limite de detecção em comparação a DPV e LSV e, desta forma, foi a técnica escolhida para o desenvolvimento do método. Isto ocorre especialmente porque a reação redox da levodopa, nas condições de trabalho, é quase-reversível, ou seja, apresenta pico de oxidação e redução e a SWV consegue medir um diferencial dessas correntes, enquanto a DPV e a LSV medem apenas o pico de oxidação da levodopa.

Após selecionar a técnica, foi realizado a otimização dos seus parâmetros experimentais. A frequência (10-100 Hz), a amplitude de pulso (10-100 mV) e o incremento de potencial (1-10 mV) foram investigados com o objetivo de alcançar uma melhoria ainda maior na sensibilidade. A otimização foi realizada fixando dois parâmetros em valores intermediários e variando apenas um por vez. Os estudos foram realizados em ácido sulfúrico (0,1 mol L⁻¹; pH 1,2) contendo 24,4 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de levodopa. De acordo com os resultados apresentados na Figura 45,

as melhores condições experimentais foram obtidas utilizando 30 Hz de frequência, 50 mV de amplitude de pulso e 6 mV de incremento de potencial. Isto porque, até estes valores é possível obter uma relação linear entre a corrente de pico e o parâmetro da técnica, assegurando assim um transporte de massa controlado por difusão.

Figura 45. Otimização dos parâmetros da SWV: (A) frequência, (B) incremento de potencial, (C) amplitude de pulso. Estudo realizado utilizando o eletrodo proposto em ácido sulfúrico ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$) contendo em $24,4 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ de levodopa.

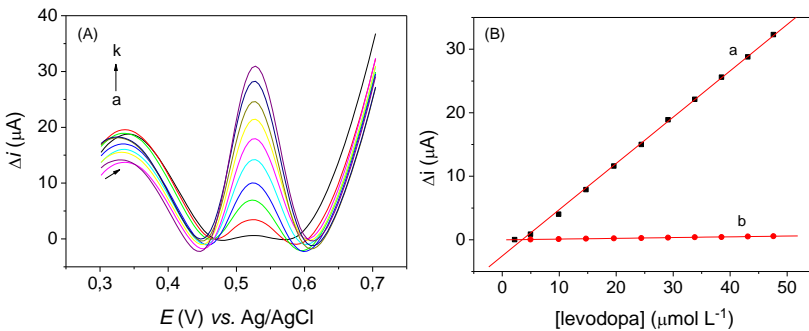


4.3.7. Desempenho analítico do eletrodo

4.3.7.1. Curva de calibração

Sob as condições de trabalho otimizadas, as curvas de calibração para a levodopa (Figura 46) foram construídas por SWV, a partir do gráfico de corrente de pico resultante *vs.* a concentração de levodopa ($n = 3$), utilizando o eletrodo nanoestruturado proposto e o eletrodo sem modificação (GCE) em uma faixa de potencial de +0,3 a +0,7 V *vs.* Ag/AgCl.

Figura 46. (A) SWV voltamogramas obtidos utilizando o eletrodo nanoestruturado em ácido sulfúrico ($0,1 \text{ mol L}^{-1}$; pH 1,2) para diferentes concentrações de levodopa: (a) 2,0; (b) 4,97; (c) 9,90; (d) 14,7; (e) 19,6; (f) 24,4; (g) 29,1; (h) 33,8; (i) 38,5; (j) 43,1; (k) $47,6 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$. (B) Curva de calibração utilizando: (a) AuNP-CMC-xGnP/GCE, (b) GCE.



A curva de calibração obtida para o eletrodo AuNP-CMC-xGnP/GCE (Figura 46-B; curva a) foi linear de 2,0 a $47,6 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ e

apresentou a seguinte equação de regressão: $\Delta i = -2,55 \times 10^{-6} \pm 1,32 \times 10^{-7} + 0,739 \pm 3,48 \times 10^{-7}$ [levodopa] ($r^2 = 0,999$), onde Δi corresponde a corrente de pico resultante e [levodopa] a concentração de levodopa em mol L^{-1} . O limite de detecção (LOD), calculado como três vezes o desvio padrão do intercepto/inclinação (nível de confiança de 95%) foi de $0,58 \mu\text{mol L}^{-1}$ enquanto o limite de quantificação (LOQ), calculado como dez vezes o desvio padrão do intercepto/inclinação, foi de $1,8 \mu\text{mol L}^{-1}$. A curva de calibração para o GCE (Figura 46-B; curva b) apresentou linearidade de 4,97 a $47,6 \mu\text{mol L}^{-1}$ e equação de regressão de $\Delta i = -1,80 \times 10^{-8} \pm 5,0 \times 10^{-9} + 0,01205 \pm 1,80 \times 10^{-4}$ [levodopa] ($r^2 = 0,999$) com LOD e o LOQ de 1,40 e $4,97 \mu\text{mol L}^{-1}$, respectivamente.

A Tabela 7 mostra uma comparação entre o eletrodo nanoestruturado e outros eletrodos modificados descritos na literatura para a determinação de levodopa. Nela é possível observar que o AuNP-CMC-xGnP/GCE apresenta menor LOD que a maioria dos eletrodos, mostrando ser uma ferramenta adequada para a detecção de levodopa. Também vale ressaltar que quando comparado ao eletrodo sem modificação, o eletrodo nanoestruturado apresentou maior sensibilidade (observado através da inclinação da curva de calibração) e menor LOD, indicando um desempenho analítico satisfatório.

Tabela 7. Comparação entre diferentes eletrodos aplicados na detecção de levodopa.

Eletrodo	Faixa linear ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	LOD ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Referência
MBICI/NiO/NPs/CPE	0,7 - 900	0,4	FOULADGAR <i>et. al.</i> , 2015
gold screen-printed electrode	1 – 660	0,99	BERGAMINI <i>et. al.</i> , 2005
Co(DMG) ₂ CIPy/MW CNT/BPPG	3 – 100	0,86	LEITE <i>et. al.</i> , 2012
GC/graphene electrode	1 – 16	0,8	WANG <i>et. al.</i> , 2013
Ru-red-NaY/CPE	120 - 10000	85	TEIXEIRA <i>et.</i> <i>al.</i> , 2015
AuNP-CMC- xGnP/GCE	2,0 – 47,6	0,58	Este estudo

MBICI: líquido iônico cloreto de 1-metil-3-butylimidazólio; NiO/NPs: nanopartículas de NiO; BPPG: eletrodo de grafite pirolítico de plano basal; Co(DMG)₂CIPy: complexo de cloro(piridina)bis(dimetilglioximato)cobalto(III); MWCNT: nanotubos de carbono de paredes múltiplas; Ru-red: complexo trinuclear de rutênio amina [(NH₃)₅Ru^{III}-O-Ru^{IV}(NH₃)₄-O-Ru^{III}(NH₃)₅]⁶⁺; NaY: zeólita do tipo Y.

4.3.7.2. Estudos de seletividade e precisão

O estudo de interferentes foi realizado por SWV monitorando a variação da resposta eletroquímica da levodopa (em concentração fixa de

19,6 $\mu\text{mol L}^{-1}$) com concentrações crescentes de substâncias consideradas potencialmente interferentes. Os compostos estudados foram: ácido ascórbico, ácido cítrico, cafeína, glicose, dopamina e carbidopa nas proporções de concentração de 1:1, 1:5 e 1:10 (levodopa: interferente). Os resultados demonstraram que ácido ascórbico, ácido cítrico, cafeína e glicose (substâncias normalmente presentes em fluidos biológicos) apresentaram baixo grau de interferência, com desvio de sinal para levodopa menor que 5,0% em todas as concentrações estudadas. Por outro lado, a dopamina e a carbidopa interferiram em todas as proporções testadas. Isto porque, estas catecolaminas exibem estrutura semelhante à da levodopa e potenciais de pico muito próximos, causando sobreposição do sinal e, conseqüentemente, valor de corrente superestimado. Portanto, em amostras contendo essas catecolaminas, como em fluidos biológicos (sangue e urina, por exemplo) e alguns fármacos, não é possível determinar levodopa isoladamente. Isso sugere que o eletrodo proposto não é específico para levodopa, mas seletivo para esse grupo de compostos. Ainda assim, pode ser usado para determinação de levodopa em amostras farmacêuticas que contêm apenas levodopa como princípio ativo e outros excipientes, ou ainda em amostras que contenham outras catecolaminas detectando um somatório desse grupo de moléculas, que pode ser expresso em função da concentração de levodopa.

A precisão do método foi investigada por estudos de repetibilidade intra-day e repetibilidade entre eletrodos. A repetibilidade intra-day foi avaliada a partir de 10 medidas consecutivas, utilizando o mesmo eletrodo e as mesmas condições experimentais (levodopa 9,90 $\mu\text{mol L}^{-1}$ em ácido sulfúrico 0,1 mol L^{-1} , por SWV). Os valores de desvio padrão relativo (RSD) obtidos foram inferiores a 2,0%, o que demonstra uma boa

precisão entre as medidas. A repetibilidade entre eletrodos, determinada a partir da resposta de três eletrodos preparados de forma independente utilizando o mesmo procedimento, mostra boa reprodutibilidade no processo de construção do filme e também evidencia que o método é adequado para fins analíticos (RSD de 4,0%).

4.3.7.3. Estudos de recuperação e aplicação analítica

Os ensaios de recuperação e a aplicação analítica do método foram realizados por SWV ($n = 3$), por de adição de padrão, utilizando uma solução estoque de levodopa $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ e uma amostra de fármaco contendo 200 mg de levodopa por cápsula (amostra A).

Os estudos de recuperação avaliam a exatidão de um determinado método analítico e consistem na adição de diferentes concentrações conhecidas do analito sobre uma amostra, seguida pela determinação dessa concentração adicionada (BRITO *et al.*, 2003). A recuperação de levodopa foi avaliada a partir de três diferentes concentrações (4,97, 9,90 e $14,7 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$). A percentagem de recuperação variou de 98,6 a 106,8 %, indicando baixa interferência da matriz e exatidão satisfatória da metodologia empregada (Tabela 8).

Tabela 8. Estudo de recuperação para levodopa em fármaco utilizando o eletrodo proposto.

Amostra	levodopa ($\mu\text{mol L}^{-1}$)		Recuperação ^b (%)
	Adicionado	Recuperado ^a	
A	4,97	5,31 \pm 0,1	106,8
	9,90	10,0 \pm 0,2	101,0
	14,7	14,5 \pm 0,1	98,6

a: Média \pm desvio padrão; n=3. b Recuperação = (valor encontrado/valor adicionado) x 100.

A fim de avaliar a eficiência do método desenvolvido, a quantificação de levodopa em amostra de fármaco foi realizada com o eletrodo AuNP-CMC-xGnP/GCE e comparada com um método espectrofotométrico utilizado como comparativo (MOHAMED *et. al.*, 2009). Os resultados obtidos também foram comparados com o rótulo do medicamento e encontram-se na Tabela 9. Como pode ser observado, o teor de levodopa determinado pelo eletrodo foi consistente com o especificado pelo fabricante no rótulo do produto (erro relativo < 1,0%) e com o determinado pelo método comparativo (erro relativo de 6,8%). Estes resultados indicam que a metodologia é adequada para a determinação de levodopa em fármacos.

Tabela 9. Determinação de levodopa pelo método eletroquímico e pelo método espectrofotométrico (MOHAMED *et. al.*, 2009).

Amostra	Levodopa (mg cápsula ⁻¹)				
	Valor rotulado	Método proposto ^a	Método comparativo ^a	Er ₁ (%) ^b	Er ₂ (%) ^c
A	200,00	202,09 ± 4,17	217,03 ± 1,20	6,8	1,04

a: Média ± desvio padrão (n=3); b: $Er_1 = [(\text{método comparativo} - \text{método proposto}) / (\text{método comparativo})] \times 100$; c: $Er_2 = [(\text{valor rotulado} - \text{método proposto}) / (\text{valor rotulado})] \times 100$;

CAPÍTULO 5: CONCLUSÕES

Neste trabalho de Tese foram desenvolvidos dois novos eletrodos modificados com diferentes materiais nanoestruturados. Associados a uma metodologia eletroanalítica adequada, estes eletrodos foram aplicados com sucesso na determinação de dopamina e levodopa em amostras farmacêuticas.

O primeiro eletrodo estudado e apresentado neste documento foi o biossensor para a detecção de dopamina. Este biossensor foi construído a partir da modificação interna de um eletrodo de pasta de carbono com a enzima LAC imobilizada em AuNP-PAH (identificado como AuNP-PAH-LAC/CPE). Os resultados obtidos neste trabalho foram satisfatórios: elevada sensibilidade e baixo LOD para a detecção de dopamina, boa repetibilidade e estabilidade do biossensor. Estes bons resultados podem ser atribuídos à eficiente imobilização da enzima no nanomaterial, que proporcionou um ambiente adequado para a estabilização da LAC. Vale destacar ainda que a utilização da enzima contribuiu na alta eficiência da cinética redox na superfície do eletrodo e na seletividade do método. Além disso, as propriedades catalíticas e a elevada condutividade das AuNP-PAH também contribuíram para a reação de transferência de elétrons, que pode ser comprovado por estudos de EIS e CV. Também podem ser destacadas como vantagens do método a facilidade na construção do biossensor e o baixo custo de instrumentação e reagentes. Portanto, conclui-se que a metodologia proposta se mostrou bastante simples e eficiente (com boa precisão e exatidão) para a determinação dopamina em amostras farmacêuticas,

podendo ser estendido a amostras mais complexas como sangue e urina, por exemplo.

O segundo eletrodo proposto foi construído a partir da modificação da superfície de um eletrodo de carbono vítreo com um filme nanoestruturado de um compósito híbrido constituído por AuNP-CMC e xGnP (identificado como AuNP-CMC-xGnP/GCE). Este eletrodo apresentou parâmetros analíticos satisfatórios (boa sensibilidade, baixo LOD, boa precisão e exatidão) e foi aplicado com sucesso na determinação de levodopa em fármaco. O bom desempenho da metodologia proposta se deve, especialmente, pela presença do nanomaterial utilizado na modificação do GCE, que melhorou algumas propriedades do eletrodo base como o aumento da área e da condutividade, tornando a reação de transferência de elétrons mais fácil. Portanto, o eletrodo desenvolvido neste trabalho pode ser considerado uma ferramenta conveniente para a determinação rápida e precisa de levodopa em amostras farmacêuticas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRUNA, H. D.; WALSH, J. L.; MEYER, T. J.; MURRAY, R. W. Kinetic Applications of Chemically Modified Electrodes. Oxidation, Reduction and Linkage Isomerization of a Nitro Complex of Ruthenium Attached to a Silanized Pt Electrode. **Inorg. Chem.** 20, 1481–1486, 1981.

ABDEL-GHANY, M. F.; LOBNA, H.; HUSSEIN, A.; MIRIAM, F.; YOUSSEF, M. Investigation of different spectrophotometric and chemometric methods for determination of entacapone, levodopa and carbidopa in ternary mixture. *Spectrochim. Acta Mol. Biomol. Spectrosc.*, 171, 236 – 245, 2017.

ADEKUNLE, A. S.; AGBOOLA, B. O.; PILLAY, J.; OZOEMENA, K. I. Electrocatalytic detection of dopamine at single-walled carbon nanotubes-iron(III) oxide nanoparticles platform. **Sens. Actuators, B**, 148, 93–102, 2010.

AGOSTINHO, S. M. L.; VILLAMIL, R. F. V.; NETO, A. A.; ARANHA, H. O eletrólito de suporte e suas múltiplas funções em processos de eletrodo. **Quim. Nova**, 27, 813–817, 2004.

AKHGAR, M. R.; SALARI, M.; ZAMANI, H. Simultaneous determination of levodopa, NADH, and tryptophan using carbon paste electrode modified with carbon nanotubes and ferrocenedicarboxylic acid. **J. Solid. State Electrochem.**, 15, 845 – 853, 2011.

AHAMED, M.; KHAN, M. A. M.; SIDDIQUI, M. K. J.; ALSALHI M. S.; ALROKAYAN, S. A. Green synthesis, characterization and evaluation of biocompatibility of silver nanoparticles. **Physica E**, 43, 1266–1271, 2011.

ALFAYA, A. A. S.; KUBOTA, L. T. A utilização de materiais obtidos pelo processo de sol-gel na construção de biossensores. **Quim. Nova**, 25, 835-841, 2002.

ALLEN, M. J.; TUNG, V. C.; KANER, Richard B. Honeycomb carbon: a review of graphene. **Chem. Rev.**, 110, 132-145, 2009.

ALTUN, G. D.; CETINUS, S. A. Immobilization of pepsin on chitosan beads. **Food Chem.**, 100, 964–971, 2007.

AMORIM, C. G.; ARAUJO, A. N.; MONTENEGRO, M. C. B. S. M. Exploiting sequential injection analysis with lab-on-valve and miniaturized potentiometric detection. Epinephrine determination in pharmaceutical products. **Talanta**, 72, 1255–1260, 2007.

ANSARI, S. A.; HUSAIN, Q. Potential applications of enzymes immobilized on/in nano materials: A review. **Biotechnol. Adv.**, 30, 512–523, 2012.

ARAKI, K. Estratégia supramolecular para nanotecnologia. **Quim. Nova**, 30, 1484–1490, 2007.

ARSLAN, F. An amperometric biosensor for uric acid determination prepared from uricase immobilized in polyaniline-polypyrrole film. **Sensors**, 8, 5492- 5500, 2008.

ASLAN, K.; PÉREZ-LUNA, V. H. Surface modification of colloidal gold by chemisorption of alkanethiols in the presence of a nonionic surfactant. **Langmuir**, 18, 6059–6065, 2002.

AVEROUS, L.; FAUCONNIER, N.; MORO, L.; FINGANT, C. Blends of thermoplastic starch and polyesteramide: processing and properties. **J. Appl. Polym. Sci.** 76, 1117–1128, 2000.

BARANOWSKA, I.; PLONKA, J. Determination of levodopa and biogenic amines in urine samples using high-performance liquid chromatography. **J. Chromatogr. Sci.**, 46, 30–34, 2008.

BARD, A. J.; FAULKNER, L. R. **Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications**, 2a ed. New York: John Wiley & Sons Inc, 2001.

BARNES, T. M.; VAN DE LAGEMAAT, J.; LEVI, D.; RUMBLES, G.; COUTTS, T. G.; WEEKS, C. L. Optical characterization of highly conductive single-wall carbon-nanotube transparent electrodes. **Phys. Rev. B**, 23, 23541001–2235411, 2007.

BARROS, D. S. **Estudo Espectroscópico e Morfológico de Filmes Automontados de Azocompostos**. 2006. 116f. Dissertação (Mestrado

em Química). Instituto de Química, Universidade de Campinas, Campinas, 2006.

BEITOLLAHI, H.; RAOOF, J. B.; HOUSSEINZADEH, R.; Application of a Carbon-Paste Electrode Modified with 2,7-Bis(ferrocenyl ethyl)fluoren-9-one and Carbon Nanotubes for Voltammetric Determination of Levodopa in the Presence of Uric Acid and Folic Acid. **Electroanalysis**, 23, 1934–1940, 2011.

BENVIDI, A.; DEGHANI-FIROUZABADI, A.; MAZALOUM-ARDAKANI, A.; MIRJALILI, F.; ZARE, R. Electrochemical deposition of gold nanoparticles on reducee grapheme oxide modified glassy carbon electrode for simultaneous determination of levodopa, uric acid and folic acid. *J. Electroanal. Chem.* 736, 22-29, 2015.

BERG, J. M.; TYMOCZKO, J. L.; STRYER, L. **Biochemistry**. 5.ed. New York: W. H. Freeman, 2002. 974p.

BERGAMINI, M. F.; SANTOS, A. L.; STRADIOTTO, N. R.; ZANONI, M. V. B. Asisposable electrochemical sensor for the rapid detemination of levodopa. **J. Pharm. Biomed. Anal.** 39, 54–49, 2005.

BOTELHO, E. C.; SCHERBAKOFF, N.; REZENDE, M. C. Porosity control in glassy carbon by rheological study of the furfuryl resin. **Carbon**, 39, 45-52, 2001.

BOURBONNAIS, R.; LEECH, D.; PAICE, M. G. Electrochemical analysis of the interactions of laccase mediators with lignin model compounds. **Biochim. Biophys. Acta, Gen. Subj.**, v. 1379, p. 381–390, 1998.

BRITO, N. M.; JUNIOR, O. P. A.; POLESE, L.; RIBEIRO, M. L. Validação de métodos analíticos: estratégia e discussão. Pesticidas: **R. Ecotoxicol. Meio Ambiente**, 13, 129 – 146, 2003.

BRONDANI, D.; SOUZA, B.; SOUZA, B. S.; NEVES, A.; VIEIRA, I. C. PEI-coated gold nanoparticles decorated with laccase: a new platform for direct electrochemistry of enzymes and biosensing applications. **Biosens. Bioelectron.**, 42, 242–247, 2013.

BRUST, M.; FINK, J; BETHELL, D.; SCHUFRIN, D. J.; KIELY, C. J. Synthesis and reactions of functionalized gold nanoparticles. **J. Chem. Soc., Chem. Commun.** 1655–1656, 1995.

CAMPÀS M.; CARPENTIER, R.; ROUILLON, R. Plant tissue-and photosynthesis-based biosensors. **Biotechnol. Adv.**, 26, 370–378, 2008.

CAMPBELL, F. W.; COMPTON, R. G. The use of nanoparticles in electroanalysis: an updated review. **Anal. Bioanal. Chem.**, 396, 241–259, 2010.

CASANOVA, M. C. R. **Síntese, caracterização e estudo da estabilidade de nanopartículas metálicas estabilizadas em**

polieletrólitos e tióis. 2010. 87f. Dissertação (Mestrado em Química). Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, 2010.

CASTAÑEDA, M. T.; ALEGRET, S.; MERKOÇI. Electrochemical sensing of DNA using gold nanoparticles. **Electroanalysis**, 19, 743–753, 2007.

CEBRIÁN, V.; MARTÍN-SAAVEDRA, F.; YANGUE, C.; ARRUEBO, M.; SANTAMARÍA, J.; VILABOIA, N. Size-dependent transfection efficiency of PEI-coated gold nanoparticles. **Acta Biomater.**, 7, 3645–3655, 2011.

CHAMPE, P. C.; HARVEY, R. A. **Bioquímica ilustrada.** 2. ed. Porto Alegre: Artes Médicas, 1996. 446 p.

CHAMSAZ, M.; SAFAVI, A.; FADAEE, J. Simultaneous kinetic-spectrophotometri determination of carbidopa, levodopa and methldopa in the presence of citrate with the aid of multivariate calibration and artificial neural networks. **Anal. Chim. Acta**, 603, 140–146, 2007.

CHEN, X.; ZHANG, J.; ZHAI, H.; CHEN, X.; HU, Z. Determination of levodopa by capillary zone electrophoresis using an acidic phosphate buffer and its application in the analysis of beans. **Food. Chem.**, 92, 381–386, 2005.

CHEN, S.-M.; LIU, M.-I. Electrochemical self-assembly of nordihydroguaiaretic acid/Nafion modified electrodes and their

electrocatalytic properties for catecholamines and ascorbic acid. **J. Electroanal. Chem.**, 579, 153–162, 2005.

CHEVIONA, P.; GOUANVEA, F.; ESPUCHE, E. Green synthesis of colloid silver nanoparticles and resulting biodegradable starch/silver nanocomposites. **Carbohydr. Polym.**, 108, 291–298, 2014.

CHERNYSHOV, D. V.; SHVEDENE, N. V.; ANTIPOVA, E. R.; PLETNEV, I. V. Ionic liquid-based miniature electrochemical sensors for the voltammetric determination of catecholamines. **Anal. Chim. Acta**, 621, 178–184, 2008.

CHILDS, R. E.; BARDSLEY, W. G. The steady-state kinetics of peroxidase with 2,2'-azino-di-(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid) as chromogen. **Biochem. J.**, 145, 93–103, 1975.

CHUNG, D. D. L. Review graphite. **J. Mater. Sci.**, 22, 1475–1489, 2002.

CIOLKWSKI, E. L.; MANESS, K. M.; CHLIL, P. S.; WIGHTMAN, R. M. Disproportionation during electrooxidation of catecholamines at carbon-fiber microelectrodes. *Anal. Chem.*, 66, 3611 – 3617, 1994.

CODOGNATO, L.; WINTER, E.; PASCHOAL, J.A.R.; SUFFREDINI, H.B.; CABRAL, M.F.; MACHADO, S.A.S.; RATH, S. Electrochemical behavior of dopamine at a 3,3'- dithiodipropionic acid self-assembled monolayers. **Talanta**, 2007, 72, 427–433.

CONNOLLY, B. S.; LANG, E. A. Pharmacological treatment of Parkinson disease: a review. **JAMA**, 311, 1670–1683, 2014.

COUTO, S. R.; HERRERA, J. L. T. Industrial and biotechnological applications of laccases: A review. **Biotechnol. Adv.**, 24, 500–513, 2006.

DALLA-VECCHIA, R.; NASCIMENTO, M. G.; SOLDI, V. Aplicações sintéticas de lípases imobilizadas em polímeros. **Quim. Nova**, 27, 623–630, 2004.

DEVLIN, T. M. **Manual de bioquímica com correlações clínicas**. São Paulo (SP): Edgard Blucher, 2007. 1186p.

DURÁN, N.; ROSA, M. A.; D'ANNIBALE, A.; GIANFREDA, L. Applications of laccases and tyrosinases (phenoloxidasas) immobilized on different supports: a review. **Enzyme and Microbial Technology**, 31, 907–931, 2002.

D'ORAZIO, P. Biosensors in clinical chemistry. **Clin. Chim. Acta**, 334, 41–69, 2003.

EASTOE, J.; HOLLAMBY, M. J.; HUDSON, L. Recent advances in nanoparticle synthesis with reversed micelles. **Adv. Colloid Interface Sci.**, 128, 5–15, 2006.

ENSAFI, A. A.; DADKHAH, M.; KARIMI-MALEH, H. Determination of isoproterenol and uric acid by voltammetric method using carbon

nanotubes paste electrode and p-chloranil. **Colloids Surf. B**, 84, 148–154, 2011.

FAHN, S. J. Levodopa in the treatment of Parkinson's disease. *Neural Transm. Suppl.* 71, 1 – 5, 2006.

FARMACOPÉIA AMERICANA. **United States Pharmacopeia National Formulary XXIII**, US Pharmacopeia Convention, US Pharmacopeia Convention, Rockville, MD, 1995. Dopamine hydrochloride; p. 473.

FATIBELLO-FILHO, O.; CAPELATO, M. D. Biossensores. **Quim. Nova**, 15, 28–39, 1992.

FENG, J.-J.; ZHAO, G.; XU, J.-J.; CHEN, H.-Y. Direct electrochemistry and electrocatalysis of heme proteins immobilized on gold nanoparticles stabilized by chitosan. **Anal. Biochem.**, 342, 280–286, 2005.

FERNÁNDEZ-FERNÁNDEZ, M.; SANROMÁN, M. A.; MOLDES, D. Recent developments and applications of immobilized laccase – a review. **Biotechnol. Adv.**, 31, 1808–1825, 2013.

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

FERSHT, A. **Estructura y mecanismo de los enzimas**. Barcelona (Espanha): Reverte, 1980. 370 p.

FERREIRA, F. D. P.; SILVA, L. I. B.; FREITAS, A. C.; ROCHA-SANTOS, T. A. P.; DUARTE, A. C. High performance liquid chromatography coupled to an optical fiber detector coated with laccase for screening catecholamines in plasma and urine. **J. Chromatogr., A**, 1216, 7049–7054, 2009.

FOULADGAR, M.; KARIMI-MALEH, H.; GUPTA, V. K. Highly sensitive voltammetric sensor based on NiO nanoparticle room temperature ionic liquid modified carbon paste electrode for levodopa analysis. **J. Mol. Liq.**, 208, 78–83, 2015.

FRANZOI, A. C.; BRONDANI, D.; ZAPP, E.; MOCCELINI, S. K.; FERNANDES, S. C.; VIEIRA, I. C.; DUPONT, J. Incorporação de líquidos iônicos e nanopartículas metálicas na construção de sensores eletroquímicos. **Quim. Nova**, 34, 1042–1050, 2011.

FRANZOI, A. C. **Incorporação de nanopartículas metálicas dispersas em líquidos iônicos no desenvolvimento de biossensores para determinação de luteolina e quercetina**. Tese. 2011. 125f. (Doutorado em Química) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

FREIRE, R.S.; PESSOA, C.A. E KUBOTA, L. T. Emprego de monocamadas auto-organizadas no desenvolvimento de sensores eletroquímicos. **Quim. Nova**, 2003, 26, 381–389.

FRENS, G. Controlled nucleation for the regulation of the particle size in monodisperse gold suspensions. **Nature: Phys. Sci.**, 241, 20–22, 1973.

GASTONE, F.; TOSCO, T.; SETHI, R. Green stabilization of microscale iron particles using guar gum: bulk rheology, sedimentation rate and enzymatic degradation. **J. Colloid Interf. Sci.**, 421, 33-43, 2014.

GENG, Y.; WANG, S. J.; KIM, J. Preparation of graphite nanoplatelets and graphene sheets. **J. Colloid Interf. Sci.**, 336, 592-598, 2009.

GIACOMELLI, C.; CKLESS, K.; GALATO, D.; MIRANDA, F. S.; SPINELLI, A. Electrochemistry of caffeic acid aqueous solutions with pH 2.0 to 8.5. **J. Braz. Chem. Soc.**, 13, 332–338, 2002.

GIARDINA, P.; FARACO, V.; PEZZELLA, C.; PISCITELLI, A.; VANHULLE, S.; SANNIA, G. Laccases: a never-ending story. **Cell. Mol. Life Sci.**, 67, 369–385, 2010.

GOMES, S. A. A. S.; REBELO, M. J. F. A new laccase biosensor for polyphenols determination. **Sensors**, 3, 166–175, 2003.

GOMES, E.; GUEZ, M. A. U.; MARTIN, N.; SILVA, R. Enzimas termoestáveis: fontes, produção e aplicação industrial. **Quim. Nova**, 30, 136–145, 2007.

GONÇALVES, E. S. **Morfologia, estrutura e eletroquímica de carbono vítreo reticulado como eletrodo tridimensional obtido em diferentes temperaturas**. 2007. 140 f. Dissertação (Doutorado em Engenharia Aeronáutica e Mecânica na área de Física e Química dos Materiais Aeroespaciais) - CTA/ITA, São José dos Campos, 2007.

GOYAL, R. N.; BISHNOI, S. Simultaneous determination of epinephrine and norepinephrine in human blood plasma and urine samples using nanotubes modified edge plane pyrolytic graphite electrode. **Talanta**, 84, 78–83, 2011.

GOODMAN, L. S.; GILMAN, A. G.; HARDMAN, J. G.; LIMBIRD, L. E. **As bases farmacológicas da terapêutica**. 10. ed., Rio de Janeiro: McGraw-Hill, 2003. 1436p.

GOSSER, K. D. **Cyclic Voltammetry: Simulation and Analysis of Reaction Mechanisms**, VCH New York, 1993.

GUO, S.; DONG, S. Biomolecule-nanoparticle hybrids for electrochemical biosensors. **Trends Anal. Chem.**, 28, 96–109, 2009.

HARTMAN, J.; ALBERTSSON, A. C. SÖDERQVIST L. M.; SJÖBERG, J. Oxygen barrier materials from renewable sources:

Material properties of softwood hemicellulose-based films. **J. Appl. Polym. Sci.**, 100, 2985–2991, 2006.

HE, F.; ZHAO, D. Manipulating the Size and Dispersibility of Zerovalent Iron Nanoparticle by Use of Carboxymethyl Cellulose Sabilizers, **Environ. Sci. Technol.**, 41, 6216-6221, 2007.

HUANG, Q.; ZHANG, H.; HU, S.; LI, F.; WENG, W.; CHEN J.; WANG, Q.; HE, Y.; ZHANG, W.; BAO, X. A sensitive and reliable dopamine biosensor was developed based on the Au@carbon dots-chitosan composite film. **Biosens. Bioelectron.**, 52, 277–280, 2014.

HUBLIK, G.; SCHINNER, F. Characterization and immobilization of the laccase from *Pleurotus ostreatus* and its use for the continuous elimination of phenolic pollutants. **Enz. Microb. Technol.**, 27, 330–336, 2000.

HUNTER, R. J.; **Zeta potential in colloid science – Pinciples and applications**. 1. ed., Australia: Academic press 1988. 9723 p.

IKEMOTO, S.; YANG, C.; TAN, A. Basal ganglia circuit loops, dopamine and motivation: A review and enquiry. **Behav. Brain Res.**, 290, 17–31, 2015.

IUPAC – International Union of Pure and Applied Chemistry. **Compendium of Chemical Terminology – Gold Book**. Version 2.3, 2011-10-11.

IYER, P. V.; ANANTHANARAYAN, L. Enzyme stability and stabilization – Aqueous and non-aqueous environment. **Process Biochem.**, 43, 1019–1032, 2008.

IZAOUMEN, N.; CUBILLANA-AGUILERA, L. M.; NARANJO-RODRÍGUEZ, I.; CISNEROS, J. L. H.-H.; BOUCHTA, D.; TEMSAMANI, K. R.; PALACIOS-SANTANDER, J. M. β -Sonogel-carbon electrodes: A new alternative for the electrochemical determination of catecholamines. **Talanta**, 78, 370–376, 2009.

JAHNZ, U.; SCHUBERT, M.; BAARS-HIBBE, H.; VORLOP, K.-D. Process for producing the potential food ingredient DFA III from inulin: screening, genetic engineering, fermentation and immobilization of inulase II. **Int. J. Pharm.**, 256, 199–206, 2003.

JENSEN, U. B.; VAGIN, M.; KOROLEVA, O.; SUTHERLAND, D. S.; BESENBACHER, F.; FERAPONTOVA E. E. Activation of laccase bioelectrocatalysis of O₂ reduction to H₂O by carbon nanoparticles. **J. Electroanal. Chem.**, 667, 11–18, 2012.

JESUS, P.C. **Enzimas imobilizadas em Crisotila e Organo-Gel: aplicação na resolução de ácidos racêmicos**, Tese. 1998. 125f. (Doutorado em Química) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

JIANRONG C.; YUQING M.; NONGYUE H.; XIAOHUA, W.; SIJIAO, L. Nanotechnology and biosensors. **Biotechnol. Adv.**, 22, 505–518, 2004.

JOSHI, P.; JOSHI, H.C.; SANGHI, S. K.; KUNDUN, S. Immobilization of monoamine oxidase on eggshell membrane and its application in designing an amperometric biosensor for dopamine. **Microchim. Acta**, 169, 383–388, 2012.

KATO, D.; KUNITAKE, M.; NISHIZAWA, M.; MATSUE, T.; MIZUTANI, F. Amperometric nitric oxide microsensor using twodimensional cross-linked Langmuir–Blodgett films of polysiloxane copolymer. **Sens. Actuators B**, 2005, 108, 384–388.

KANG, X.; WANG, J.; WU, H.; LIU, J.; AKSAY, I. A.; LIN, Y. A grapheme based electrochemical sensor for sensitive detection of paracetamol. **Talanta**, 81, 754 – 759, 2010.

KATZUNG, B. G. **Basic & clinical pharmacology**. 7. ed. Stamford: Appleton & Lange, 1998. 1151p.

KERMAN, K.; SAITO, M.; YAMAMURA, S.; TAKAMURA, Y.; TAMIYA, E. Nanomaterial-based electrochemical biosensors for medical applications. **Trends Anal. Chem.**, 27, 585–592, 2008.

KIM, J.; GRATE, J.; WANG, P. Nanostructures for enzyme stabilization. **Chem. Eng. Sci.**, 61, 1017–1026, 2006.

KIM, W. H.; KARIM, M. M.; LEE, S. H. Simultaneous determination of levodopa and carbidopa by synchronous fluorescence spectrometry using double scans. **Anal. Chim. Acta**, 619, 2–7, 2008.

KLOTZBACH, T. L.; WATT, M.; ANSARI, Y.; MINTEER, S. D. Improving the microenvironment for enzyme immobilization at electrodes by hydrophobically modifying chitosan and Nafion® polymers. **J. Membr. Sci.**, 311, 81–88, 2008.

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de bioquímica**. 4. ed. São Paulo: Sarvier, 1202 p., 2006.

LEITE, F. R. R.; MARONEZE, C. M.; OLIVEIRA, A.; SANTOS, W. T. P.; DAMOS, F. S.; LUIZ, R. C. S. Development of a sensor for L-Dopa based on Co(DMG)2ClPy/multi-walled carbon nanotubes composite immobilized on basal plane pyrolytic graphite electrode. **Bioelectrochemistry**, 86, 22 – 29, 2012.

LI, B.; ZHONG, W. Review on polymer/grafite nanoplatelet nanocomposites. **J. Mater. Sci.**, 46, 5595 – 5614, 2011.

LIN, L.; LIAN, H. T.; SUN, X. Y.; YU, Y. M.; LIU, B. An L-dopa electrochemical sensor based on a graphne doped molecularly imprinted chitosan film. **Anal. Methods**, 7, 1387–1394, 2015.

LIU, K.E.; ABRUÑA, H. D. Electroanalysis of aromatic aldehydes with modified carbon paste electrodes. **Anal. Chem.**, 61, 2599–2602, 1989.

LIU, J.; JÖNSSON, J. Å.; JIANG, G. Application of ionic liquids in analytical chemistry. **Trends Anal. Chem.**, 24, 20–27, 2005.

LOFRANO, G. CAROTENUTO, M. LIBRALATO, G. DOMINGOS, P. R.; MARKUS, A.; DINI, L.; GAUTAM, R. K.; BALANTONI, D.; ROSSI, M.; SHARMA, S. K.; CHATTOPADHYAYA, M. C.; GIUGNI, M.; MERIC, S. Polymer functionalized nanocomposites for metals removal from water and wastewater: An overview. **Water Res.**, 92, 22–37, 2016.

LOWINSOHN, D.; BERTOTTI, M. Sensores eletroquímicos: considerações sobre mecanismo de funcionamento e aplicações no monitoramento de espécies químicas em ambientes microscópicos. **Quim. Nova** 6, 1318–1325, 2006.

LU, J. DO, I. FUKUSHIMA, H. LEE, I. DRZAL, L. T. Stable aqueous suspension and self-assembly of graphite nanoplatelets coated with various polyelectrolytes. **J. Nanomater.**, 2, 1–11, 2010.

LU, J., DRZAL, L. T., WORDEN, R. M., LEE, I. Simple fabrication of a highly sensitive glucose biosensor using enzymes immobilized in exfoliated graphite nanoplatelets nafion membrane. **Chem. Mater.**, 19, 6240–6246, 2007.

LUI, X.; XIE, L.; LI, H. Electrochemical biosensor based on reduced graphene oxide and Au nanoparticles entrapped in chitosan/silica sol-gel hybrid membranes for determination of dopamine and uric acid. **J. Electroanal. Chem.**, 628, 158–163, 2012.

MADHAVI, V.; LELE, S. S. Laccase: properties and applications. **Bio. Resour.**, 4, 1694–1717, 2009.

MANJUNATHA, R.; SURESH, G.S.; MELO, J.S.; D'SOUZA, S.F.; VENKATESHA, T.V. Simultaneous determination of ascorbic acid, dopamine and uric acid using polystyrene sulfonate wrapped multiwalled carbon nanotubes bound to graphite electrode through layer-by-layer technique. **Sens. Actuators B**, 2010, 145, 643–650.

MATEO, C.; PALOMO, J. M.; FERNANDEZ-LORENTE, G.; GUISAN, J. M.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques. **Enzyme Microb. Technol.**, 40, 1451–1463, 2007.

MAYER, A. M.; STAPLES, R. C. Laccase: new functions for an old enzyme. **Phytochemistry**, 60, 551–565, 2002.

MAZLOUM-ARDAKANI, M.; AHMAD, S. H.; MAHMOUDABADI, Z. S.; KHOSHROO, A. Nano composite system based on fullerene-functionalized carbon nanotubes for simultaneous determination of levodopa and acetaminophen. **Measurement**, 91, 162–167, 2016.

MELLO, L. D.; KUBOTA, L. T. Review of the use of biosensors as analytical tools in the food and drink industries. **Food Chem.**, 77, 237–256, 2002.

MIKKELSEN, S. R.; CORTÓN, E. **Bioanalytical Chemistry**. New Jersey: John Willey and Sons, 2004. 375p.

MILLER, R. B.; DEHELEAN, L.; BÉLANGER, L. Determination of carbidopa and levodopa in human plasma by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. **Chromatographia**, 35, 607–612, 1993.

MINUSSI, R. C.; PASTORE, G. M.; DURAN, N. Potential applications of laccase in the food industry. **Trends Food Sci. Technol.**, 13, 205–216, 2003.

MOCCELINI, S. K.; FERNANDES, S. C.; VIEIRA, I. C. Bean sprout peroxidase biosensor based on l-cysteine self-assembled monolayer for the determination of dopamine. **Sens. Actuators, B**, 133, 364–369, 2008.

MOHRAMED, G. G.; NOUR-EL-DIEN, F. A.; EL-NAHAS, R. G. Spectrophotometric and standard addition methods for quantitative determination of dopamine hydrochloride and levodopa in tablets and ampoule. *Afinidad*. LXVI, 541 – 243, 2009.

MONORIZZAMAN, M.; NAKASHIMA, K.; KAMIYA, N.; GOTO, M. Recent advance of enzymatic reactions in ionic liquids. **Biochem. Eng. J.**, 48, 295–314, 2010.

MOROZOVA, O. V.; SHUMAKOVICH, G. P.; GORBACHEVA, M. A.; SHLEEV, S. V.; YAROPOLOV, A. I. “Blue” Laccases. **Biochem.**, 72, 1136–1150, 2007.

MOTTA, V. T.; **Bioquímica básica**. 2.ed. São Paulo: Autolab, 2003. 365 p.

MULCHANDANI, A.; ROGERS, K. R. **Enzyme and Microbial Biosensors**. Techniques and Protocols; Humana Press; Totowa; New Jersey, 1998.

MURRAY, R. W. Chemically Modified Electrodes. *Accts. Chem. Res.* 13, 135–141, 1980.

NALEWAJKO, E.; WISZOWATA, A.; KOJŁO, A. Determination of catecholamines by flow-injection analysis and high-performance liquid chromatography with chemiluminescence detection. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, 43, 1673–1681, 2007.

NC-IUBMB, Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology. **Enzyme nomenclature**. San Diego: Academic Press, 862 p., 1992.

OAK, J. N.; OLDENHOF, J.; VAN TOL, H. H. M. The dopamine D4 receptor: one decade of research. **Eur. J. Pharmacol.**, 405, 303–327, 2000.

OISHI, S. S. **Síntese, dopagem e caracterização das resinas furfurílica e fenol-furfurílica visando a otimização do processamento de carbono vítreo reticulado.** 2009. 103f. Dissertação (Mestrado em engenharia química) Guaratinguetá, Faculdade de engenharia do campus de Guaratinguetá, Universidade Estadual Paulista, 2009.

OLIVEIRA, I. R. W. Z.; FATIBELLO-FILHO, O. Imobilização da lacase em micropartículas de quitosana obtidas por spray drying e usadas na construção de biossensores. **Quim. Nova**, 32, 1195–1201, 2009.

OLIVEIRA, I. R. W. Z.; VIEIRA, I. C. Construção e aplicação de biossensores usando diferentes procedimentos de imobilização da peroxidase de vegetal em matriz de quitosana. **Quim. Nova**, 29, 932–939, 2006.

OPALLO, M.; LESNIEWSKI, A. A review on electrodes modified with ionic liquids. **J. Electroanal. Chem.**, 656, 2–16, 2011.

PACHECO, S. M. V.; SOARES, C. H. L. Imobilização e caracterização de lacase e seu uso na biodegradação de efluentes de indústrias papeleiras. **Quim. Nova**, 37, 209–214, 2014.

PANDEY, S.; GOSWAMI, G. K.; NANDA, K. K. Green synthesis of biopolymer-silver nanoparticle nanocomposite: An optical sensor for ammonia detection. **Int. J. Bio. Macromolec.**, 51, 583 – 589, 2012.

PARKINSON STUDY GROUP. Levodopa and the progression of Parkinson's disease. **N. Engl. J. Med.**, 351, 2498 – 2508, 2004.

PARVEEN, Q.; TAYYAB, A.; WAHID, M.; RAO, S. Facile biological approach for immobilization, physicochemical characterization and antibacterial activity of noble metals nanocomposites. **Mater Lett.**, 148, 86 – 90, 2015.

PEREIRA, A. C.; SANTOS, A. S.; KUBOTA, L. T. Tendências em modificação de eletrodos amperométricos para aplicações eletroanalíticas. **Quim. Nova**, 25, 1012–1021, 2002.

PEREIRA, E. B.; ZANIN, G. M.; CASTRO, H. F. Immobilization and catalytic properties of lipase on chitosan for hydrolysis and esterification reactions. **Braz. J. Chem. Eng.**, 20, 343–355, 2003.

PUMERA, M.; SÁNCHEZ, S.; ICHINOSE, I.; TANG, J. Electrochemical nanobiosensors, **Sens. Actuators, B**, 123, 1195–1205, 2007.

PUMERA, M.; SANCHEZ, S.; ICHINOSE, I.; TANG, J. Electrochemical nanobiosensors. **Sens. Actuat. B**, 1195-1205, 2007.

PUSH, J. M.; BRONDANI, D.; LUZA, L.; DUPONT, J.; VIEIRA, I.C. Pt-Pd bimetallic nanoparticles dispersed in an ionic liquid and peroxidase immobilized on nanoclay applied in the development of a biosensor. **Analyst**, 138, 4898–4906, 2013.

RAGHU, P.; MADHUSSUDANA, T.; GOPAL, P.; REDDAIAH, K.; SREEDHAR, N. Y. A novel horseradish peroxidase biosensor towards the detection of dopamine: A voltammetric study. **Enzyme Microb. Technol.**, 57, 8–15, 2014.

REZAI, B.; SHAMS-GHAHFAROKHI, L.; HAVAKESHIAN, E.; ENSAFI, A. A. n electrochemical biosensor based on nanoporous stainless steel modified by gold and palladium nanoparticles for simultaneous determination of levodopa and uric acid. **Talanta**, 15, 42 – 50, 2016.

RIVA, S. Laccases: blue enzymes for green chemistry. **Trends Biotechnol.**, 24, 219–226, 2006.

ROCHEFORT, D.; KOUISNI, L.; GENDRON, K. Physical immobilization of laccase on an electrode by means of poly (ethyleneimine) microcapsules. **J. Electroanal. Chem.**, 617, 53–63, 2008.

ROSSATO, S.S.; FREIRE, R.S.; DURÁN, N.; KUBOTA, L.T. Biossensores amperométricos para determinação de compostos fenólicos em amostras de interesse ambiental. **Quim. Nova**, 2001, 24, 77–86.

SALVADOR, D. **Estudo de filmes magnéticos nanoestruturados produzido com ferrofluidos**. 2011. 105f. Dissertação (Mestrado em Física). Universidade federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2011.

SÂNDULESCU, R.; TERTIS, M.; CRISTEA, C.; BODOKI, E. **New materials for construction of electrochemical biosensors. Biosensores - micro and nanoscale applications**. 1. ed. Estonia: Toonika Rinken, 2015, 466p.

SANTHANAM, N.; VIVANCO, J. M.; DECKER, S. R.; REARDON, K. F. Expression of industrially relevant laccases: prokaryotic style. **Trends Biotechnol.**, 29, 480–489, 2011.

SANTOS, J. F. L.; SANTOS, M. J. L.; THESING, A.; TAVARES, F.; GRIEP, J.; RODRIGUES, M. R. F. Ressonância de plasmon de superfície localizado e aplicação em biossensores e células solares. **Quim. Nova**, 39, 1098 – 1111, 2016.

SASSOLAS, A.; BLUM, L. J.; LECA-BOUVIER, B. D. Immobilization strategies to develop enzymatic biosensors. **Biotechnol. Adv.**, 30, 489–511, 2012.

SCHNEIDER, C. A.; RASBANDA, W. S.; ELICEIRI, K. W. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. **Nat. Methods**, 9, 671–675, 2012.

SHAI DAROVA, L. G.; GEDMINA, A. V.; CHELNOKOVA, I. A.; BUDNIKOV, G. K. Determination of biogenic amines from electrocatalytic responses of graphite electrodes modified with metallic osmium or an osmium oxide-ruthenium cyanide film. **J. Anal. Chem.**, 63, 891–896, 2008.

SHI, Q.; LI, Q.; SHAN, D.; FAN, Q.; XUE, H. Biopolymer-clay nanoparticles composite system (Chitosan-laponite) for electrochemical sensing based on glucose oxidase. **Mat. Sci. C**, 28, 1327 – 1375, 2008.

SHIRATORI, S. S., RUBNER, M. F. pH-Dependent thickness behavior of sequentially adsorbed layers of weak polyelectrolytes. **Macromolecules**, 33, 4213, 2000.

SILVA, T. R.; BRONDANI, D.; ZAPP, E.; VIEIRA, I. C. Electrochemical sensor based on gold nanoparticles stabilized in poly(allylamine hydrochloride) for determination of vanillin. **Electroanalysis**, 27, 465–472, 2015.

SILVA, T., WESTPHAL, E., GALLARDO, H., VIEIRA, I.C. Ionic organic film sensor for determination of phenolic compounds. **Electroanalysis**, 26, 1801–1809, 2014.

SOARES, C. H. L.; **Estudos mecânicos da degradação de efluentes de indústrias de papel e celulose por fungos Basidiomicetos degradadores de madeira**. 1998. 133f. Tese (Doutorado em Química) - Universidade Estadual de Campinas, São Paulo.

SOLICH, P.; POLYDOROU, C. K.; KOUPPARIS, M. A.; EFSTATHIOU, C. E. Automated flow-injection spectrophotometric determination of catecholamines (epinephrine and isoproterenol) in pharmaceutical formulations based on ferrous complex formation. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, 22, 781–789, 2000.

SOLOMON, E. I.; AUGUSTINE, A. J.; YOON, J. O₂ Reduction to H₂O by the multicopper oxidases. **Dalton Trans.**, 30, 3921–3932, 2008.

SOUZA, M. F. B., Eletrodos quimicamente modificados aplicados à eletroanálise: uma breve abordagem. **Quím. Nova**, 20, 191–195, 1997.

STRYER, L. **Bioquímica**. 4. ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996. 1000 p.

SU, L.; JIA, W.; HOU, C.; LEI, Y. Microbial biosensors: A review. **Biosens. Bioelectron.**, 26, 1788–1799, 2011.

SUN, W.; YANG, M. X.; JIAO, K. Electrocatalytic oxidation of dopamine at an ionic liquid modified carbon paste electrode and its analytical application. **Anal. Bioanal. Chem.**, 389, 1283–1291, 2007.

SUN, X.; DONG, S.; WANG, E. One-step preparation of highly concentrated well-stable gold colloids by direct mix of polyelectrolyte and HAuCl₄ aqueous solutions at room temperature. **J. Colloid Interface Sci.**, 288, 301–303, 2005.

SUN, D.; ZHU, L.; ZHU, G. Glassy carbon ceramic composites electrodes. **Anal. Chim. Acta**, 564, 243-247, 2007.

SZEPONIK, J.; MÖLLER, B.; PFEIFFER, D.; LISDAT F.; WOLLENBERGER, U.; MAKOWER, A.; SCHELLER, F.W. Ultrasensitive bienzyme sensor for adrenaline. **Biosens. Bioelectron.**, 12, 947–952, 1997.

SZUNERITS, S. BOUKHERROUB, R. Investigation of the electrocatalytic activity of boron-dropped diamond electrodes modified with palladium or gold nanoparticles for oxygen reduction reaction in basic medium. **Comptes Rendus Chime**, 11, 1004-1016, 2008.

TAKEDA, H. H.; SILVA, T. A.; JANEFITZ, B. C.; VICENTINI, F. C.; MATTOSO, L. H. C.; FATIBELLO-FILHO, O. Electrochemical sensing of levodopa pr carbidopa using a glassy carbono electrode modified wiht carbono nanotubes within a poly(allylamine hydrochloride) film. **Ana. Methods**, 8, 1274–1280, 2016.

TEIXEIRA, M. F. S.; BERGAMINI, M. F.; MARQUES, C. M. P.; BOCCHI, N. Voltammetric determination of L-dopa using an electrode modified with trinuclear ruthenium ammine complex (Ru-red) supported on Y-type zeolite. **Talanta**, 63, 1083–1088, 2004.

THÉVENOT, D. R.; TOTH, K.; DURST, R. A.; WILSON, G. S. Electrochemical biosensors: recommended definitions and classifications. **Biosens. Bioelectron.**, 16, 121–31, 2001.

TOKONAMI, S.; YAMAMOTO, Y.; SHIIGI, H.; NAGAOKA, T. Synthesis and bioanalytical applications of specific-shaped metallic nanostructures: a review. **Anal. Chim. Acta**, 716, 76–91, 2012.

TURKEVITCH, J.; STEVENSON, P. C.; HILLIER, J. Nucleation and growth process in the synthesis of colloidal gold. **Discuss. Fraeaday Soc.**, 11, 55–75, 1951.

VIDAL, J. C.; MÉNDEZ, S.; CASTILLO, J. R. Electropolymerization of pyrrole and phenylenediamine over an organic conducting salt based amperometric sensor of increased selectivity for glucose determination. **Anal. Chim. Acta**, 385, 203–211, 1999.

VOET, D.; VOET, J. G. **Biochemistry**, 2.ed. New York: John Wiley & Sons Inc., 1995. 1360p.

VUORENSOLA, K.; SIRÉN, H.; KARJALAINEN, U. Determination of dopamine and methoxycatecholamines in patient urine by liquid chromatography with electrochemical detection and by capillary electrophoresis coupled with spectrophotometry and mass spectrometry. **J. Chromatogr., B**, 788, 277–289, 2003.

XU, F.; SHIN, W.; BROWN, S. H.; WAHLEITHNER, J. A.; SUNDARAM, U. M.; SOLOMON, E. I. A study of a series of recombinant fungal laccases and bilirubin oxidase that exhibit significant differences in redox potential, substrate specificity, and stability. **Biochim. Biophys. Acta**, 1292, 303–311, 1996.

WANG, K.; LIU, P.; YE, Y.; LI, J.; ZHAO, W.; HUANG, X. Fabrication of a novel laccase biosensor based on silica nanoparticles modified with phytic acid for sensitive detection of dopamine. **Sens. Actuators, B**, 197, 292–299, 2014.

WANG, Q.; DAS, M. R.; LI, M.; BOUKHERROUB, R.; SZUNERITS, S. Voltammetric detection of l-dopa and carbidopa on graphene modified glassy carbon interfaces. **Bioelectrochemistry**, 93, 15 – 22, 2013.

WEI, D.; IVASKA, A. Applications of ionic liquids in electrochemical sensors. **Anal. Chim. Acta**, 607, 126–135, 2008.

WEI, S., SONG, G. LIN, J. M. Separation and determination of norepinephrine, epinephrine and isoprenaline enantiomers by capillary electrophoresis in pharmaceutical formulation and human serum. **J. Chromatogr., A**, 1098, 166–171, 2005.

WILLIAMS, D. B.; CARTER C. B. **Transmission Electron Microscopy: A textbook for materials science**. 2. ed., New York: Plenum Press, 1996. 775p.

YANG, L. M.; LIU, S. F., ZHANG, Q. X. LI, F. Simultaneous electrochemical determination of dopamine and ascorbic acid using AuNPs@polyaniline core-shell nanocomposites modified electrode. **Talanta**, 89, 136–141, 2012.

YOO, D., SHIRATORI, S. S., RUBNER, M. F. Controlling bilayer composition and surface wettability of sequentially adsorbed multilayers of weak polyelectrolytes. **Macromolecules**, 31, 4309, 1998.

YUAN, S.; CHEN, W.; HU, S. T. Fabrication of TiO₂ nanoparticles/surfactant polymer complex film on glassy carbon electrode and its application to sensing trace dopamine. **Mater Sci. Eng. C**, 25, 479 – 485, 2005.

ZANATO, N.; TALAMINI, L.; SILVA, T. R.; VIEIRA, I. C. Microcystin-LR label-free immunosensor based on exfoliated graphite nanoplatelets and silver nanoparticles. **Talanta**, 175, 38 – 45, 2017.

ZAPP, E.; BRONDANI, D.; VIEIRA, I. C.; DUPONT, J.; SCHEEREN, C. W. Gold nanoparticles and hydrophobic ionic liquid applied on the development of a voltammetric biosensor for polyphenol determination. **Electroanalysis**, 23, 1124–1133, 2011.

ZARBIN, A. J. G. Química de (nano)materiais. **Quim. Nova**, 30, 1469–1479, 2007.

ZHANG, Y.; GUO, G.; CUI, D. Recent advances in nanotechnology applied to biosensors. **Sensors**, 9, 1033–1053, 2009.

ZHAO, P.; LI, N.; ASTRUC, D. State of the art in gold nanoparticle synthesis. **Coord. Chem. Ver.**, 257, 638–665, 2013.

ZHAO, X.; MAI, Z.; KANG, X.; ZOU, X. Direct electrochemistry and electrocatalysis of horseradish peroxidase based on clay–chitosan-gold nanoparticle nanocomposite. **Biosens. Bioelectron.**, 23, 1032–1038, 2008.

ZHAO, H. Y.; ZENG, W.; MENG, Z. X.; ZHOU, M. H.; XU, X. X.; LI, Z.; ZHENG, Y. F. Bioelectrochemistry of hemoglobina immobilized on a sodium Iginate-multiwall carbon nanotubes composite film. **Biosens. Bioelectron.** 24, 2352–2357, 2009.

ZHAO, S.; BAI, W.; WANG, B.; HE, M. Determination of levodopa by capillary electrophoresis with chemiluminescence detection. **Talanta**, 73, 142–146, 2007.

ZHOU, Y. Recent advances in ionic liquids for synthesis of inorganic nanomaterials. **Curr. Nanosci.**, 1, 35–42, 2005.

ZOU, H. L.; LI, B. L.; LUO, H. Q.; LI, N. B. A novel electrochemical biossensor based on hemin functionalized graphene oxide sheets for simultaneous determination of ascorbic acid, dopamine and uric acid. **Sens. Actuators, B**, 207, 535–541, 2015.

ZUCONELLI, C. R.; SKEIKA, T.; PESSOA, C. A. **Preparação e caracterização de eletrodos a base de carbono cerâmico vítreo.** 2009 In: XVIII Encontro Anual de Iniciação Científica, Londrina.