

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
DEPARTAMENTO DE FÍSICA, QUÍMICA E MATEMÁTICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA E
MONITORAMENTO AMBIENTAL

Jennifer de Pontes Medrades

**NANOPARTÍCULAS DE OURO FUNCIONALIZADAS COM FLAVINA
ADENINA DINUCLEOTÍDEO PARA DETECÇÃO ELETROQUÍMICA DE
DOPAMINA**

SOROCABA

2021

Jennifer de Pontes Medrades

**NANOPARTÍCULAS DE OURO FUNCIONALIZADAS COM FLAVINA
ADENINA DINUCLEOTÍDEO PARA DETECÇÃO ELETROQUÍMICA DE
DOPAMINA**

Dissertação apresentada ao programa
de pós-graduação em Biotecnologia e
Monitoramento Ambiental para
obtenção do título de Mestre em
Biotecnologia e Monitoramento
Ambiental

Orientação: Prof.^a Dr.^a Marystela
Ferreira

Financiamento: CAPES/DS

Sorocaba

2021

Jennifer de Pontes Medrades

NANOPARTÍCULAS DE OURO FUNCIONALIZADAS COM FLAVINA ADENINA
DINUCLEOTÍDEO PARA DETECÇÃO ELETROQUÍMICA DE DOPAMINA

Dissertação apresentada ao programa de pós-graduação em Biotecnologia e Monitoramento Ambiental para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia e Monitoramento Ambiental. Sorocaba, 21 de maio de 2021.

Orientadora:

Prof.^a Dr.^a Marystela Ferreira

Instituição: Universidade Federal de São Carlos

Examinador(a):

Dr.^a Vanessa Rezende Bevilaqua

Instituição: Universidade Federal de São Carlos (UFSCar - Sorocaba)

Examinador(a)

Dr. Flávio Makoto Shimizu

Instituição: Laboratório Nacional de Nanotecnologia (LNNano) / Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais (CNPEM)

Pontes Medrades, Jennifer de

Nanopartículas de ouro funcionalizadas com flavina adenina dinucleotídeo para detecção eletroquímica de dopamina / Jennifer de Pontes Medrades -- 2021.
115f.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de São Carlos, campus Sorocaba, Sorocaba

Orientador (a): Marystela Ferreira

Banca Examinadora: Vanessa Rezende Bevilaqua, Flávio Makoto Shimizu

Bibliografia

1. Dopamina, biossensor eletroquímico, flavina adenina dinucleotídeo, nanopartículas de ouro, voltametria de pulso diferencial. I. Pontes Medrades, Jennifer de. II. Título.

Ficha catalográfica desenvolvida pela Secretaria Geral de Informática (SIn)

DADOS FORNECIDOS PELO AUTOR

Bibliotecário responsável: Maria Aparecida de Lourdes Mariano -
CRB/8 6979

FOLHA DE APROVAÇÃO

Defesa de Dissertação de Mestrado da candidata Jennifer de Pontes Medrades, realizada em 21/05/2021.

COMISSÃO JULGADORA:

Profa. Dra. Marystela Ferreira (UFSCar)

Profa. Dra. Vanessa Rezende Bevilaqua (UFSCar)

Prof. Dr. Flavio Makoto Shimizu (CNPEM)

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil(CAPES) - Código de Financiamento 001.
O Relatório de Defesa assinado pelos membros da Comissão Julgadora encontra-se arquivado junto ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Monitoramento Ambiental.

DEDICATÓRIA

Dedico aos meus pais Vanderli e Sônia e ao meu marido Alexandre.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha família que me proporcionou o amor, o companheirismo e a paciência necessária em cada momento, vibrando ao meu lado em cada nova conquista.

Agradeço aos meus professores pelo aprendizado e exemplo fornecido, em especial à professora Dr^a Marystela Ferreira, por me orientar ao longo do mestrado.

Agradeço aos meus amigos, pelo o carinho e a descontração essenciais nos momentos difíceis, em especial à minha amiga Vanessa Rezende Bevilaqua pelos conselhos dados, pelo apoio fornecido, e por sempre acreditar no meu sucesso.

Agradeço aos meus colegas de grupo de pesquisa GPNNS, pela ajuda prestada, em especial à Jéssica Cristina de Almeida, Cristiane Carla Maciel, Lucas Felipe de Lima e André Lopes Ferreira e Leonardo José Quintero da Cuna por me auxiliarem em muitas de minhas dificuldades.

Agradeço ao professor Dr. Fábio de Lima Leite, a Dr^a Ariana de Souza Moraes, a Me. Akemy Martins Higa e ao grupo de pesquisa Nanoneurobiofísica pela parceria durante o projeto.

Agradeço às agências de fomento CAPES, CNPq e FAPESP pelo financiamento e ao PPGBMA pela oportunidade.

EPÍGRAFE

“Nós somos uma espécie avançada de macacos em um planeta pequeno de uma estrela bastante comum. Mas nós podemos entender o universo. Isso nos torna especiais.”

“O universo não seria tanto um universo se não fosse a casa das pessoas que você ama.”

Stephen Hawking

RESUMO

Palavras-chave: Dopamina, biossensor eletroquímico, flavina adenina dinucleotídeo, nanopartículas de ouro, voltametria de pulso diferencial.

A dopamina (DA) é um neurotransmissor com múltiplas funções no sistema nervoso central e, quando os níveis de DA no organismo estão alterados, surgem os sintomas de doenças como a doença de Parkinson e a esquizofrenia. Portanto, é de interesse médico que sejam monitorados os níveis de DA no organismo. Para tanto, foi fabricado um novo biossensor eletroquímico sobre um substrato de ouro, como uma monocamada automontada de ácido 11-mercaptopundecanoico (11-Mua), uma camada do polieletrólito catiônico poli(etilenoimina) (PEI) e uma camada de nanopartículas de ouro, estabilizadas com glutatona e funcionalizadas com flavina adenina dinucleotídeo (FAD). O FAD é um cofator presente no sítio ativo da enzima monoamina oxidase e foi adicionado à estrutura do biossensor para lhe conferir seletividade. O biossensor foi caracterizado pelas técnicas de espectroscopia de UV-Vis, FTIR, microscopia de força atômica (AFM), e voltametria cíclica (VC) que possibilitaram confirmar que a metodologia empregada na fabricação do biossensor foi bem sucedida. Através das medidas de detecção realizadas com a técnica de voltametria de pulso diferencial (DPV) realizadas em tampão PBS 0.1 mol L⁻¹ (pH 7.4), foram testados os potenciais interferentes: ácido úrico, ácido ascórbico, serotonina e ureia e, nenhum desses demonstrou interferência na detecção de DA. O biossensor se mostrou estável por 20 dias, e apresentou uma faixa linear de detecção que variou de 0.8 à 8.0 μmol L⁻¹, a sensibilidade apresentada foi de 1.25 μA/μmol L⁻¹ cm⁻², os limites de detecção e quantificação calculados foram respectivamente de 0.525 μmol L⁻¹ e 1.75 μmol L⁻¹. A amostra real utilizada foi urina humana e os valores de recuperação variam entre 85 e 90%. Conclui-se, portanto que o biossensor possui perspectivas de aplicação em amostras complexas.

ABSTRACTC

Keywords: Dopamine, electrochemical biosensor, adenine dinucleotide flavin, gold nanoparticles, differential pulse voltammetry.

Dopamine (DA) is a neurotransmitter with multiple roles in the central nervous system, and alterations in its level in the organism result in Parkinson's and schizophrenia diseases. Therefore, DA levels monitoring in the body is of medical interest. Hence, a novel electrochemical biosensor was designed on a gold substrate with a self-assembled 11-Mua monolayer, a cationic polyelectrolyte (PEI) layer, and a layer of gold nanoparticles stabilized with glutathione and functionalized with flavin adenine dinucleotide (FAD). FAD, a cofactor found in the active site of monoamine oxidase enzymes, was added to this biosensor to make it selective. The developed biosensor was characterized by UV-Visible spectroscopy, FTIR, atomic force microscopy (AFM), and cyclic voltammetry (CV), confirming a successful development process. Differential pulse voltammetry (DPV) data for detection assays using 0.1 mol L^{-1} (pH 7.4) PBS buffer demonstrated no interference of uric acid, ascorbic acid, serotonin, and urea. The biosensor was stable for 20 days, presenting a linear detection ranging from 0.8 to $8.0 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$, $1.25 \text{ } \mu\text{A}/\mu\text{mol L}^{-1} \text{ cm}^{-2}$ of sensitivity, and $0.525 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ and $1.75 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ for calculated limits of detection and quantification, respectively. Human urine was used as a real sample, and the values of recovery ranged from 85 to 90%. In summary, the developed biosensor demonstrated perspectives for being applied in complex sample analyses.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estrutura química do FAD e os três estados de oxidação do grupo isoaloxazina.	22
Figura 2: (A) Estrutura da MAO ancorada na membrana externa da mitocôndria. (B) Reação de desaminação da DA pela MAO-b.	23
Figura 3: Esquema de síntese de DA a partir do aminoácido tirosina.....	24
Figura 4: Esquema do transporte de dopamina no neurônio pré-sináptico para o neurônio pós-sináptico.....	25
Figura 5: Esquema simplificado das vias de sinalização dos receptores de classe D1 e D2.	25
Figura 6: Foto mostrando as cores das AuNPs com diferentes tamanhos.....	28
Figura 7: Representação esquemática da oscilação dos elétrons nas nanopartículas no campo eletromagnético da luz incidente.	29
Figura 8: Esquema reacional do sistema EDC e EDC/NHS para formação de uma ligação amida entre duas moléculas.....	33
Figura 9: Elementos que compõem um biossensor eletroquímico.....	34
Figura 10: Escala de K_d (em mol L ⁻¹) de diversas classes de interação receptor-ligante.	39
Figura 11: Esquema da inclinação das moléculas formadoras de SAM.	45
Figura 12: Esquema do procedimento da técnica LbL e da formação da camadas de polieletrólitos catiônicos e aniônicos.....	46
Figura 13: Sequência de adsorção e lavagem do filme nanoestruturado pelas técnicas de SAM e LbL.....	47
Figura 14: Esquema da síntese da AuNP-GS funcionalização com FAD e arquitetura do biossensor.	48
Figura 15: Esquema de uma célula eletroquímica com seus 3 eletrodos. (A) Eletrodo de referência, (B) Eletrodo de trabalho, (C) Contra-eletrodo, (D) Eletrólito suporte ou solução eletrolítica.....	51
Figura 16: (A) Gráfico representativo da aplicação do potencial com varredura linear em função do tempo. (B) Voltamograma típico obtido para um processo redox reversível.	53

Figura 17: Gráficos de: (A) potencial aplicado em função do tempo em uma voltametria de pulso diferencial e, (B) parâmetros obtidos a partir de um voltamograma de pulso diferencial.....	54
Figura 18: Fotos da síntese das AuNPs. (A) HAuCl ₄ em água. (B) HAuCl ₄ com GSH em pH 2,5. (C) HAuCl ₄ com GSH em pH 8,0. (D), (E) e (F) formação das AuNPs-GS após adição de borohidreto.	55
Figura 19: Esquema da formação das AuNP-GS pela associação de Au ³⁺ com GSH e redução por NaBH ₄	56
Figura 20: Espectro de absorvância UV-Vis da dispersão de AuNP-GS (30 mg L ⁻¹) em água ultrapura sintetizadas em pH 8,0.....	57
Figura 21: Espectros de absorção UV-Vis do FAD: 1 mmol L ⁻¹ (linha amarela). Inset: UV-Vis das AuNP-GS-FAD.	58
Figura 22: Exemplificação dos estados de energia de acordo com o estado de oxidação do anel isoaloxazina do FAD. (a) estado de energia dos elétrons nos orbitais π do anel isoaloxazina do FAD, (b) estrutura do anel de isoaloxazina do FAD de acordo com os estados de oxidação.	58
Figura 23: Espectro de absorção de UV-Vis do filme quartzo/PEI/AuNP-GS-FAD.....	59
Figura 24: Espectros de emissão de fluorescência pelas suspensões de FAD (linha preta), AuNP-GS-FAD (linha rosa) e AuNP-GS (linha azul). Todas as suspensões foram feitas em água ultrapura, pH ~ 6,0.	61
Figura 25: Ilustração da transferência redutiva de elétrons foto-induzida em FAD aquoso. Em vermelho, os elétrons que inicialmente pertenciam para isoaloxazina (Iso); em azul, elétrons que pertenciam inicialmente à adenina (Ad).	63
Figura 26: Espectro FTIR da monocamada de 11-Mua sobre o substrato de ouro.	65
Figura 27: Espectro FTIR do polieletrólito PEI, solução de 1mg mL ⁻¹ sobre o substrato de ouro.	66
Figura 28: Espectro FTIR da GSH e das AuNP-GS sobre o substrato de ouro.	67
Figura 29: Espectro FTIR do FAD e das AuNP-GS-FAD sobre o substrato de ouro....	67
Figura 30: Espectro FTIR do filme: Au/11-Mua/PEI/AuNP-GS-FAD.....	70
Figura 31: Imagens em 3D da caracterização por Microscopia de força atômica da construção do filme LbL. (A) Ouro puro, (B) Au/11-Mua, (C) Au/11-Mua/PEI, (D) Au/11-Mua/ PEI/AuNP-GS-FAD.	71
Figura 32: Ilustração da delimitação da Linha média e cálculo da rugosidade média Ra de uma superfície.....	73

Figura 33: Voltamogramas cíclicos com velocidades de varredura de 10, 25, 50, 75 e 100mV s ⁻¹ com a sonda redox [Fe(CN) ₆] ^{3-/4-} a 5,0 mmol L ⁻¹ em KCl 0,1 mol L ⁻¹ e gráfico de corrente de pico anódica (i _{pa}) e catódica (i _{pc}) versus a raiz quadrada das velocidades de varredura para o eletrodo de ouro puro (A) e (B), Au/11-Mua (C) e (D), Au/11-Mua/PEI (E) e (F) e Au/11-Mua/PEI/AuNP-GS-FAD (G) e (H).	76
Figura 34: Ilustração da influência da rugosidade do substrato de ouro na formação da SAM de 11-Mua.	81
Figura 35: Voltamograma cíclico do ouro (A), Au/11-Mua (B), Au/11-Mua/PEI (C) e Au/11-Mua/PEI/AuNP-GS-FAD (D) versus SCE, com a sonda redox [Fe(CN) ₆] ^{3-/4-} a 5,0 mmol L ⁻¹ em KCl 0,1 mol L ⁻¹ velocidade de varredura 50 mV s ⁻¹	81
Figura 36: Efeito do <i>step</i> para a altura do pico densidade de corrente na detecção de DA. Condições experimentais: concentração de DA 8,0 x 10 ⁻⁶ mol L ⁻¹ em tampão PBS (pH 7,4), modulação de amplitude de 70 mV, modulação de tempo de 0,05 s, intervalo de tempo de 0,5 s.....	85
Figura 37: Efeito da modulação de amplitude para a altura do pico anódico da detecção de DA. Condições experimentais: concentração de DA 8,0 x 10 ⁻⁶ mol L ⁻¹ em tampão PBS (pH 7,4), modulação de <i>step</i> 5,0 mV, modulação de tempo de 0,05 s, intervalo de tempo de 0,5 s.....	86
Figura 38: Efeito da modulação de tempo para a altura do pico anódico da detecção de DA. Condições experimentais: concentração de DA 8,0 x 10 ⁻⁶ mol L ⁻¹ em tampão PBS (pH 7,4), modulação de <i>step</i> 5 mV, modulação de amplitude de 80 mV, intervalo de tempo de 0,5 s.....	87
Figura 39: Efeito do intervalo de tempo para a altura do pico anódico da detecção de DA. Condições experimentais: concentração de DA 8,0 x 10 ⁻⁶ mol L ⁻¹ em tampão PBS (pH 7,4), modulação de <i>step</i> 5 mV, modulação de amplitude de 80 mV, modulação de tempo de 0,04 s.....	87
Figura 40: (A) Detecção de DA por DPV em tampão fosfato pH 7.4, nas concentrações de 0,8 a 8,0 μmol L ⁻¹ . Parâmetros: <i>step</i> : 5mV, <i>modulation amplitude</i> : 90mV, <i>modulation time</i> : 50 ms. (B) Curva de calibração para as diversas concentrações de DA com valor de R ² e o erro da medida.....	90
Figura 41: (A) Detecção de DA por DPV em tampão fosfato pH 7.4, nas concentrações de 0,8 a 8,0 μmol L ⁻¹ . Parâmetros: <i>step</i> : 5mV, <i>modulation amplitude</i> : 90mV, <i>modulation time</i> : 50 ms. (B) Curva de calibração para as diversas concentrações de DA com valor de R ² e o erro da medida.....	94

Figura 42: Gráfico do estudo de estabilidade do biossensor para 5, 10, 15 e 20 dias de armazenamento em tampão PBS, pH 7,4.	95
Figura 43: Gráfico da comparação da corrente de pico gerada pela interação do biossensor com a DA e os possíveis interferentes AA, AU, serotonina e ureia.....	96
Figura 44: Gráfico da comparação da densidade de corrente gerada pela interação do substrato de ouro com a DA ($0,8 \mu\text{mol L}^{-1}$) e os possíveis interferentes AA e AU ($1,6 \mu\text{mol L}^{-1}$).....	97
Figura 45: Gráfico da comparação da densidade de corrente gerada pela interação do dispositivo Au/11-Mua/PEI/AuNP-GS-FAD com a DA ($0,8 \mu\text{mol L}^{-1}$) e os possíveis interferentes AA e AU ($1,6 \mu\text{mol L}^{-1}$).....	98
Figura 46: Comparação da densidade de corrente gerada pela interação de DA com os dispositivos: ouro puro, Au/11-Mua/PEI/AuNP-GS e Au/11-Mua/PEI/AuNP-GS-FAD.	99

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Atribuição das bandas do espectro FTIR do FAD.....	68
Tabela 2: Valores de Ra, RMS e aumento da RMS em relação à Ra (%) para as etapas de construção do filme.	74
Tabela 3: Valores de Epa, Epc, ΔEp, ipa, ipc e ipa/ipc obtidos através do voltamograma cíclico para o substrato de ouro com a sonda redox $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ a 5,0 mmol L ⁻¹ em KCl 0,1 mol L ⁻¹ em velocidades de varredura de 10, 25, 50, 75 e 100 mV s ⁻¹	78
Tabela 4: Valores de Epa, Epc, ΔEp, ipa, ipc e ipa/ipc obtidos através do voltamograma cíclico para o eletrodo de ouro modificado com uma monocamada de 11-Mua (Au/11-Mua) com a sonda redox $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ a 5,0 mmol L ⁻¹ em KCl 0,1 mol L ⁻¹ em velocidades de varredura de 10, 25, 50, 75 e 100 mV s ⁻¹	78
Tabela 5: Valores de Epa, Epc, ΔEp, ipa, ipc e ipa/ipc obtidos através do voltamograma cíclico para o eletrodo de ouro modificado com uma monocamada de 11-Mua e uma camada de PEI (Au/11-Mua/PEI) com a sonda redox $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ a 5,0 mmol L ⁻¹ em KCl 0,1 mol L ⁻¹ em velocidades de varredura de 10, 25, 50, 75 e 100 mV s ⁻¹	78
Tabela 6: Valores de Epa, Epc, ΔEp, ipa, ipc e ipa/ipc obtidos através do voltamograma cíclico para o eletrodo de ouro modificado com uma monocamada de 11-Mua, uma camada de PEI e uma camada de AuNP-GS-FAD (Au/11-Mua/PEI/AuNP-GS-FAD) com a sonda redox $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ a 5,0 mmol L ⁻¹ em KCl 0,1 mol L ⁻¹ em velocidades de varredura de 10, 25, 50, 75 e 100 mV s ⁻¹	79
Tabela 7: Valores de Epa, Epc, ΔEp, ipa, ipc e relação ipa/ipc para cada uma das camadas da construção do biossensor.	82
Tabela 8: Valores de área geométrica, área eletroativa, % de aumento da área em relação à área geométrica e fator de rugosidade para as diversas camadas do biossensor.	83
Tabela 9: Comparação dos valores de Ra, RMS e o fator de rugosidade para cada uma das camadas de modificação do substrato.	84
Tabela 10: Parâmetros experimentais estudados para a técnica de DPV e os respectivos valores fixados para a detecção de DA em tampão PBS 0,1 mol L ⁻¹ , pH 7,4.	88
Tabela 11: Comparação da técnica eletroquímica, faixa linear de trabalho e valores de LOD de biossensores eletroquímicos para detecção de DA encontrados na literatura. .	91
Tabela 12: Valores de RSD para cada uma das concentrações de DA das medidas realizadas em 3 dias diferentes.	94
Tabela 13: Resultados de recuperação do método para detecção de DA nas concentrações em 2,4, 4,0 e 8,0 μmol L ⁻¹ em urina humana.....	100

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

11-Mua	Ácido 11-mercaptopundecanóico
AA	Ácido Ascórbico
Ad	Anel adenina
AFM	Microscopia de Força Atômica
AMPc	Monofosfato de adenosina cíclico
AQ	Antraquinona
AU	Ácido Úrico
AuNP	Nanopartículas de ouro
AuNP-GS	Nanopartículas de ouro estabilizadas com glutationa
AuNP-GS-FAD	Nanopartículas de ouro estabilizadas com glutationa e funcionalizadas com FAD
CNT	Nanotubo de carbono (sigla em inglês)
CPE	Eletrodo de pasta de carbono
DA	Dopamina
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DOPA	L-aminoácido descarboxilase aromático
DPPG	Dipalmitoil fosfatidil glicerol
DPV	Voltametria de pulso diferencial (sigla em inglês)
DSP	Ácido 3, 3'-ditiodipropiônico di (éster de N-hidroxissuccinimida)
DSP*	Ditiobis (succinimidil propionato)
EDC	Cloridrato de N- (3-dimetilaminopropil) -N'-etilcarbodiimida
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EIS	Espectroscopia de impedância eletroquímica (sigla em inglês)
Epa	Potencial de pico anódico
Epc	Potencial de pico catódico
FAD	Flavina Adenina Dinucleotídeo oxidado
FADH•	Flavina Adenina Dinucleotídeo semi reduzido
FADH ₂	Flavina Adenina Dinucleotídeo reduzido
FINEP	Fundo de Financiamento de Estudos de Projetos e Programas
FMN	Mononucleotídeo de flavina
FTIR	Infravermelho com transformada de Fourier (sigla em inglês)
GCE	Eletrodo de carbono vítreo
GCSC	Óxido de colágeno de pele de carpa
GO	Óxido de grafeno
GONPs	Nanopartículas de óxido de grafeno
GPC	Eletrodo de pasta de carbono (siglas em inglês)
GS	Glutationa ancorada na AuNP
GSH	Glutationa

HOMO	Orbital molecular ocupado mais alto (sigla em inglês)
HPLC	Cromatografia de alta eficiência (sigla em inglês)
Ipa	Corrente de pico anódica
Ipc	Corrente de pico catódica
iPSC	Células-tronco pluripotentes induzidas (sigla em inglês)
Iso	Anel isoaloxazina
it	Intervalo de tempo
ITO	Óxido de estanho dopado com índio (sigla em inglês)
J	Densidade de corrente
K^0	Constante de transferência heterogênea de elétrons
Kd	Constante de dissociação
LbL	Camada por camada (sigla em inglês)
L-DOPA	Levodopa
LOD	Limite de detecção
LOQ	Limite de quantificação
LSPR	Banda de absorção de plasmon de superfície
LUMO	Orbital molecular não ocupado mais baixo (sigla em inglês)
ma	Modulação de amplitude
MAO A	Monoamina Oxidase A
MAO B	Monoamina Oxidase B
MBA	Ácido 4-mercaptofenilborônico
MCH	6-mercapto-1-hexanol
MMT	Argila montmorilonita
mt	Modulação de tempo
MWCNT	Nanotubos de parede múltipla (sigla em inglês)
MXene	Material bidimensional sintetizado com um metal de transição, um elemento do grupo AIII ou AIV da tabela periódica e carbono ou nitrogênio.
NB	Azul do Nilo (sigla em inglês)
NEG	Grafeno dopado com N (sigla em inglês)
NHS	N-hidroxissuccinimida
NiTsPc	Ftalocianina de níquel
OECT	Transistor eletroquímico orgânico
OMS	Organização Mundial da Saúde
PAH	Poli(alilamina)
PANI	Polianilina
PBB	Tampão de ligação fosfato (sigla em inglês)
PBS	Tampão fosfato salino (sigla em inglês)
PEDOT	Poli(3,4-etilenodioxitiofeno)
PEI	Poli(Etilenoimina)
POPG	Palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfo(1-rac-glicerol)

PVS	Poli(ácido vinilsufônico)
Ra	Rugosidade média
rGO	Óxido de grafeno reduzido
RMS	Rugosidade média quadrática
RNA	Ácido ribonucleico (sigla em inglês)
RSD	Desvio padrão relativo (sigla em inglês)
SAM	Monocamada automontada (sigla em inglês)
SCE	Eletrodo de mercúrio saturado (sigla em inglês)
SPCE	Eletrodo de carbono serigrafado (sigla em inglês)
Step	Incremento de varredura
SWV	Voltametria de onda quadrada (sigla em inglês)
TE	Tampão Tri-HCl e EDTA
Tyr	Enzima Tirosinase
UV-Vis	Ultravioleta-Visível
VC	Voltametria Cíclica
ΔE_p	Diferença entre o potencial de anódico e catódico

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	19
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	22
2.1. FLAVINA ADENINA DINUCLEOTÍDEO (FAD).....	22
2.2. DOPAMINA (DA)	24
2.3. NANOPARTÍCULAS DE OURO.....	28
2.4. SENSORES E BIOSSENSORES.....	33
3. OBJETIVOS	40
3.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	41
4. MATERIAIS E MÉTODOS	41
4.1. MATERIAIS.....	41
4.2. PREPARO DAS SOLUÇÕES.....	43
4.3. SÍNTESE DAS AUNP-GS E FUNCIONALIZAÇÃO COM FAD	43
4.4. LIMPEZA DOS SUBSTRATOS.....	44
4.5. CONSTRUÇÃO DO FILME.....	44
4.5.1. Monocamadas automontadas	44
4.5.2. Técnica de fabricação de filmes camada-por-camada	46
4.5.3. Construção do filme Au/11-Mua/PEI/AuNP-GS-FAD	47
4.6. MÉTODOS DE CARACTERIZAÇÃO	48
4.6.1. Caracterização por Espectroscopia de UV-Vis	48
4.6.2. Caracterização por Espectroscopia de Fluorescência	48
4.6.3. Caracterização por Microscopia de Força Atômica	49
4.6.4. Caracterização por espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)	49
4.6.5. Caracterização e detecção eletroquímica	49
4.6.6. Técnicas eletroquímicas	50

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES	55
5.1. CARACTERIZAÇÃO POR ESPECTROSCOPIA DE UV-VIS	55
5.2. CARACTERIZAÇÃO POR ESPECTROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA .	60
5.3. CARACTERIZAÇÃO POR ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO POR TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR)	64
5.4. CARACTERIZAÇÃO POR MICROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA (AFM) 71	
5.5. CARACTERIZAÇÃO POR VOLTAMETRIA CÍCLICA	75
5.6. OTIMIZAÇÃO DOS PARÂMETROS DE DPV	85
5.7. DETECÇÃO POR VOLTAMETRIA DE PULSO DIFERENCIAL (DPV)...	88
5.8. REPETIBILIDADE <i>INTER-DAY</i>	93
5.9. TESTE DE ESTABILIDADE	95
5.10. TESTE DE INTERFERENTES	95
5.11. AMOSTRA REAL	99
6. CONCLUSÃO	101
REFERENCIAS	102

1. INTRODUÇÃO

O dinucleotídeo de flavina e adenina (FAD, do inglês *flavin adenine dinucleotide*) é uma coenzima, composta por um grupo isoaloxazina e um grupo adenina. Esta é a forma mais ativa da vitamina B₂ (riboflavina) e está presente em importantes processos metabólicos do catabolismo e do anabolismo, principalmente como um transportador de elétrons (GALBÁN et al., 2016; NELSON; COX, et al, 2014).

O FAD também está presente no sítio ativo de enzimas como a monoamina oxidase “a” e “b” (MAO-a e MAO-b). Essas enzimas são diméricas, ou seja, compostas por duas cadeias polipeptídicas formadas por 520 resíduos de aminoácidos, e são responsáveis pelo metabolismo da dopamina (DA) e de outras monoaminas, atuando na retirada do grupo amina. O FAD está localizado entre dois resíduos de tirosina da cadeia peptídica da MAO e auxilia no processo de oxidação (BINDA et al., 2002).

A DA, um dos substratos da MAO, é um neurotransmissor com função predominantemente inibitória no sistema nervoso central, mais precisamente nos gânglios basais e está associado às capacidades motoras e a sensação de prazer. O desequilíbrio nos níveis normais de DA no organismo é responsável pelo aparecimento dos sintomas de duas importantes doenças, o Parkinson e a Esquizofrenia que afetam milhões de pessoas ao redor do mundo (GUYTON; HALL, 2016; SILVERTHORN, 2017; KIM et al., 2012).

A doença de Parkinson é a segunda doença neurodegenerativa mais comum no mundo, ficando atrás apenas do Alzheimer. Ela atinge cerca de 1% da população mundial, aparecendo principalmente em pacientes acima dos 60 anos, apesar de também ser possível a ocorrência da doença de Parkinson precoce (entre 21 e 40 anos) e a doença de Parkinson juvenil (antes dos 21 anos) (OPAS, 2018).

Ainda não é de costume na prática médica o monitoramento da DA no organismo, no entanto, seu papel no desenvolvimento de doenças demonstra o potencial diagnóstico e de acompanhamento do tratamento dos pacientes para os biossensores.

O FAD e a MAO já foram utilizados na construção de biossensores para DA, Miyazaki et al. (2016), por exemplo, estudou um biossensor produzido pela técnica de camada por camada (LbL – *layer by layer* em inglês) empregando o poli(etilenoimina) (PEI) como polication e MAO-b encapsulada em lipossomas de dipalmitoil fosfatidil glicerol (DPPG) e palmitoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfo(1-rac-glicerol) (POPG). Esse

sensor apresentou uma sensibilidade de $0,86 \mu\text{A cm}^{-2}/\text{mmol L}^{-1}$ e um limite de detecção de $0,33 \text{ mmol L}^{-1}$.

Lin, Huang, e Chein (2014) relataram a construção de um biossensor para detecção simultânea de DA, ácido ascórbico (AA), ácido úrico (AU) e peróxido de hidrogênio. Para tanto, foi sintetizado um composto de nanotubos de carbono de parede múltipla (MWCNTs, do inglês, *multi-walled carbon nanotubes*), poli (3,4-etilenodioxitiofeno) (PEDOT) e FAD. Para este sensor a sensibilidade foi de $52 \text{ mA cm}^{-2}/\text{mmol L}^{-1}$ e o limite de detecção foi de $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$.

Outras biomoléculas também já foram empregadas na detecção eletroquímica de DA. Um exemplo é a construção de um biossensor baseado em poli (3,4-etilenodioxitiofeno) (PEDOT) e a enzima tirosinase (Tyr) através do uso de tensões senoidais sobre um microeletrodo de ouro. O limite de detecção obtido foi de $0,24 \mu\text{mol L}^{-1}$ e sensibilidade de $2,4 \text{ nA cm}^{-2}/\mu\text{mol L}^{-1}$ (LETE et al., 2017).

Também foram utilizados na construção de um biossensor, o ácido 4-mercaptofenilborônico (MBA) e o ditiobis (succinimidil propionato) (DSP*), que revestiram nanoesferas de dióxido e platina sobre um eletrodo de carbono vítreo (GCE, do inglês, *glassy carbon electrode*) e ouro. Neste dispositivo, o reconhecimento molecular duplo da DA, pelo MBA e DSP, possibilitou a detecção de concentrações de DA na faixa de 2 a 180 nmol L^{-1} e um limite de detecção de $0,71 \text{ nmol L}^{-1}$ (FU et al., 2019).

Similarmente, plataformas de biossensores podem ser montadas sobre eletrodo de carbono vítreo (CGE, do inglês *glass carbon electrode*), como a estudada por Coelho et al. (2019), utilizando um exopolissacarídeo chamado botriosphaeran e a enzima lacase que, por sua vez, tem a função de para monitorar concentrações de DA em injeções farmacêuticas e amostras biológicas sintéticas, apresentando um limite de detecção de $0,127 \mu\text{mol L}^{-1}$. WEI et al. (2019) também utilizou o CGE funcionalizado com aptâmero, óxido de colágeno de pele de carpa (GCSC, do inglês, *grass carp skin collagen*) e grafeno sobre um GCE. O limite de detecção desse dispositivo foi de $0,75 \text{ nmol L}^{-1}$.

Além disso, nosso grupo de pesquisa já desenvolveu dois sensores eletroquímicos para detecção de DA. O primeiro deles é baseado em misturas de polianilina (PANI) e complexo de Rupy ($[\text{RuCl}_3(\text{dppb})(\text{py})]$ (dppb = $\text{PPh}_2(\text{CH}_2)_4\text{PPh}_2$; py = piridina)) que foi construído pela técnica de Langmuir-Blodgett. Este sensor apresentou limite de detecção de $0,4 \text{ mmol L}^{-1}$ e boa seletividade. O ácido ascórbico, que é um importante

interferente na detecção de DA só foi detectável quando apresentou concentração 3 vezes maior que a de DA (FERREIRA, et al., 2004).

O segundo sensor, por sua vez, foi montado com a técnica de LbL com argila montmorilonita sódica (Na^+ MMT) e ftalocianina de níquel (NiTsPc), sobre um substrato de óxido de estanho dopado com índio (ITO). O limite de detecção do dispositivo foi de $0,1 \mu\text{mol L}^{-1}$ na presença dos interferentes ácido úrico e ácido ascórbico (LUCENA, et al., 2018).

A literatura apresenta vasta variedade de estudos de biossensores para detecção de DA, no entanto, não há indícios da utilização de nanopartículas de ouro (AuNPs) funcionalizadas com FAD para detecção de DA, sendo uma arquitetura inédita, desenvolvida neste trabalho. A funcionalização de AuNPs é um processo simples e bastante empregado para ancoragem de outras moléculas biológicas como anticorpos e aptâmeros (CAMILO et al., 2019; SAVORY et al., 2014). O emprego das AuNPs em biossensores resulta em um aumento na sensibilidade, por aumentar a área eletroativa (BARD; FAULKNER, 2001) e a constante de transferência heterogênea de elétrons (k^0) do dispositivo (NICHOLSON, 1965).

Os sensores enzimáticos, em geral, possuem algumas desvantagens inerentes às necessidades da enzima para que mantenha sua atividade ao ser imobilizada. Para tanto, as enzimas precisam de um material que mimetize o ambiente encontrado *in vivo*, por exemplo, enzimas de membrana, como é o caso da MAO, que podem ser imobilizadas em modelos de membrana celular construídos com fosfolipídios (MIYAZAKI et al., 2016). Isso pode encarecer o biossensor e dificultar sua comercialização.

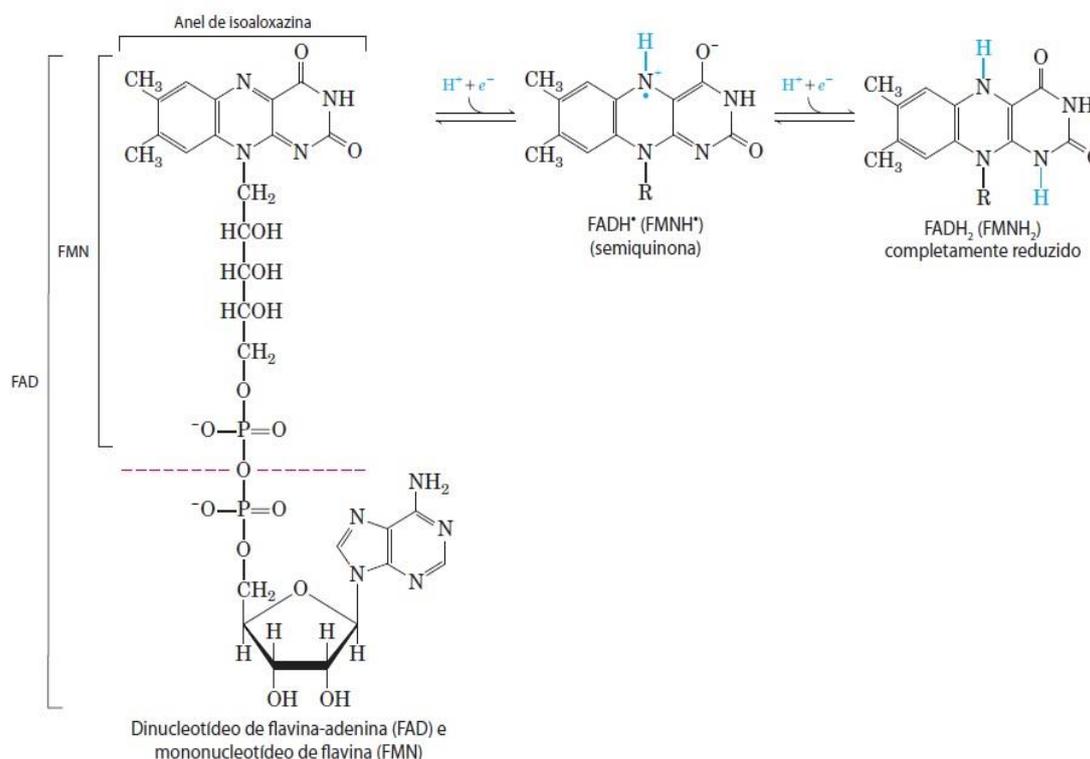
Os cofatores, além de serem mais baratos que as enzimas, não exigem a fabricação de um modelo de membrana para serem imobilizados e, em geral, podem manter sua função apenas pelo controle de pH. Levando em conta essas vantagens e a lacuna em relação à literatura, foi escolhida a funcionalização de AuNPs com o FAD como arquitetura principal do biossensor desse trabalho. Para tanto, serão utilizadas as técnicas de monocamada automontada (SAM, do inglês *self-assembled monolayer*) e LbL para construção do filme, e a técnica eletroquímica de voltametria de pulso diferencial (DPV, do inglês *differential pulse voltammetry*) para a detecção de DA.

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1. FLAVINA ADENINA DINUCLEOTÍDEO (FAD)

O FAD é uma coenzima derivada da vitamina B₂ (riboflavina), composta por um grupo isoaloxazina e uma adenina que possui três estados de oxidação, sendo estes, a forma totalmente oxidado (FAD), semirreduzido ou semiquinona (FADH•) e totalmente reduzida (FADH₂) (NELSON; COX, 2014). A Figura 1 ilustra a estrutura química do FAD e os três estados de oxidação.

Figura 1: Estrutura química do FAD e os três estados de oxidação do grupo isoaloxazina.



Fonte: (NELSON; COX, 2014, p. 536).

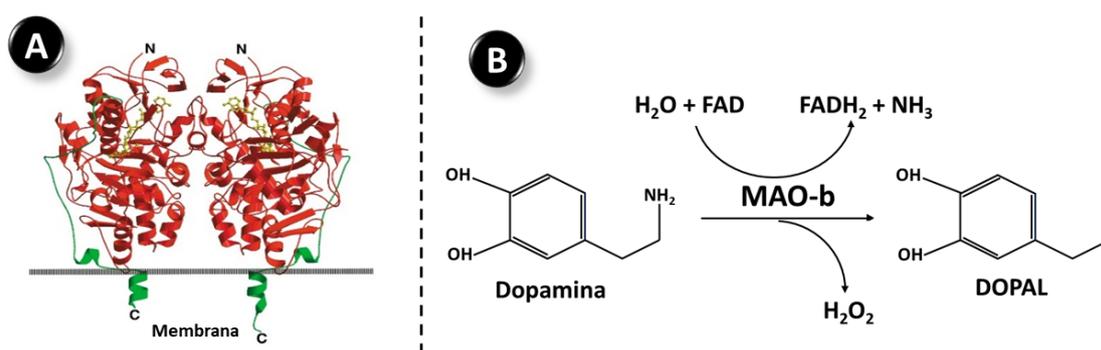
Para cada estado de oxidação, o FAD possui também três formas ácido-básicas que são dependentes do pH. Em pH 0 o anel isoaloxazina está positivamente carregado, em pH acima de 10,2 está negativamente carregado e, em pH entre 0 e 10,2 o anel está em sua forma neutra. Todas essas propriedades das flavinas são fornecidas pelo grupo isoaloxazina e independem do esqueleto que pode ser uma adenina, no caso do FAD, a um grupo fosfato como no caso do mononucleotídeo de flavina (FMN) ou a isoaloxazina

sozinha como ocorre com a riboflavina (BRAZARD et al., 2011; SENGUPTA; KHADE; HAZRA, 2011).

O FAD está presente como grupo prostético fortemente ligado ao sítio ativo de diversas enzimas com atividade de oxidorreduções, chamado de flavoproteínas ou flavoenzimas. As flavoproteínas podem ser divididas em dois grupos, os das monooxigenases, incluindo exemplos como a MAO-a e MAO-b. Outro grupo atribuído às oxidases puras, incluem a glicose oxidase, álcool oxidase e a colesterol oxidase, sendo todas de grande importância biotecnológica por necessitarem apenas de oxigênio para oxidação do substrato (GALBÁN, SANZ-VICENTE, 2016).

As MAO-a e MAO-b estão presentes naturalmente na membrana externa das mitocôndrias celulares de humanos, ancoradas pela extremidade C-terminal (Figura 2a). Elas são enzimas diméricas, ou seja, possuem duas cadeias polipeptídicas, com 520 resíduos de aminoácidos e são responsáveis por catalisar a reação de desaminação das catecolaminas como, por exemplo, a dopamina e a serotonina, processo descrito na Figura 2d (BINDA et al., 2002). A ação dessas enzimas está relacionada ao desenvolvimento de doenças como depressão, Parkinson e Alzheimer e, portanto, um dos tratamentos mais comuns para estas doenças é o uso de drogas que inibem a ação da MAO (SILVERTHORN, 2017).

Figura 2: (a) Estrutura da MAO ancorada na membrana externa da mitocôndria. (b) Reação de desaminação da DA pela MAO-b.



Fonte: (A) adaptado de (BINDA et al., 2002), (B) informações retiradas de (YOUJIM; BAKHLE, 2006).

Os processos enzimáticos catalisados por flavoproteínas consistem em duas etapas. A primeira consiste na redução do FAD após oxidação do substrato, ou seja, o FAD age como um receptor de elétrons que são retirados do substrato (por exemplo,

elétrons são removidos da DA), esse processo é a “meia reação redutora”. A segunda etapa chamada de “meia reação reoxidativa” consiste na reoxidação do FAD, causada pelo oxigênio presente no meio reacional, assim gerando peróxido de hidrogênio (H_2O_2) que pode ser facilmente monitorado por unidades sensoriais (DIJKMAN et al., 2013).

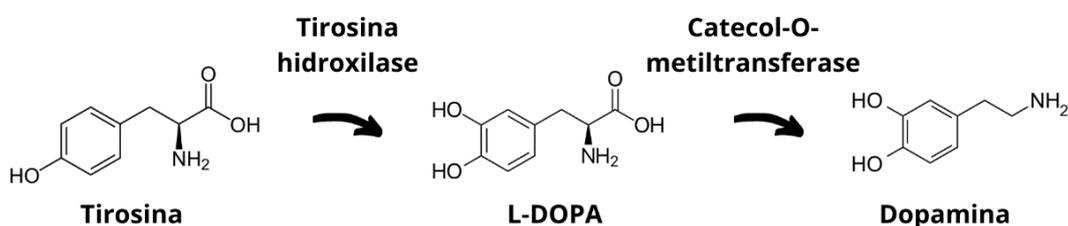
O FAD livre possui um potencial de oxidação (E'^0) de -0,219 V, já o FAD em forte associação com o sítio ativo de uma enzima possui E'^0 característico da enzima à qual está associado, podendo ser mais positivo ou mais negativo, variando de -0,40 V a +0,06 V, dependendo da enzima (NELSON; COX, 2014).

2.2. DOPAMINA (DA)

A DA é um neurotransmissor da classe das catecolaminas e possui função tanto excitatória como inibitória no sistema nervoso central. A DA é responsável pelo controle motor e age nos centros de recompensa no córtex e sistema límbico, além de estar associada com as vias encefálicas do humor, da emoção, da sensação de prazer, no desempenho cognitivo e na aprendizagem (MEDER et al., 2019; GUYTON; HALL, 2016; SILVERTHORN, 2017; TEODORO, 2010).

A síntese da DA ocorre no citosol do neurônio pré-sináptico e inicia com a hidroxilação do aminoácido tirosina, que é convertido em L-DOPA, a descarboxilação do L-DOPA produz a DA (GUYTON; HALL, 2016; RILSTONE et al., 2013). A Figura 3 corresponde a síntese de DA a partir do aminoácido tirosina.

Figura 3: Esquema de síntese de DA a partir do aminoácido tirosina.

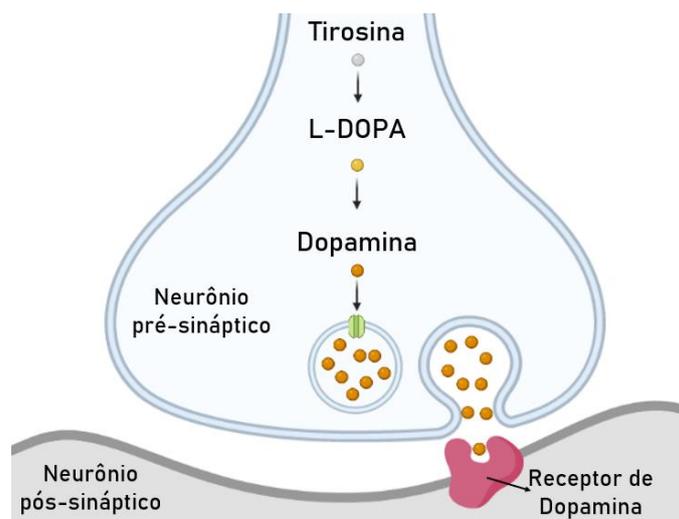


Fonte: elaborado pela autora com base em (RILSTONE et al., 2013).

Após a produção de DA, esta é transportada por vesículas até a fenda pré-sináptica para interagir com seu receptor na membrana do neurônio pós-sináptico. A Figura 4 ilustra o processo de transporte da DA até o receptor pós-sináptico. O efeito da DA no

neurônio pós-sináptico pode ser inibitório ou excitatório, dependendo com qual receptor ela irá interagir. Existem duas classes de receptores para DA, a classe D1 e a classe D2. Ambas as classes de receptores estão acoplados à proteína G, uma proteína envolvida na transdução de sinal intracelular, assim chamada porque pode se ligar ao trifosfato de guanosina (GTP) e ao difosfato de guanosina (GDP) (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2012).

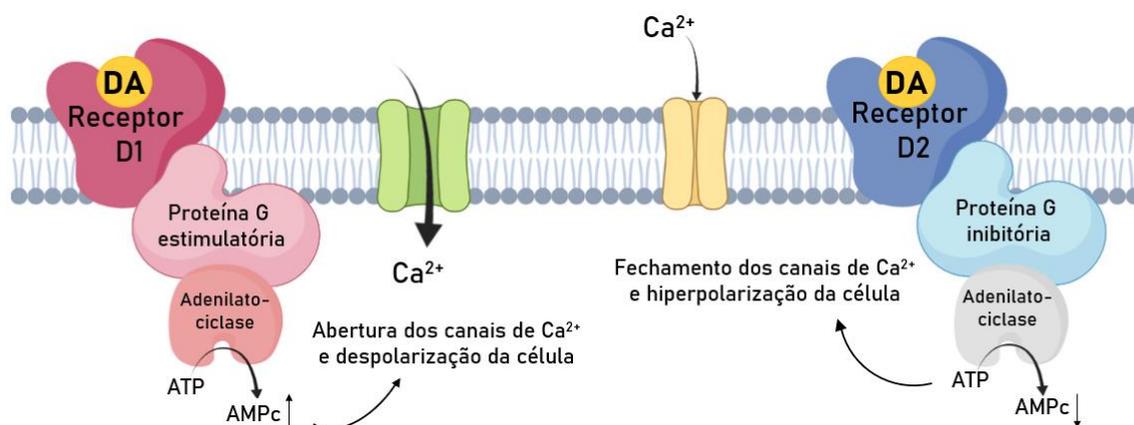
Figura 4: Esquema do transporte de dopamina no neurônio pré-sináptico para o neurônio pós-sináptico.



Fonte: adaptado de (RILSTONE et al., 2013). Criado em biorender.com.

A ativação da proteína G gera uma cascata de reações no interior da célula. O segundo mensageiro dessa cascata, em geral, é o monofosfato de adenosina cíclico (AMPC). A classe dos receptores D1 são responsáveis pelo aumento dos níveis de AMPC no neurônio e pela regulação da abertura dos canais de Ca^{2+} , K^+ e Na^+ . Esse efeito despolariza a célula, retirando o neurônio de seu potencial de repouso (-70 mV) e estimulando a propagação do impulso elétrico. Por outro lado, os receptores da classe D2 são inibidores da propagação do impulso elétrico, por diminuírem a concentração de AMPC no interior do neurônio e hiperpolarizar a célula (CALLIER et al., 2003). A Figura 5 ilustra de maneira simplificada a diferença das vias de sinalização dos receptores de classe D1 e D2.

Figura 5: Esquema simplificado das vias de sinalização dos receptores de classe D1 e D2.



Fonte: Informações retiradas de (SILVERTHORN, 2017; CIVELLI; BUNZOW; GRANDY, 1993).

Existem três principais sistemas dopaminérgicos no sistema nervoso central, sendo eles: sistema nigroestriatal, sistema mesocorticolímbico, e sistema túbero-infundibular. O sistema nigroestriatal se origina na substância negra presente no mesencéfalo e está relacionada a função motora da DA. O sistema mesocorticolímbico emana da área tegumentar ventral e é responsável pelo controle emocional regulado pela DA. Já o sistema túbero-infundibular deriva do hipotálamo e estimula a produção de prolactina, principal hormônio relacionado à lactação (JUCAITE, 2002; TZSCHENTKE, 2000).

Os níveis normais de DA no sangue são de $0,01$ a $1,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ variando de acordo com estímulos internos e externos (DA SILVA, *et al*, 2008). Quando esses níveis se mantêm alterados são observados sintomas relacionados a algumas doenças, sendo as duas principais a doença de Parkinson e a Esquizofrenia. Na urina existe a presença de dopamina e de seu metabólito ácido homovanílico (HVA). Atualmente já são realizados exames de urina de 24 horas para monitorar os níveis de catecolaminas no organismo, mas com outras aplicações, como a detecção de feocromocitomas. Para este exame o valor de referencia da DA deve estar abaixo de $540 \mu\text{g} / 24$ horas.

A doença de Parkinson é caracterizada pela perda dos neurônios dopaminérgicos e uma conseqüente queda dos níveis de DA no sistema nigroestriatal. Os sintomas da doença de Parkinson podem ser divididos entre os sintomas motores, sendo eles: movimentos alternados, tremores involuntários, rigidez muscular, lentidão nos movimentos, instabilidade postural e perda de expressões faciais, e os sintomas não

motores, tais como: dores musculares, constipação, fadiga, disfunção sexual, déficit olfatório, distúrbios do sono, ansiedade, depressão e prejuízo na memória e aprendizagem (SANTENS et al., 2003; CHAUDHURI; HEALY; FMEDSCIC, 2006)

Um dos tratamentos possíveis para a doença de Parkinson é a administração de medicamentos à base de L-DOPA, pois este é convertido em dopamina no cérebro, aumentando os níveis do neurotransmissor no organismo (GUYTON; HALL, 2016) e recentemente foi realizado, de maneira bem sucedida, o tratamento de um paciente com doença de Parkinson ao enxertar células progenitoras de DA em seu cérebro. As células eram derivadas de células-tronco pluripotentes induzidas (iPSC, do inglês *induced pluripotent stem cell*) retiradas do mesencéfalo de um paciente saudável (SCHWEITZER et al., 2020).

Já a esquizofrenia é uma doença que afeta 23 milhões de pessoas ao redor do mundo. Pacientes esquizofrênicos sofrem de psicose, um quadro clínico no qual o senso de realidade é interrompido e a pessoa ouve vozes, tem delírios, alucinações e são altamente paranoicos com sensação de perseguição (ABI-DARGHAM, et al, 1998; OPAS, 2019).

Uma das hipóteses para o surgimento da esquizofrenia é a hipótese dopaminérgica, que explica que o excesso de excitação dos neurônios dopaminérgicos no sistema mesocorticolímbico eleva os níveis de DA e superestimula os receptores D2. Esse efeito pode ser causado por mutações genéticas, estresse, disfunção dos lobos frontais e temporais do cérebro, além do uso de drogas (HOWES; KAPUR, 2009; NIKHIL; PETERSON; CARONABC, 2017).

A esquizofrenia foi correlacionada ao aumento dos níveis de DA durante o tratamento da doença de Parkinson, no qual fora observado que alguns pacientes tratados com L-DOPA passavam a desenvolver os sintomas de esquizofrenia devido ao aumento de DA no cérebro (GUYTON; HALL, 2016).

A esquizofrenia causa perda da substância cinzenta, principalmente no córtex pré-frontal, região responsável pela cognição superior e pelo controle emocional. A esquizofrenia é uma doença capaz de atingir até mesmo crianças, e jovens que apresentam formas atenuadas de delírio e alucinação podem desenvolver psicose total em até 2 anos em 20 a 35% dos casos (LEVITT et al., 2010; BAKHSHI; CHANCE, 2015; CANNON, 2015).

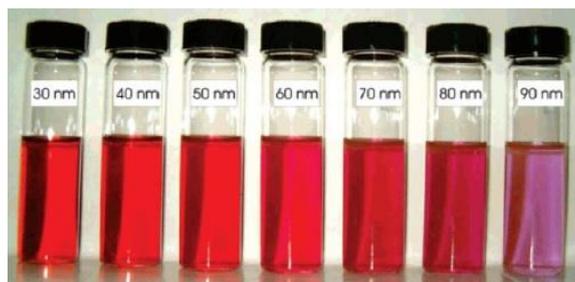
Tendo em vista a alta prevalência das doenças mentais e seus prejuízos à qualidade de vida dos pacientes, juntamente com o aumento da expectativa de vida do ser humano, é de grande importância que os níveis séricos de DA sejam monitorados de maneira precisa, pois ela pode servir como biomarcador para doenças importantes como a esquizofrenia e a doença de Parkinson. Sensores que sejam cada vez mais sensíveis e seletivos irão contribuir com o diagnóstico precoce dessas doenças, o que poderá limitar a morbidade e modificar o curso da doença, melhorando a resposta aos tratamentos e retardando a neurodegeneração resultante do agravamento da condição clínica de pacientes com a doença de Parkinson e com a esquizofrenia (LIEBERMAN; SMALL; GIRGIS, 2019; PARNETTI et al., 2019).

2.3. NANOPARTÍCULAS DE OURO

As nanopartículas de ouro são extensamente utilizadas na construção de sensores e catalizadores, além dos sistemas de *drug-delivery*, tratamento de tumores entre outras aplicações, pois possuem propriedades especiais como propriedades magnéticas, térmicas, ópticas, eletrônicas e catalíticas, além de serem biocompatíveis, terem pouca toxicidade e possuírem alta taxa superfície/volume (XIAO, *et al.*, 2019).

As propriedades ópticas das nanopartículas de ouro dependem do tamanho e do formato, possuindo uma banda de absorvância que se desloca de acordo com o diâmetro das AuNPs. As que possuem tamanho médio de até 30 nm são vermelhas, com banda de absorvância em torno de 520 nm. À medida que o diâmetro aumenta, a banda de absorvância se desloca para a direita, chegando próximo dos 600 nm quando o tamanho das AuNPs é de 100 nm. O aumento do comprimento de onda caracteriza redução da energia absorvida pelas AuNPs (ABTAHI, 2013). A Figura 6 mostra a variação de cores emitidas por cada diâmetro de AuNP.

Figura 6: Foto mostrando as cores das AuNPs com diferentes tamanhos.

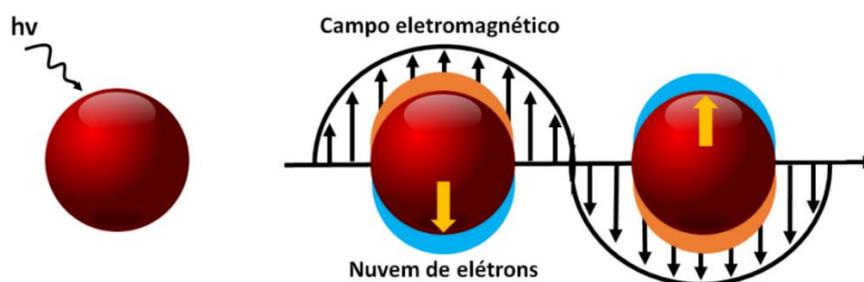


Fonte: Njoki, *et al.*, 2007.

Se o comprimento de onda da luz incidente for maior do que o diâmetro da nanopartícula, ocorre o efeito de ressonância plasmônica superfície, que se trata de uma oscilação na nuvem eletrônica da superfície da nanopartícula, provocando também um dipolo induzido, deslocamento conjunto dos elétrons da superfície da AuNP no sentido oposto ao campo elétrico (Figura 7).

O efeito de ressonância plasmônica de superfície, no entanto, não é influenciado somente pelo tamanho, mas também pelo formato das nanopartículas, solvente, ligantes de superfície, carga, temperatura e concentração de AuNPs na solução (YEH, *et al.*, 2012).

Figura 7: Representação esquemática da oscilação dos elétrons nas nanopartículas no campo eletromagnético da luz incidente.



Fonte: adaptado de YEH, *et al.*, 2012.

A propriedade catalítica das AuNPs é a principal propriedade explorada neste trabalho. As reações químicas são processos de transformação de reagentes químicos, com rearranjo de sua estrutura, algumas vezes com perda ou adição de átomos. Para que uma espécie sofra essa transformação é necessária uma energia de ativação (E_a). A catálise é o processo de diminuição E_a de uma reação química, fazendo com que a reação ocorra mais rapidamente (DIAS; FERREIRA; CUNHA, 2012).

A propriedade de catálise das AuNPs também é intrínseca ao tamanho da partícula. As AuNPs são estruturas tão pequenas que possuem uma grande proporção entre os átomos de superfície e os átomos internos. Quanto menor o material, maior será a quantidade de átomos superficiais, isso aumenta a taxa de transferência de elétrons na interface eletrodo-solução e conseqüentemente aumenta a atividade catalítica do sensor. A modificação da superfície do biossensor com AuNPs aumenta também sua área

superficial e possibilita maior contato entre o dispositivo e o analito de interesse (DANIEL; ASTRUC, 2004; ISHIDA et al., 2020).

A catálise das AuNPs pode ser observada por meio de: (i) amplificação do sinal eletroquímico gerado por biossensores, (ii) pela definição do pico de oxidação do analito, em alguns casos, (iii) pela diminuição do potencial de oxidação e (iv) até mesmo, por tornar reações que antes eram irreversíveis em quase-reversíveis ou reversíveis. A adição de AuNPs à arquitetura do biossensor tende, portanto, a aumentar sua sensibilidade e diminuir o limite de detecção favorecendo os processos eletrocátlicos da superfície do eletrodo (KONG et al., 2009; HOSSEINI et al., 2013; KHASHAYAR et al., 2017; WINIARSKI et al., 2017).

A síntese de nanopartículas deve gerar material de tamanho, morfologia, composição química e estrutura cristalina. Existem muitos métodos diferentes de obtenção das AuNPs e estes podem ser divididos em dois tipos principais, os métodos “*Top-down*” (de cima para baixo) e “*Bottom-up*” (de baixo para cima). Dentro os métodos “*Top-down*” podemos citar a ablação a laser e o *sputtering* (VALVERDE-ALVA et al., 2015; TAMILVANAN et al., 2014). Os métodos *Bottom-up*, por sua vez são mais diversos, e alguns exemplos são a biossíntese, decomposição térmica, eletrodeposição e redução química (KIMLING et al., 2006; PHILIP et al., 2011; SALEM et al., 2017; BARBETA et al., 2010). Optamos por obter as AuNPs a partir de um o método que emprega *Bottom-up*, baseado na redução química de sais de ouro.

Os métodos *Bottom-up* realizados por síntese química apresentam como principais vantagens em relação aos demais métodos: a facilidade de obtenção, baixo custo e alta estabilidade química. O método de redução química se baseia na redução do sal de ouro para formar nanopartículas. Alguns exemplos de agentes redutores utilizados são o fósforo branco, citrato de sódio, ácido ascórbico e o borohidreto de sódio. A formação das nanopartículas depende das concentrações do agente redutor, dos outros solutos, além da temperatura, que estarão diretamente relacionados com a energia livre de Gibbs no sistema. A formação de núcleos acontece em uma faixa de concentração crítica e a partir da qual é obtido o crescimento das nanopartículas, com o objetivo de baixar a energia superficial. Os núcleos formados devem atingir um raio crítico para que sejam estáveis o suficiente para não se desfazerem no solvente, mas terem energia suficiente para formar as nanopartículas (MINGOS, 2014).

Depois de sintetizadas as nanopartículas precisam de estabilizantes, que irão

impedir que seu crescimento continue de maneira descontrolada, formando grandes agregados que precipitam na solução. A estabilização pode ser realizada de três maneiras diferentes: eletrostática, estérica ou mista.

A estabilização eletrostática é baseada na carga das nanopartículas. Esta é realizada com a dissolução de íons na solução. A concentração desses íons se dá de maneira organizada, pois próximo à superfície da partícula existe maior concentração de contra-íons (íons com carga oposta da nanopartícula), podendo ser chamada de camada de Stern. Mais externamente, logo após essa camada é encontrada a camada de Gouy, ou camada dupla difusa. Nessa segunda camada existe uma concentração moderada de íons que atinge a concentração média no corpo da solução. Desse modo percebe-se que o potencial elétrico da solução aumenta à medida que nos aproximamos da camada Stern. Quando duas partículas se aproximam em uma solução, a dupla camada de ambas as partículas se sobrepõe e acontece uma repulsão entre elas, promovendo um afastamento até que a força de repulsão seja igual a zero (CAO, 2004).

A estabilização estérica, por sua vez, é realizada com a adição de polímeros, que serão adsorvidos ou ancorados à superfície da nanopartícula. Esse tipo de estabilização irá impedir a aglomeração das partículas, pois a camada polimérica impede de forma a ocupar os espaços intermediários entre as partículas. A estabilização estérica é bastante eficiente e menos sensível a alterações do meio, tais como eletrólitos e concentração de nanopartículas (CAO, 2004).

Por fim, a estabilização mista ocorre pela adsorção ou ancoragem de polímeros, que juntamente com íons em solução irão promover um potencial elétrico ao redor da camada polimérica. Dessa forma as nanopartículas irão se repelir concomitantemente por forças eletrostáticas e restrição estérica (CAO, 2004). Neste trabalho utilizamos a estabilização estérica. As AuNPs foram estabilizadas com a glutathione (GSH), um tripeptídeo produzido a partir da junção dos aminoácidos cisteamina, glicina e glutamato (NELSON; COX, 2014), que atua como um bom estabilizante por se ligar fortemente ao ouro através de seu grupo tiol e repelir outras moléculas de GSH, devido à carga negativa do grupo carboxila (COO^-) em solução, formando AuNP-GS (BRIÑAS et al., 2008).

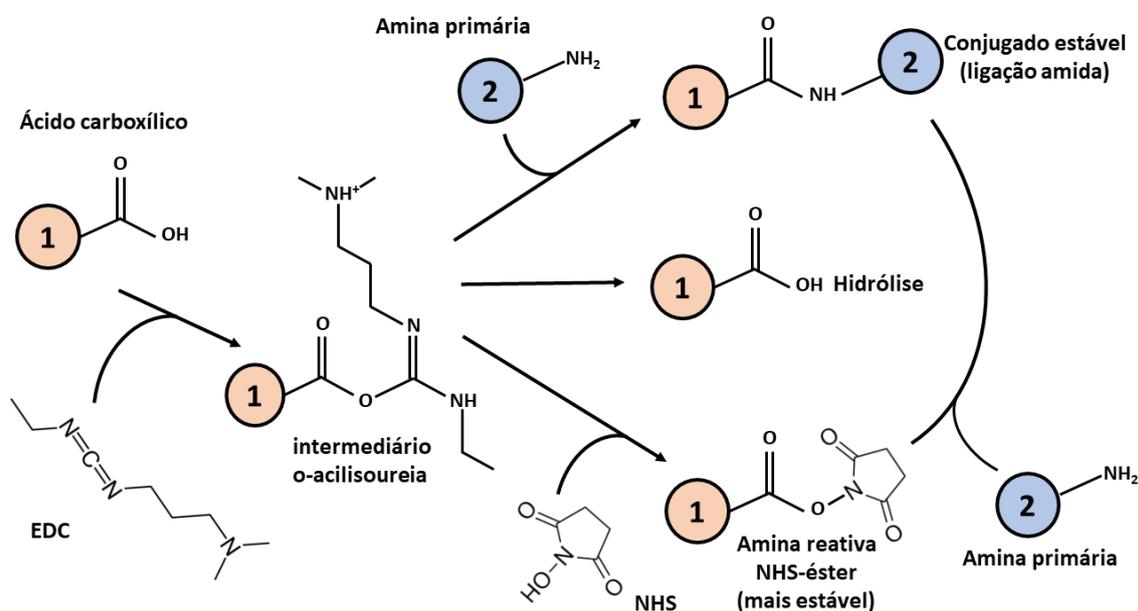
As AuNPs frequentemente são utilizadas em sua forma funcionalizada, ou seja, são ancoradas a moléculas de interesse, em geral, biológicas, para aumentar a sensibilidade e seletividade do sensor. Existem muitas formas de realizar essa funcionalização. A forma mais tradicional é pela síntese das AuNPs com estabilização

estérica, por exemplo com glutationa ou cisteamina. (CAO, 2004).

Neste trabalho foram utilizados os catalisadores Cloridrato de N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilcarbodiimida (EDC) e N-hidroxissuccinimida (NHS). Esses catalisadores irão disponibilizar os grupos carboxila e amina para realizar uma ligação amida e realizar a ancoragem do FAD sob as AuNP-GS. O EDC é uma carbodiimida comumente utilizada por sua eficiência, grande solubilidade em água e, pela vantagem da reação poder ser realizada a temperatura ambiente. O NHS é usado para aumentar a estabilidade de intermediários ativos em reações de acoplamento, através da formação de grupos funcionais éster ativos com carboxilatos. Muitos trabalhos já demonstraram a funcionalização de biomoléculas com EDC e NHS (ARYA et al., 2007; DHAND et al., 2008; ÖZCAN; SEZGINTÜRK, 2015; TOLBA et al., 2021).

A reação catalisada pelo sistema EDC/NHS é dividida em duas etapas. Na primeira delas ocorre a formação de um intermediário O-acil-ureia, que é bastante instável, já a segunda etapa é mais complexa, podendo seguir 3 caminhos diferentes. O primeiro caminho é a hidrólise do O-acil-ureia formado, o segundo é a formação de um conjugado estável pela ligação amida com uma molécula portadora de grupo amina. O terceiro é a formação de um segundo intermediário mais estável (éster-NHS-amino reativo) que, posteriormente, irá reagir com a amina primária e também formar um conjugado estável. O EDC possui maior eficiência em pH ácido (próximo de 4,5) e a presença do NHS aumenta a eficiência do sistema em pH ligeiramente alcalino, (entre 7,0 e 8,0) (BARTCZAK; KANARAS, 2011). A utilização do sistema EDC/NHS possibilitou a formação do conjugado AuNP-GS-FAD à temperatura ambiente, sob condições de pH 7,4 que foi escolhido devido a presença de moléculas biológicas. A Figura 8 ilustra todas as reações possíveis para funcionalização com o sistema EDC e EDC/NHS.

Figura 8: Esquema reacional do sistema EDC e EDC/NHS para formação de uma ligação amida entre duas moléculas.

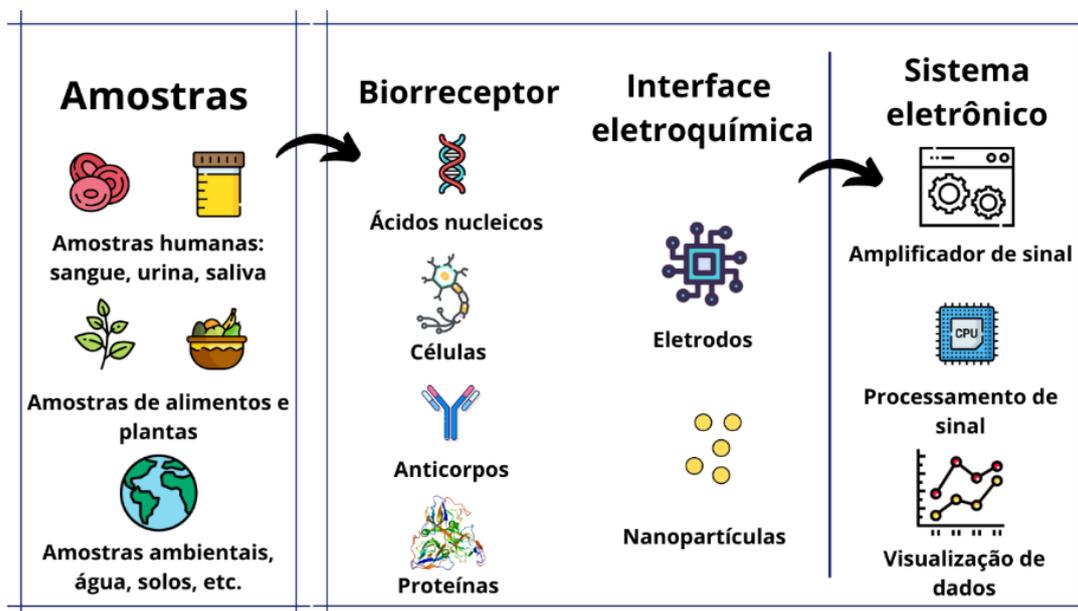


Fonte: adaptado de (THERMOFISHER, 2014).

2.4. SENSORES E BIOSSENSORES

Sensores são dispositivos capazes de detectar um analito em uma solução líquida ou gasosa, formados por: (i) uma unidade receptora (podendo ser biológica, orgânica ou inorgânica) que terá interação com o analito, (ii) uma arquitetura de interface que emitirá um sinal mensurável (sensor fabricado em diversos materiais, como polieletrólitos, polímeros, nanotubos, nanopartículas, nanofios, etc.), (iii) um amplificador de sinal (equipamento de leitura) e, (iv) um software que irá processar os dados recebidos, expresso muitas vezes na forma de gráficos (GRIESHABER, *et al.*, 2008). Neste trabalho estamos considerando como biossensores, aqueles que possuem como unidade receptora uma molécula biológica. Os sensores e biossensores podem ser classificados pelo tipo de sinal emitido, podendo ser: eletroquímico, piezoelétrico, magnético, óptico, entre outros (POWER *et al.*, 2017; LEUNG *et al.*, 2018; SALIM *et al.*, 2018; SUESS *et al.*, 2018; YAN; LI; SU, 2018; KUMAR *et al.*, 2019). A Figura 9 ilustra os elementos que compõem um biossensor.

Figura 9: Elementos que compõem um biossensor eletroquímico.



Fonte: Adaptado de (GRIESHABER, et al., 2008).

O sensoriamento é fundamental para diversas áreas (biomedicina, ambiental, alimentos, indústria química, farmacêutica) por possuir uma ou mais das seguintes características: (i) monitoramento qualitativo e quantitativo de analitos nas mais diversas amostras em (ii) tempo real com (iii) velocidade de análise e (iv) facilidade de uso, além de necessitar de (v) pouco volume de amostra. A escala nanométrica dos materiais utilizados na nanotecnologia é o diferencial nesse campo de biossensoriamento, pois propicia uma alta razão superfície/volume, que aumenta a área eletroativa do dispositivo e melhora a interação do sensor com o meio, culminando na produção de sensores que são cada vez mais sensíveis e seletivos (OLIVEIRA Jr., *et al.*, 2015).

Neste contexto, os biossensores possuem uma unidade receptora que é composta de uma molécula biológica, normalmente um biorreceptor, e por uma unidade transdutora de sinal em nanoescala. Os biorreceptores são isolados de células biológicas e podem ser proteínas, enzimas, anticorpos, aptâmeros, entre outros (METKAR; GIRIGOSWAMI, 2019).

Isolando o biorreceptor correto é possível monitorar a concentração de quase qualquer composto em nosso organismo. Muitos dos receptores utilizados são proteínas de membrana, responsáveis por interagir com o meio externo e emitir sinal específico para o interior da célula, características ideais para um biossensor eletroquímico por exemplo (KWON, *et al.*, 2018).

Devido à importância da DA, como um dos principais neurotransmissores do sistema nervoso central de mamíferos, incluindo o ser humano, além de desempenhar funções importantes no sistema renal, hormonal e cardiovascular (BEITOLLAHI; SAFAEI; TAJIK, 2019); pesquisadores têm se dedicado a desenvolver biossensores cada vez mais sensíveis e seletivos para sua detecção.

Os trabalhos encontrados na literatura podem ser divididos de acordo com a biomolécula utilizada como biorreceptor para DA no dispositivo proposto. Os artigos buscados utilizaram algumas classes diferentes de biomoléculas na detecção de DA, sendo elas: enzimas, aptâmeros, DNA e aminoácidos. Serão apresentados primeiramente os biossensores enzimáticos.

A principal enzima utilizada na literatura para detecção de DA é a lacase, uma enzima que faz parte de oxidases multicobre azuis. A lacase é produzida por fungos, bactérias e plantas e é capaz de oxidar fenóis, amino-fenóis, aminas-aromáticas e ácido ascórbico. Por esse motivo, ela é utilizada como componente receptor em biossensores para DA (DING et al., 2014).

A lacase foi utilizada para funcionalizar um sensor construído sobre um eletrodo de pasta de carbono (GPE, do inglês *carbon paste electrode*) com AuNPs estabilizadas com o polieletrólito catiônico hidrocloreto de poli(alilamina) (PAH). O dispositivo resultante foi utilizado para detecção eletroquímica de DA com a técnica de voltametria de onda quadrada (SWV, do inglês *square wave voltametry*) em tampão acetato, 0,1 mol L⁻¹, pH 6,0. Nestas condições o limite de detecção (LOD) encontrado foi de 0,26 µmol L⁻¹ com uma faixa linear de trabalho de 0,49 a 23,0 mmol L⁻¹. Na amostra real utilizada pelos autores foram amostras farmacêuticas com 4 concentrações diferentes de DA, e os valores de recuperação obtidos foram de 97,6 a 105,5 % (SILVA; VIEIRA, 2016).

Um eletrodo de carbono vítreo (GCE, do inglês *glassy carbon electrode*) foi modificado com óxido de grafeno reduzido (rGO, do inglês *reduced graphed oxide*) e a enzima lacase para detecção de DA. As análises foram realizadas em tampão PBS 0,2 mol L⁻¹, pH 7,0, com a técnica de voltametria de pulso diferencial (DPV, do inglês *differential pulse voltametry*). Esse trabalho alcançou um LOD de 91,0 nmol L⁻¹ e uma faixa linear de detecção de 0,1 a 3,0 µmol L⁻¹. Para testar a detecção em uma matriz mais complexa, foram utilizados o soro plasmático e urina sintética. Os valores de recuperação da detecção no soro plasmático e na urina sintéticos foram, respectivamente, de 97,2 a 104,5% e 98,7 a 103,9% (KOHORI; SILVA; CESARINO, 2018).

A enzima lacase também foi imobilizada em um GCE juntamente com microesferas de Fe_3O_4 , SiO_2 e $\text{SiO}_2\text{-NH}_2$. O dispositivo proposto apresentou um LOD de $0,177 \text{ mmol L}^{-1}$ e faixa linear de detecção de $1,5 - 75 \text{ mmol L}^{-1}$. A amostra real utilizada foi uma injeção farmacêutica e o valor médio de recuperação encontrado foi de 99,6%. As medidas eletroquímicas foram feitas com a técnica de DPV em tampão PBS $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 6,0 (LI et al., 2018).

Outra enzima utilizada nos trabalhos para construção de biossensor para detecção de DA é a tirosinase. A tirosinase é a enzima que catalisa a hidroxilação da tirosina, convertendo-a em L-DOPA, um precursor da DA. Mas a tirosinase também é capaz de interagir com compostos fenólicos, como fenol, catecol, DA e epinefrina (LIU et al., 2015).

A tirosinase foi utilizada para funcionalizar um eletrodo construído sobre um eletrodo de carbono serigrafado (SPCE, do inglês *screen-printed carbon electrode*) com quitosana e rGO. Esse biossensor obteve LOD de 22 nmol L^{-1} e ampla faixa linear variando de $0,4-8 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ a $40-500 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$. A técnica eletroquímica utilizada foi a voltametria cíclica (VC) em tampão PBS $0,01 \text{ mol L}^{-1}$, pH 7,0. O teste em amostra real foi realizado em urina humana e os valores de recuperação ficaram entre 93,0% e 97,6% (LIU et al., 2019).

A própria DA foi utilizada como biorreceptor em um biossensor para detecção de DA. O dispositivo foi feito com nanopartículas de óxido de zinco (ZnO), nanoesferas de carbono, quitosana e carbono macroporoso derivado do caule do kenaf (kenaf é da espécie *Hibiscus cannabinus*, uma planta da família Malvaceae, também chamada cânhamo Deccan e juta Java) tridimensional (3D-KSC). A DA foi acrescentada à arquitetura para conferir seletividade ao biossensor. Este trabalho apresentou um LOD de $0,039 \text{ nmol L}^{-1}$ e uma faixa linear de $0,12 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ a $152 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$. A detecção eletroquímica foi realizada com a técnica de DPV em tampão PBS $0,2 \text{ mol L}^{-1}$, pH 7,0. Não houve teste em amostra real (SONG et al., 2019).

Uma classe de moléculas muito utilizada como biorreceptor são os aptâmeros. Aptâmeros são oligonucleotídeos sintéticos, construídos com uma sequência específica para interagir com um analito alvo, que pode ser um substrato orgânico ou inorgânico de baixo peso molecular, ou até mesmo proteínas. Os aptâmeros podem ser moléculas de DNA ou de RNA (HU et al., 2014).

Um aptassensor foi construído utilizando um transistor eletroquímico orgânico (OECT) incorporado em um substrato de poliimida flexível como transdutor para detecção de DA com LOD de $1 \mu\text{mol L}^{-1}$ e faixa linear de trabalho de 5 a $70 \mu\text{mol L}^{-1}$. A detecção eletroquímica utilizou a técnica de SWV em tampão TE (Tris-HCl e EDTA) mmol L^{-1} , pH 8,0. Neste trabalho não foi realizada a detecção em amostra real (LIANG et al., 2020).

Um GCE foi modificado com óxido de grafeno (GO, do inglês *graphene oxide*) e azul do nilo (NB, do inglês *nile blue*), AuNPs e aptâmeros para detecção de DA com a técnica de SWV. A arquitetura estudada apresentou limite de detecção de 1 nmol L^{-1} e uma faixa linear de detecção de 10 nmol L^{-1} a $0,2 \mu\text{mol L}^{-1}$ em tampão PBS $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 7,0. A amostra real utilizada foi soro humano de 6 amostras diferentes e os valores de recuperação obtidos ficaram entre 97,0–104,0% (JIN et al., 2018).

Outro aptassensor foi construído sobre um eletrodo de ouro polido funcionalizado com nanoestrutura de ouro em forma de fuso, 6-mercaptop-1-hexanol (MCH) e azul de metileno (NB, do inglês *methylene blue*). As medidas eletroquímicas para detecção de DA foram realizadas em tampão PBS $0,01 \text{ mol L}^{-1}$, pH 7,4 utilizando a técnica de voltametria de pulso diferencial (DPV, do inglês *differential pulse voltammetry*). Para testar a sensibilidade real do biossensor foram utilizadas 10 amostras de soro humano, sendo 5 delas de pacientes saudáveis [(amostras contendo DA inferior a 30 pg mL^{-1} , investigadas primeiramente por cromatografia de alta eficiência (HPLC do inglês *high performance liquid chromatography*)] e 5 amostras de pacientes com valores de DA acima de 30 pg mL^{-1} . O limite de detecção do dispositivo estudado foi de $0,01 \text{ nmol L}^{-1}$ e a recuperação ficou próxima de 100% para todas as amostras de soro (TAHERI; ESKANDARI; NEGAHDARY, 2018).

Moléculas de aptâmeros também foram utilizadas para fabricar um biossensor sobre um GCE usando um composto de GO com GCSC. O limite de detecção obtido nesse trabalho foi de $0,75 \text{ nmol L}^{-1}$ e a amostra real foi realizada com 4 amostras de sangue humano diluídos à 10%. Os valores de recuperação ficaram entre 98,6 e 102,5%. As medidas de detecção foram feitas com a técnica de DPV em tampão PBS $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 7,0 (WEI et al., 2019).

Relatou-se a construção de um biossensor com um aptâmero dividido em duas partes, S1 e S2, na qual a fita S1 é amarrada ao eletrodo, enquanto a segunda é marcada com (MB) e atua como um repórter redox. Outra fita de DNA de fita simples

complementar à S1 (ssDNA, do inglês *single-stranded DNA*) marcada com antraquinona (AQ) é introduzida e relata fitas de superfície amarradas que permanecem em seu estado virgem. Essa estrutura foi ancorada sobre um eletrodo de ouro revestido com uma monocamada de MCH. Esse biossensor apresentou LOD de $10 \mu\text{mol L}^{-1}$ em tampão PBS, pH 7,4. As medidas de amostra real foram realizadas em soro humano diluído na proporção de 1:500 em tampão PBS. Os valores de recuperação obtidos variaram entre 88% e 105% (GUO et al., 2020).

O último sensor baseado em aptâmeros encontrado foi montado sobre o um substrato de ouro funcionalizado com um aptâmero marcado com ferroceno ($\text{Fe}(\text{C}_5\text{H}_5)_2$). Neste estudo, foram utilizadas as técnicas de VC e DPV para detecção, ambas em tampão de ligação fosfato (PBB, do inglês *phosphate binding buffer*) $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$. Os LODs para cada uma das técnicas utilizadas foram respectivamente 60 e 20 pmol L^{-1} (ABU-ALI et al., 2020).

Os aptâmeros são moléculas de fita simples, mas o DNA fita dupla também já foi empregado na fabricação de alguns biossensores para detecção de DA. Um exemplo é o dispositivo construído sobre um GCE com nanotubos de carbono (CNT, do inglês *carbono nanotube*) ácido 3, 3'-ditiodipropiônico di (éster de N-hidroxissuccinimida) (DSP), DNA e AuNPs. Esse biossensor apresentou LOD de 18 pmol L^{-1} e faixa linear de detecção entre $30,0 \text{ pmol L}^{-1}$ a $30,0 \text{ nmol L}^{-1}$. As medidas eletroquímicas foram feitas em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 7,0, com a técnica de DPV. A amostra real utilizada foi o líquido cérebro espinhal e os valores de recuperação ficaram entre 103,3% e 105,5% (LIU et al., 2018).

Outro biossensor para detecção de DA utilizou o nanocompósito MXene/Nanocompósitos DNA / Pd / Pt imobilizados sobre um GCE. MXene é um material bidimensional sintetizado com um metal de transição, um elemento do grupo AIII ou AIV da tabela periódica e carbono ou nitrogênio. O MXene utilizado neste trabalho foi sintetizado a partir de nanofolhas de Ti_3C_2 preparadas por ataque químico de camadas de Al. O LOD desse dispositivo foi de $30,0 \text{ nmol L}^{-1}$, e sua faixa linear de trabalho foi de $0,2$ a $1000 \mu\text{mol L}^{-1}$. A detecção eletroquímica foi feita em tampão PBS $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 7,0, com a técnica de cronoamperometria. Para as medidas em amostra real foi utilizado soro humano (ZHENG et al., 2018).

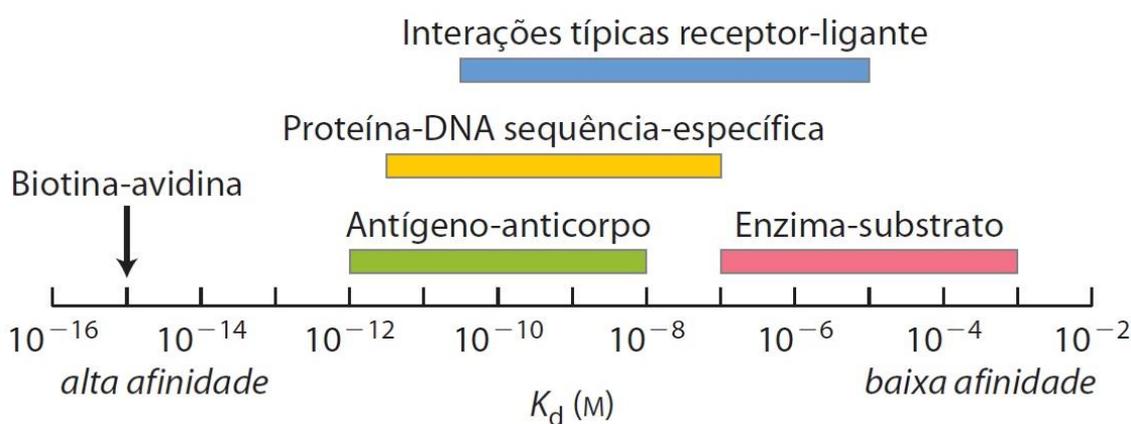
Moléculas de DNA também foram utilizadas para funcionalizar um biossensor feito com GCE, CNT e grafeno dopado com N (NEG, do inglês *N-doped graphene*). Esse

trabalho obteve um LOD de 14 nmol L^{-1} e faixa linear de $0,02$ a $1 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ em tampão PBS, pH 7,4, através da técnica de DPV. A concentração do tampão PBS não foi informada. Também não foi realizada medida em amostra real (KETEKLARIJANI et al., 2019).

ZHANG et al. (2020) utilizou uma molécula diferente como biorreceptor para DA, um polímero construído a partir do aminoácido L-metionina, que foi capaz de oxidar a DA em DA-quinona. Esse dispositivo foi feito sobre um GCE com $\text{Au}_1\text{Pt}_3\text{NPs}$. O LOD obtido foi de $0,07 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ e faixa linear de $0,5$ a $200 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$. As medidas de detecção foram feitas com a técnica de DPV em tampão PBS $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 7,38. As medidas de amostra real foram feitas com urina humana e apresentaram valores de recuperação entre 93,8 e 104,2%.

A interação entre um biorreceptor e seu ligante depende da afinidade entre eles. Essa afinidade pode ser medida pela constante de dissociação (K_d) do complexo receptor-ligante durante o equilíbrio da reação e será regida principalmente pela complementariedade entre suas estruturas químicas e a classe do biorreceptor. A Figura 10 ilustra a variação das K_d típicas de várias classes de interações nos sistemas biológicos (NELSON; COX, 2014).

Figura 10: Escala de K_d (em mol L^{-1}) de diversas classes de interação receptor-ligante.



Fonte: (NELSON; COX, 2014)

Na Figura 10 é possível observar que as enzimas possuem baixa afinidade pelo ligante ($K_d = 10^{-7}$ a $10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$), enquanto interações entre proteína e DNA sequência-específica possuem maior afinidade, semelhante à de antígeno-anticorpo ($K_d = 10^{-12}$ a 10^{-8}

$^8 \text{ mol L}^{-1}$). A constante de dissociação medida para qualquer interação receptor-ligante é válida para as condições nas quais ela foi realizada, podendo variar de acordo com a concentração salina e o pH da solução, entre outras variáveis (NELSON; COX, 2014). No entanto, os valores de K_d apresentados ajudam a explicar por que biossensores que utilizam enzimas em sua arquitetura, em geral, possuem LOD maiores do que aqueles construídos com aptâmeros.

Além da classe do biorreceptor, o desempenho do biossensor está diretamente relacionado com o tipo de nanomaterial utilizado no dispositivo. Por exemplo, 5 dos 7 trabalhos que apresentaram os menores LODs (menores do que $30,0 \text{ nmol L}^{-1}$) possuíam em sua arquitetura materiais como GONPs, GO e rGO. Dos outros dois biossensores, um utilizou nanoestrutura de ouro, MCH e MB, e o outro utilizou uma arquitetura bastante simples, com eletrodo de ouro funcionalizado com aptâmeros e ferroceno.

O grafeno é uma estrutura formada por anéis hexagonais de carbono, com átomos hibridizados na forma sp^2 . Sua configuração resulta em um átomo livre para cada átomo de carbono no orbital p , e confere ao grafeno propriedade de alta condutividade elétrica e térmica (SEGUNDO; VILAR, 2016). Essa propriedade pode explicar o bom desempenho dos biossensores que utilizam grafeno em sua arquitetura. As AuNPs e Au@PtNPs foram utilizadas em 2 biossensores e eles apresentaram LOD de 0,26 e 0,07 $\mu\text{mol L}^{-1}$, respectivamente.

Levando-se em consideração aqui o explicitado, o presente trabalho teve como base a funcionalização de nanopartículas de ouro com a molécula FAD, a fim de estudar suas propriedades aplicadas ao sensoriamento de DA, com base em sua sensibilidade, LOD, limite de quantificação (LOQ), seletividade, estabilidade e aplicação em amostras reais. Essa arquitetura não foi observada nos trabalhos citados e a utilização do FAD como biorreceptor para a DA tem o objetivo de tornar o biossensor seletivo e diminuir o seu custo em relação à biossensores enzimáticos.

3. OBJETIVOS

Desenvolver um biossensor eletroquímico a partir de filmes finos de nanopartículas de ouro funcionalizadas com a biomolécula FAD, para detecção de dopamina.

3.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar a síntese das nanopartículas de ouro, por redução química, estabilizadas com glutatona;
- Funcionalizar as AuNPs-GS com FAD pelo método de EDC/NHS;
- Caracterizar as AuNPs-GS e o conjugado AuNP-GS-FAD pela técnica de espectroscopia de UV-Vis e de fluorescência;
- Modificar as superfícies do substrato de ouro a partir do método SAM utilizando a molécula 11-Mua;
- Fabricar filmes a partir da técnica LbL utilizando os polieletrólitos PEI, conjugado AuNPs-GS-FAD;
- Caracterizar a síntese e funcionalização das AuNP-GS bem como a interação e adsorção dos materiais no substrato, por espectroscopias UV-Vis e Fluorescência.
- Caracterizar a morfologia dos filmes nanoestruturados a partir da microscopia de força atômica (AFM, do inglês *atomic force microscopy*);
- Identificar as características estruturais em relação a grupos funcionais e ligações químicas presentes no biossensor através da técnica de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR, do inglês *infrared by Fourier transform*);
- Caracterizar o comportamento eletroquímico dos filmes nanoestruturados por voltametria cíclica (VC);
- Avaliar o dispositivo como unidade sensorial para detecção de DA a partir do método de voltametria de pulso diferencial (DPV) com relação à sua sensibilidade, limite de detecção, limite de quantificação, seletividade, estabilidade e aplicação em amostra biológica.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. MATERIAIS

Os materiais utilizados para construção do filme foram:

- Polieletrólito catiônico poli(etilenoimina) (PEI), 50% m/V em água);
- 11-Mua (ácido 11-mercaptoundecanóico) (95% de pureza, $MM=218,36 \text{ g mol}^{-1}$);
- Cloridrato de dopamina (DA, $M = 189,64 \text{ g mol}^{-1}$);
- Flavina adenina dinucleotídeo sal de disódio hidratado (FAD, 95% HPLC, $MM = 829,51 \text{ g mol}^{-1}$);

Para a síntese das AuNPs utilizamos:

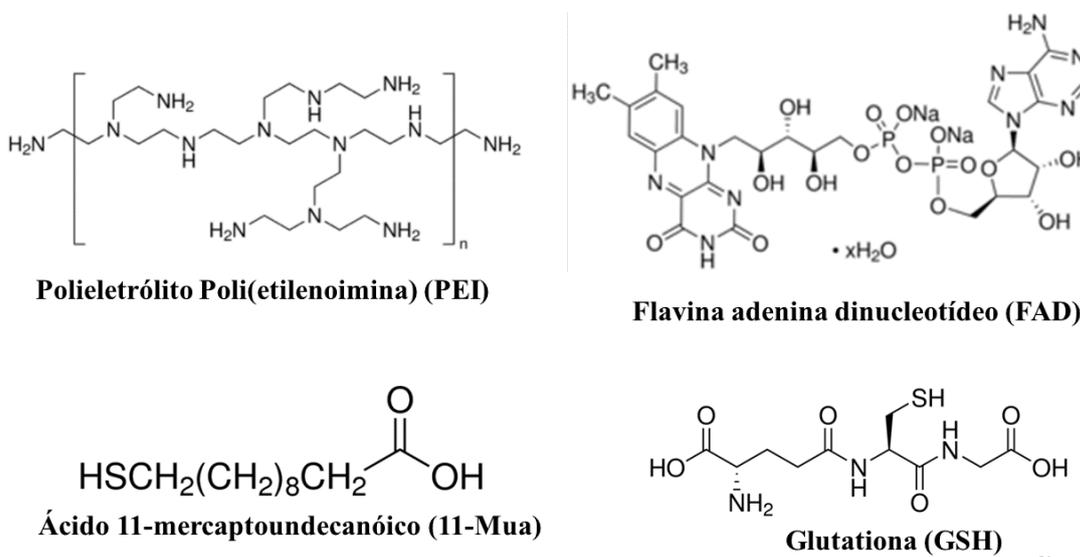
- Sal de ouro (cloreto de ouro triidratado, pureza de 99,9%, $MM = 393,83 \text{ g mol}^{-1}$);
- Borohidreto de sódio (NaBH_4 , pureza de 98,0%, $MM = 37,83 \text{ g mol}^{-1}$);
- Glutathiona (GSH) ($MM = 307,32 \text{ g mol}^{-1}$);
- Cloridrato de N-(3-dimetilaminopropil) - N'-etilcarbodiimina (EDC) ($MM = 191,70 \text{ g mol}^{-1}$);
- N-hidroxisuccinimida (NHS) ($MM = 115,09 \text{ g mol}^{-1}$, pureza = 98%);
- Hidróxido de sódio (NaOH , $MM = 40,00 \text{ g mol}^{-1}$).

Também foram utilizados os materiais:

- Sal de fosfato monobásico (KH_2PO_4 , $MM = 136,09 \text{ g mol}^{-1}$, pureza 99%);
- Sal ferricianeto de potássio ($\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$, pureza 99%);
- Álcool etílico (Anidrol, teor = 95%, $MM = 46,07 \text{ g mol}^{-1}$);
- Acetona (Synth, teor = 99,5%, $MM = 58,08 \text{ g mol}^{-1}$);
- Ácido clorídrico (HCl) (Synth, teor = 36,5-38,0%, $MM = 36,46 \text{ g mol}^{-1}$);
- Peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (Synth, teor = 29,0%, $MM = 34,01 \text{ g mol}^{-1}$);
- Hidróxido de amônio (NH_4OH) (Anidrol, dosagem = 28 – 30%, $MM = 35,05 \text{ g mol}^{-1}$).

Na Figura 11 é possível observar a estrutura química dos materiais: PEI, FAD, 11-Mua e glutathiona.

Figura 11: Estrutura química do Poli(etilenoimina) (PEI), Flavina adenina dinucleotídeo (FAD), ácido 11-mercaptoundecanóico (11-Mua), glutaiona (GSH).



Fonte: Sigma-Aldrich

4.2. PREPARO DAS SOLUÇÕES

O tampão fosfato com pH 7,4 foi preparado com:

- 0,1 mol L⁻¹ de KH₂PO₄ solubilizado em água ultrapura,
- o pH foi ajustado com uma solução de 0,1 mol L⁻¹ de NaOH em água ultrapura.

As demais soluções foram preparadas com as seguintes concentrações:

- PEI: 1 mg mL⁻¹;
- FAD: 0,48 mmol L⁻¹;
- DA: 42 mmol L⁻¹ e 42 μmol L⁻¹
- EDC e NHS: 1 mg mL⁻¹.

Todas estas soluções foram solubilizadas em tampão fosfato pH 7,4.

A solução de 11-Mua foi preparada com a concentração de 5,0 mmol L⁻¹ solubilizada em álcool etílico.

4.3. SÍNTESE DAS AUNP-GS E FUNCIONALIZAÇÃO COM FAD

Para a síntese das AuNP-GS foi utilizado o procedimento descrito por Briñas *et al.* (2008): uma solução de 1 mL de HAuCl₄ a uma concentração de 0,025 mol L⁻¹ foi misturada, sob agitação, a uma solução de 7,8 mL de GSH a 0,019 mol L⁻¹. O pH foi

ajustado para 8,0 com uma solução de 1 mol L⁻¹ de NaOH e então o NaBH₄ (0,052 mol L⁻¹) foi adicionado gota a gota à solução até atingir a redução do Au e formação das nanopartículas, que é visualizada pela mudança de coloração da solução, a qual passa de translúcida para vermelho escuro.

A funcionalização da AuNP-GS com o FAD foi realizada com 720 µL de AuNP-GS, 72 µL de EDC, 72 µL de NHS; essa dispersão foi agitada por 30 minutos e, posteriormente, foram adicionados 183 µL de FAD, seguido de mais 30 minutos de agitação para funcionalização adequada (COSTA, 2017).

4.4. LIMPEZA DOS SUBSTRATOS

O substrato de quartzo utilizado para a caracterização por espectroscopia de UV-Vis e para molhabilidade, foi limpo pelo método de hidrofilição. Primeiramente os substratos foram imersos por 1 minuto em etanol e limpos com uma haste flexível, imersos por mais um minuto em água ultrapura e depois por mais um minuto em acetona e limpos com haste flexível, finalizando com imersão por 1 minuto em água ultrapura.

Após esse procedimento uma solução de (NH₄OH:H₂O₂:H₂O) nas proporções de 1:1:5 (V/V/V). Os substratos foram imersos nessa solução e aquecidos a 75° C por 10 minutos, posteriormente, foram imersos por um minuto em água ultrapura a temperatura ambiente e então imersos em uma segunda solução de (HCl:H₂O₂:H₂O) nas proporções de 1:1:6 (V/V/V) por 10 minutos e em seguida imersos por 1 minuto em água ultrapura.

Os substratos de ouro foram imersos por 30 segundos em acetona, então imersos por 30 segundos em água ultrapura, depois por 30 segundos em etanol e finalmente por mais 30 segundos em água ultrapura.

4.5. CONSTRUÇÃO DO FILME

Para a construção dos filmes foram utilizadas as técnicas de: (i) monacamada automontada (SAM, *self-assembled monolayer*) e, (ii) de camada por camada (LbL, do inglês *Layer-by-Layer*). Essas técnicas são descritas a seguir.

4.5.1. Monocamadas automontadas

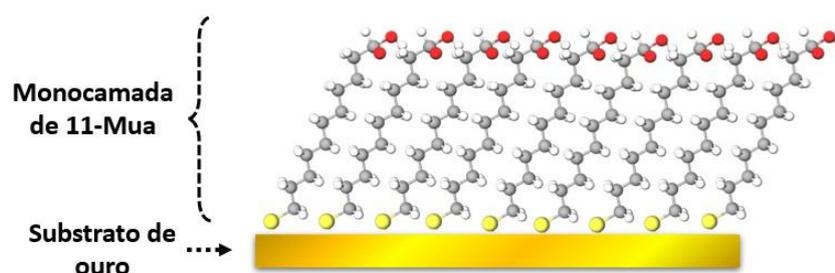
A construção de monocamadas automontadas (SAM, do inglês *self-assembled monolayer*) é um dos métodos mais conhecidos e estudados na modificação de superfícies. As SAMs são formações espontâneas de estruturas complexas sobre um

substrato sólido. A adsorção da molécula na superfície pode ocorrer pela ligação covalente de um átomo específico da molécula com a superfície. (CARVALHAL, 2005).

O grau de organização e a estabilidade da SAM serão influenciados por: (i) características do substrato, como o seu material e a rugosidade da superfície; (ii) quimissorção do grupo polar da molécula no substrato, que devem possuir grande afinidade, formando uma interação forte; (iii) o tempo de adsorção, (iv) o solvente utilizado, que deve ser capaz de solubilizar a molécula de interesse e não apresentar tendência de incorporação no sistema bidimensional (CAO, 2004).

O modelo mais utilizado na fabricação de monocamadas pelo método de SAM é baseado na interação de moléculas de tiois com um substrato de ouro. A interação da molécula ocorre via o átomo de enxofre, presente na molécula, que se liga covalentemente ao ouro. À medida que as moléculas são adsorvidas na superfície do substrato, essas se organizam homogeneamente e preferencialmente inclinadas. A organização das moléculas pode levar a um determinado ângulo de inclinação, que irá depender de características específicas da molécula como, por exemplo, o tamanho da cadeia carbônica da molécula. (SCHREIBER, 2000). A Figura 12 ilustra a formação da SAM sobre o substrato de ouro.

Figura 12: Esquema da inclinação das moléculas formadoras de SAM.



Fonte: adaptado de Schreiber, 2000.

A formação da monocamada de 11-Mua é um processo que pode ser dividido em duas etapas. A primeira é bastante rápida, ocorrendo em poucos minutos, governada pela adsorção do grupo tiol ao substrato de ouro, através de uma ligação covalente. Nesta etapa a espessura da monocamada irá atingir cerca de 80-90% de seu valor final, no entanto, a monocamada formada será desorganizada e pouco compacta. A cinética da segunda etapa é mais lenta, podendo durar várias horas, e é governada pelas interações entre as cadeias alquílicas de moléculas vizinhas, como forças de Van der Waals e dipolo-dipolo. Essas

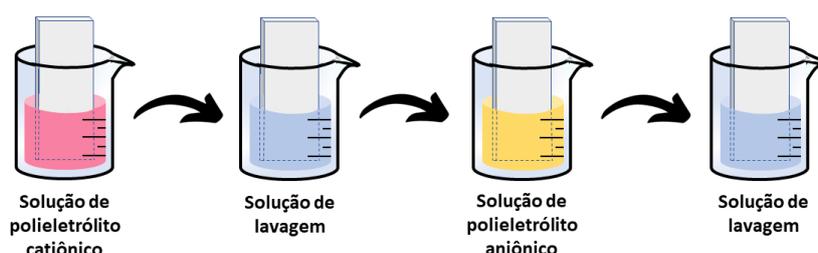
forças intermoleculares farão com que a monocamada se organize, adquirindo seu ângulo de inclinação e, expondo espaços no substrato que ainda não foram cobertos, possibilitando que novas moléculas vindas da solução possam interagir com o ouro e, então, formar uma monocamada organizada e compacta (ULMAN, 1996).

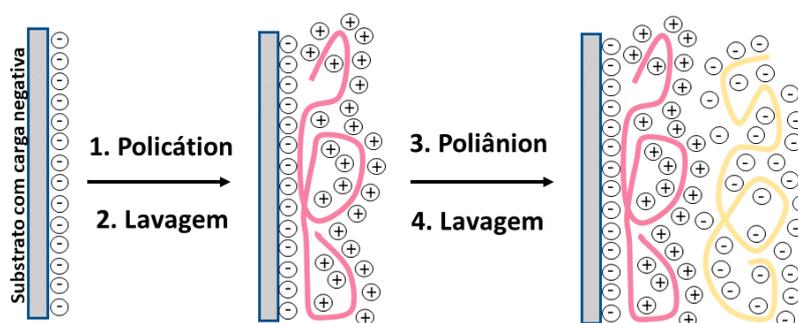
4.5.2. Técnica de fabricação de filmes camada-por-camada

A técnica de camada por camada (LbL, do inglês *layer by layer*) consiste na adsorção espontânea de moléculas contidas em uma solução via interações mais fracas, por exemplo interações de Van der Waals e eletrostáticas, que diferentemente da SAM é formada a partir de ligações covalentes entre a molécula e o substrato. O método LbL foi desenvolvido em 1992, pelos pesquisadores Decher, Hong e Schmitt e tem sido extensivamente utilizada por ser uma técnica simples, de baixo custo (DECHER; HONG; SCHMITT, 1992; DECHER, 1997).

Como mencionado anteriormente, a técnica LbL é muito simples e necessita apenas de béqueres e pinça para fabricação dos filmes. Brevemente, um substrato é imerso em uma solução contendo um polieletrólito positivo, permanecendo por um determinado período, para adsorção do material na superfície do substrato. Posteriormente, o substrato é removido desta solução e imerso em uma solução de lavagem, para remoção do excesso de material fracamente adsorvido. Ressalta-se que o processo de lavagem também evita a contaminação entre uma solução e outra. Em seguida, o substrato é imerso em outra solução de polieletrólito, de carga oposta por um determinado período, seguido do processo de lavagem. Esse procedimento pode ser repetido diversas vezes, até obter o número de camadas desejada. A Figura 13 ilustra um esquema representativo de todas as etapas de fabricação de filmes pela técnica LbL (DECHER, 1997; OLIVEIRA Jr. , 2015).

Figura 13: Esquema do procedimento da técnica LbL e da formação da camadas de polieletrólitos catiônicos e aniônicos.





Fonte: elaborado pela autora.

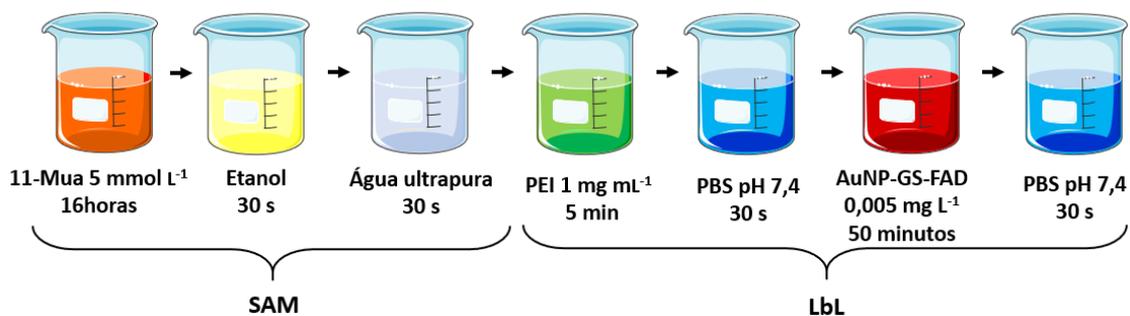
4.5.3. Construção do filme Au/11-Mua/PEI/AuNP-GS-FAD

Para formação da SAM o substrato de ouro foi imerso por 16 horas em temperatura ambiente, então lavados com etanol e água ultrapura por 30 segundos.

Para a construção da camada de PEI, a partir da técnica LbL, o substrato foi imerso em uma solução de $0,5 \text{ mg mL}^{-1}$ de PEI por 5 minutos, então lavamos em tampão fosfato pH 7,4 por 30 segundos. Os tempos de imersão na solução de 11-Mua e de PEI foram definidos com base em trabalhos anteriores do grupo de pesquisa (CAMILO et al., 2019; MIYAZAKI et al., 2016).

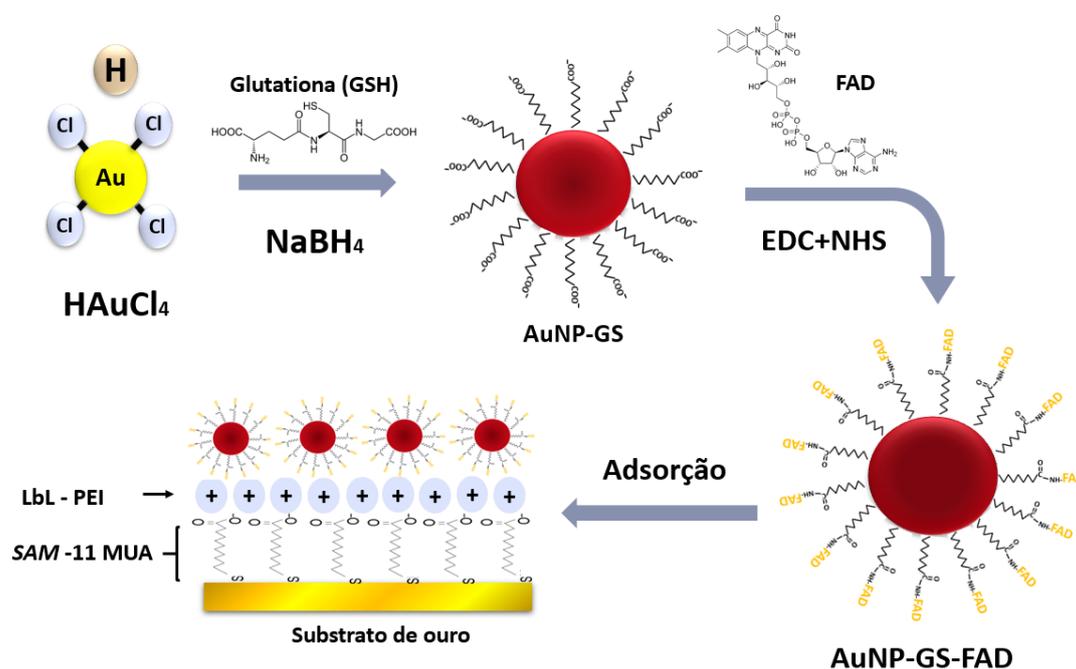
Para as bicamadas de PEI/AuNP-GS-FAD o substrato foi imerso novamente por 5 minutos na solução de PEI e lavado em tampão PBS, pH 7,4. Posteriormente o substrato foi incubado por 50 minutos na geladeira imerso na dispersão de $100 \mu\text{L}$ AuNP-GS-FAD com $700 \mu\text{L}$ de tampão fosfato pH 7,4. Por fim, o substrato foi lavado em tampão por 30 segundos (processo resumido nas Figuras 14 e 15).

Figura 14: Sequência de adsorção e lavagem do filme nanoestruturado pelas técnicas de SAM e LbL.



Fonte: Elaboradora pela autora.

Figura 15: Esquema da síntese da AuNP-GS funcionalização com FAD e arquitetura do biossensor.



Fonte: elaborado pela autora.

4.6. MÉTODOS DE CARACTERIZAÇÃO

4.6.1. Caracterização por Espectroscopia de UV-Vis

A síntese da nanopartícula e o crescimento do filme foram monitorados através da espectroscopia de UV-Vis, utilizando de um espectrofotômetro Thermo Scientific, Genesis 10uv Scanning, com resolução de comprimento de onda de 3 nm, alocado no FINEP 1, laboratório de Materiais da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), *campus* Sorocaba. Para a caracterização das soluções de AuNP-GS e do complexo AuNP-GS-FAD utilizamos uma cubeta de quartzo com caminho ótico de 10mm e substratos de quartzo para os filmes.

4.6.2. Caracterização por Espectroscopia de Fluorescência

A funcionalização das AuNP-GS com o FAD foi estudada por espectroscopia de fluorescência utilizando um espectrofluorímetro RF-5301pc, Shimadzu, alocado no FINEP 1, laboratório de Materiais na UFSCar, *campus* Sorocaba. Os parâmetros utilizados foram: (i) resolução de 0,2 nm, (ii) comprimento de onda de excitação em 260 nm, (iii) velocidade de escaneamento média, (iv) intervalo de amostragem de 0,2 nm, (v)

sensibilidade alta, (vi) faixa de comprimento de onda de 300 a 700 nm e (vii) largura de fendas de 3 nm em excitação e em emissão. Foi utilizado uma cubeta de quartzo com comprimento óptico de 10 mm.

4.6.3. Caracterização por Microscopia de Força Atômica

Foi monitorado o crescimento de cada camada do filme sobre o substrato de ouro através da medida de altura e de rugosidade, realizada em um AFM da empresa Bruker, com controlador MultiMode V e módulo picroforce, alocado no FINEP 3, no laboratório de Ciências dos Materiais na UFSCar, *campus* Sorocaba. A ponta utilizada foi uma FESPA-V2, com frequência de 75KHz, raio da ponta de 8 nm e constante de mola (K) de 2,8 N/m (dados nominais), modo contato. Essa caracterização foi feita em parceria com o laboratório de Nanoneurobiofísica, liderado pelo professor Dr. Fábio de Lima Leite.

4.6.4. Caracterização por espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)

A caracterização estrutural dos filmes foi realizada utilizando espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) Nicolet summit IR 200 FTIR em modo de reflectância, utilizando varreduras de 24,0, resolução nominal de 8,0 cm^{-1} , na faixa de 500 a 4.000 cm^{-1} . O equipamento está alocado no FINEP 1, laboratório de Materiais na UFSCar, *campus* Sorocaba.

4.6.5. Caracterização e detecção eletroquímica

A caracterização eletroquímica do filme foi realizada por VC e a atividade sensorial dos filmes foi avaliada por DPV, ambas realizadas em um potenciostato galvanostático da AutoLab modelo PGSTAT30 e software NOVA 2.1, alocado no FINEP 1, laboratório de Materiais na UFSCar, *campus* Sorocaba. Utilizamos uma célula eletroquímica com 3 eletrodos, um eletrodo de referência de calomelano, um eletrodo auxiliar de platina e um eletrodo de trabalho. O eletrólito suporte utilizado para as medidas de detecção foi o tampão PBS, pH 7,4, e para as medidas de VC foi utilizada uma solução de KCl 0,1 mol L^{-1} com 5,0 mmol L^{-1} de $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$.

4.6.6. Técnicas eletroquímicas

A eletroquímica é uma área da físico-química que estuda as reações de transferência de elétrons e a conversão de energia química em energia elétrica. Os sensores eletroquímicos são os mais difundidos na literatura, tendo uma média de mais de 4 mil artigos publicados por ano, nos últimos 5 anos (LIMA; PEREIRA; FERREIRA, 2020; LIMA et al., 2020; SILVA et al., 2019; LUCENA et al., 2018; BARROSA et al., 2017; ILKHANI; FARHAD, 2018; FERNANDES; BUENO et al., 2017; MASCAGNI et al., 2016; EGUÍLAZ et al., 2015; RUBIN et al., 2014; MOREIRA et al., 2013; FATEMI et al., 2012; PAULOVICH et al., 2011) A tabela X mostra os resultados da quantidade de artigos encontrados quando digitamos a expressão “*electrochemical sensor*” na base de dados Web of Science para cada ano.

Tabela 1: Quantidade de artigos encontrados na plataforma Web of Science para a expressão “*electrochemical sensor*” por ano nos últimos 5 anos.

Ano	Artigos
2021	2.367
2020	5.679
2019	5.430
2018	4.637
2017	4.181

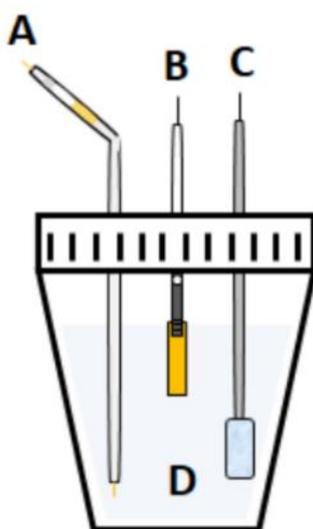
Esses sensores são maximamente utilizados por serem de baixo custo, possuírem resposta rápida, produzirem pouco resíduo em relação a métodos analíticos como a cromatografia, por exemplo, além de serem dispositivos pequenos, muitas vezes portáteis (BRETT; BRETT, 1993).

Existem várias técnicas eletroquímicas com aplicabilidade diferentes. A voltametria cíclica, por exemplo, possui grande importância para as caracterizações de eletrodos, já as técnicas mais sensíveis como a voltametria de pulso diferencial, a espectroscopia de impedância eletroquímica e a cronoamperometria são mais utilizadas como técnicas analíticas (OLIVEIRA Jr. et al., 2015).

As medidas eletroquímicas são realizadas em uma célula eletroquímica, composta por um eletrodo de trabalho (sensor específico), um eletrodo de referência, um contra-eletrodo (ou eletrodo auxiliar) e um eletrólito suporte. O de referência pode ser de

calomelano saturado (SCE), Ag/AgCl ou de hidrogênio. Essa célula é conectada ao potenciostato, que irá aplicar um potencial determinado ao eletrodo de trabalho para medir a corrente elétrica gerada pelas reações eletroquímicas que ocorrem na interface eletrodo/solução. A corrente elétrica percorre o caminho do eletrodo de trabalho para o contra-eletrodo. Já o eletrodo de referência que, como o próprio nome diz, mantém seu potencial estável para que sirva de referência para o sistema. A célula é preenchida com o eletrólito suporte, que deve possuir concentração de sais 100 vezes mais concentrado do que o analito que será analisado. Essa solução irá permitir a transferência de corrente entre os eletrodos da célula. A Figura 16 ilustra os componentes de uma célula eletroquímica (ALEIXO, 2003).

Figura 16: Esquema de uma célula eletroquímica com seus 3 eletrodos. (A) Eletrodo de referência, (B) Eletrodo de trabalho, (C) Contra-eletrodo, (D) Eletrólito suporte ou solução eletrolítica.



Fonte: Elaborado pela autora.

Os processos de oxirredução na célula eletroquímicas são regidos por 3 mecanismos: (i) transferência de massa: movimentação do analito da solução para a superfície do eletrodo, (ii) transferência de carga: transferência de elétrons na interface eletrodo/solução, (ii) reações químicas que podem preceder ou anteceder a transferência de carga (ALEIXO, 2003).

A transferência de massa pode ocorrer de 3 maneiras:

- Migração: na qual ocorre o movimento de espécies carregadas na solução que são, as quais são atraídas ou repelidas pela carga do eletrodo de trabalho. Esse processo é minimizado pela utilização de um eletrólito suporte com alta concentração de íons;
- Convecção: na qual o movimento de moléculas na solução é gerado por perturbação mecânica. A convecção é impedida quando são cessados os processos de agitação ou borbulhamento dentro da solução;
- Difusão: caracteriza-se como um processo de transferência de massa, pois se trata do movimento do analito em direção ao eletrodo de trabalho, devido à formação de um gradiente de concentração, formado pela oxidação do analito e acúmulo da forma reduzida na superfície do sensor.

O mecanismo de transferência de carga na superfície do eletrodo gera uma corrente total que pode ser dividida em duas: (i) corrente capacitiva e (ii) corrente faradaica.

A corrente faradaica é a corrente gerada especificamente pela reação redox entre o analito e o eletrodo de trabalho. A corrente capacitiva, por sua vez, é aquela utilizada para carregar a dupla camada elétrica que se forma na interface eletrodo/solução. De acordo com o modelo de Helmholtz e Gouy-chapman essa camada se forma por conta da carga do eletrodo. As moléculas na solução irão formar uma dupla camada com carga oposta à do eletrodo em sua superfície a fim de neutralizar a carga do sistema. Essa camada é bastante compacta e imóvel. Em uma solução sem agitação ela pode ter de 0,3 a 0,5 mm, enquanto que em agitação essa espessura cai para 0,01 a 0,001mm (BRETT e BRETT, 1993).

Nas técnicas voltamétricas, o sinal emitido, ou seja, a corrente elétrica resultante, é correlacionada com a concentração do analito na solução, com a vantagem de que várias substâncias podem ser detectadas juntas, desde que possuam potencial de oxidação/redução diferentes (OLIVEIRA Jr., *et al.*, 2015).

4.6.6.1. Voltametria cíclica (VC)

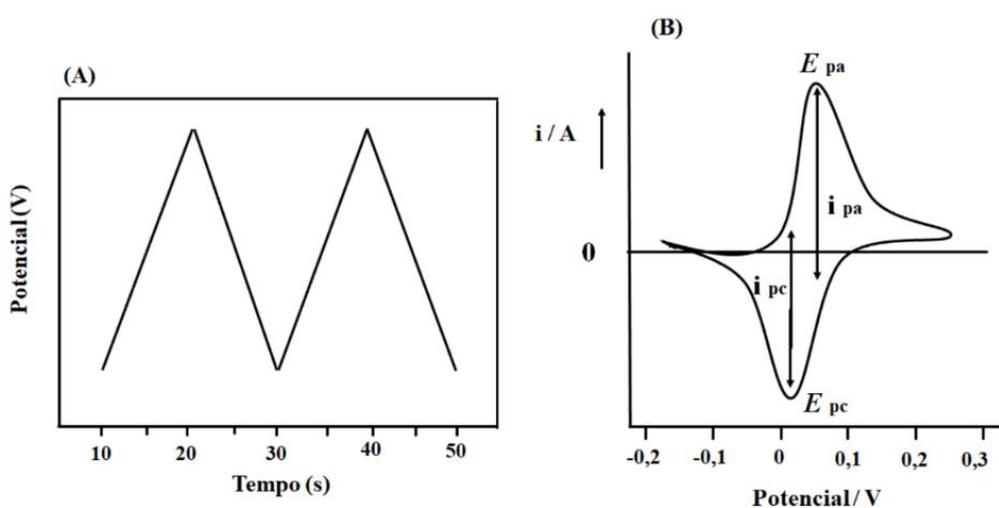
A voltametria cíclica (VC) é a principal técnica eletroquímica utilizada para obtenção de medidas qualitativas. A partir desta é possível, por exemplo, caracterizar os processos redox que ocorrem no sistema quanto a sua reversibilidade (reversível, irreversível e quase reversível), quantificar a área eletroativa do eletrodo, calcular a

constante heterogênea de transferência de elétrons (k^0) e caracterizar os potenciais de pico de oxidação/redução de um analito, entre outras informações (NICHOLSON, 1965; BRETT, 1993; PACHECO, *et al.*, 2013).

O método consiste na aplicação de um potencial inicial, no qual não ocorre nenhum processo redox, e esse potencial será alterado de maneira linear no sentido negativo (catódico), assim ocorrerá a redução do analito em solução, esse potencial continua a avançar até o momento em que não haja mais nenhuma reação redox, e finalmente, o processo retornará ao valor inicial pelo sentido contrário. Esse ciclo pode ser repetido quantas vezes forem necessários (PACHECO, *et al.*, 2013).

Os principais parâmetros extraídos de um voltamograma cíclico são: (i) E_{pa} : potencial de pico anódico, (ii) E_{pc} : potencial de pico catódico, (iii) i_{pa} : corrente de pico anódico (oxidação), (iv) i_{pc} : corrente de pico catódico (redução), (v) ΔE_p : diferença entre o E_{pa} e E_{pc} . Esses serão utilizados posteriormente para a caracterização dos processos redox na superfície do eletrodo e para calcular a área eletroativa do biossensor, além de comparar o desempenho eletroquímico de cada uma das etapas de modificação do substrato. A Figura 17 ilustra o gráfico representativo da aplicação do potencial com varredura em função linear na VC e o voltamograma cíclico típico obtido para um processo redox reversível (SOUZA, 2011).

Figura 17: (A) Gráfico representativo da aplicação do potencial com varredura linear em função do tempo. (B) Voltamograma típico obtido para um processo redox reversível.



Fonte: Adaptado de Pacheco, 2013.

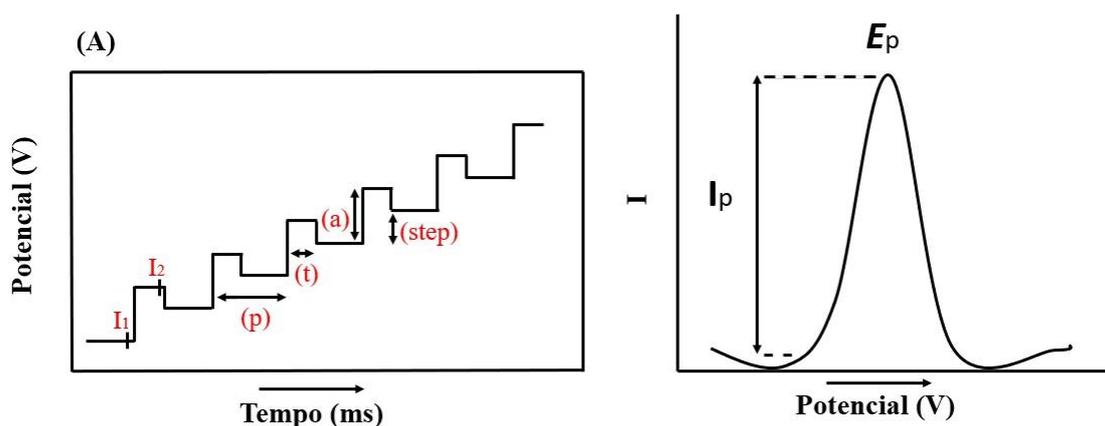
4.6.6.2. Voltametria de pulso diferencial (DPV)

A voltametria de pulso diferencial (DPV, do inglês *differential pulse voltammetry*) também inicia em um potencial onde não há qualquer reação redox do analito em solução. Entretanto, neste método, o potencial irá variar em pulsos, na forma de degraus, e a medida de corrente é feita duas vezes, uma antes da aplicação do pulso (I_1) e outra no final do pulso (I_2), e por fim, a primeira medida é subtraída da segunda (BARD; FAULKNER, 2001).

O mecanismo de voltametria de pulso faz com que a corrente capacitiva (variação da carga na dupla camada elétrica do eletrodo de trabalho (i_c)) seja extinguida de maneira mais rápida que a corrente faradaica (corrente resultante da interação entre o eletrodo e o analito (i_f)). Dessa forma a DPV se torna mais sensível e mais adequada a medidas quantitativas do que a voltametria cíclica (BARD; FAULKNER, 2001).

Os parâmetros que devem ser otimizados na DPV são os seguintes: amplitude de modulação (a), incremento de varredura ($step$), tempo de aplicação do potencial (t), período (p). A aplicação do potencial na DPV pode ser melhor interpretada a partir da Figura 18(A).

Figura 18: Gráficos de: (A) potencial aplicado em função do tempo em uma voltametria de pulso diferencial e, (B) parâmetros obtidos a partir de um voltamograma de pulso diferencial.



No voltamograma da DPV é possível observar o potencial de pico (E_p) e a corrente de pico (I_p). O E_p é característico do analito estudado, mas também das condições circundantes, como o pH, a temperatura, a natureza do eletrólito suporte e do eletrodo de trabalho. Já a corrente pode ser relacionada com a concentração do analito na solução,

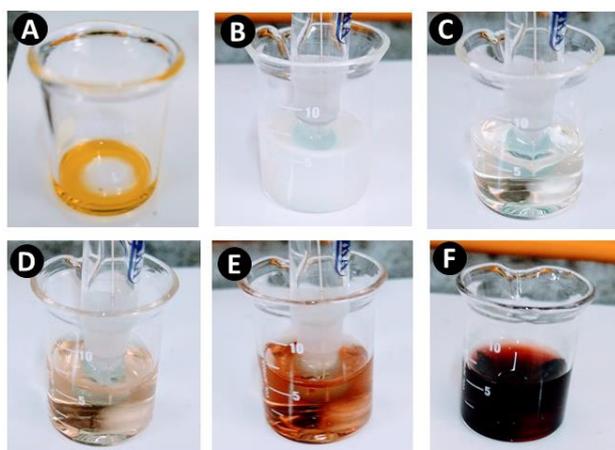
sendo a intensidade de corrente ou área total do pico proporcional à concentração das espécies oxidadas ou reduzidas na interface do eletrodo (PACHECO et al., 2013).

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1. CARACTERIZAÇÃO POR ESPECTROSCOPIA DE UV-VIS

As AuNPs foram sintetizadas em pH 8,0 de acordo com Briñas et al. (2008). Após a adição da GSH ao HAuCl_4 a solução torna-se esbranquiçada (Figura 19 b), resultado da complexação dos íons de Au^{3+} com a GSH, através do seu grupo tiol que forma uma ligação estável com o ouro. O ajuste do pH de 3,0 para 8,0, realizado com a solução do NaOH ($1,0 \text{ mol L}^{-1}$), torna a solução translúcida (Figura 19 c), pois o aumento do pH diminui o tamanho dos polímeros formados pelas moléculas de GSH. Por fim após a adição do NaBH_4 a solução torna-se vermelho escuro, pela formação das nanopartículas de ouro (Figura 19 d-f). As mudanças na coloração da solução durante a síntese das AuNPs podem ser observadas na Figura 19.

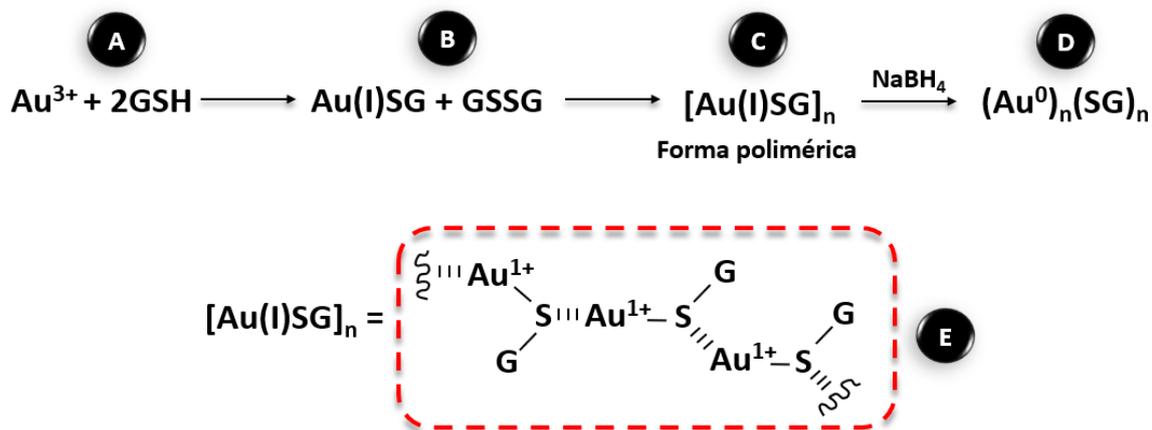
Figura 19: Fotos da síntese das AuNPs. (A) HAuCl_4 em água. (B) HAuCl_4 com GSH em pH 2,5. (C) HAuCl_4 com GSH em pH 8,0. (D), (E) e (F) formação das AuNPs-GS após adição de borohidreto.



O processo de formação das AuNP-GS está descrito na Figura 20. Primeiramente o Au^{3+} se associa a duas moléculas de GSH através dos átomos de enxofre e é reduzido à Au^{1+} (A) e (B), então é formada uma estrutura polimérica (C) e (D) entre o Au^{1+} e as moléculas de GSH. O tamanho das estruturas poliméricas é dependente do pH como resultado das forças de repulsão entre os polímeros, essa força é menor em valores de pH menores, por esse motivo AuNP sintetizadas em pH menores são de tamanhos maior. Por

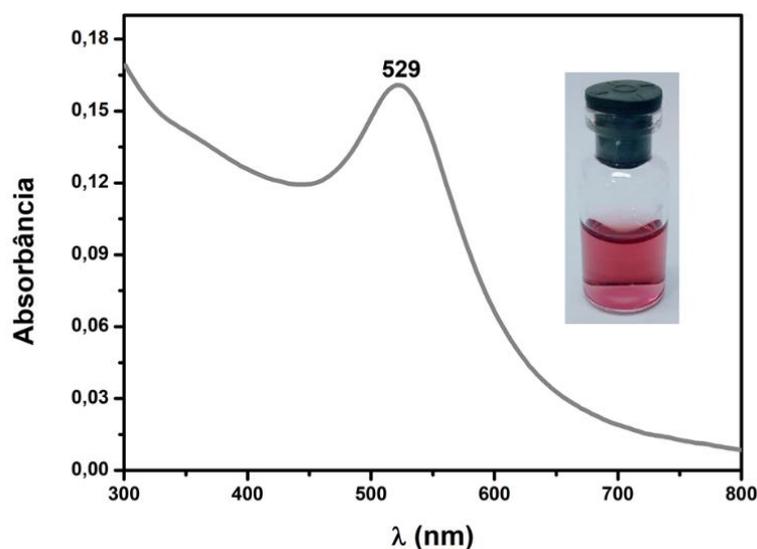
fim a adição do NaBH_4 reduz o ouro Au^{1+} a Au^0 e são formadas as nanopartículas com tamanhos controlados (D) (BRINÑAS et al., 2008).

Figura 20: Esquema da formação das AuNP-GS pela associação de Au^{3+} com GSH e redução por NaBH_4 .



A caracterização por espectroscopia de UV-Vis foi utilizada para investigar as propriedades ópticas das AuNP-GS. Conforme mostrado na Figura 21, as AuNP-GS apresentam uma banda absorvância em 529 nm atribuída a banda LSPR característica das AuNPs (AMENDOLA; MENEGHETTI, 2009; JENCY et al., 2018; MORAWSKI et al., 2021).

Figura 21: Espectro de absorbância UV-Vis da dispersão de AuNP-GS (30 mg L^{-1}) em água ultrapura sintetizadas em pH 8,0.

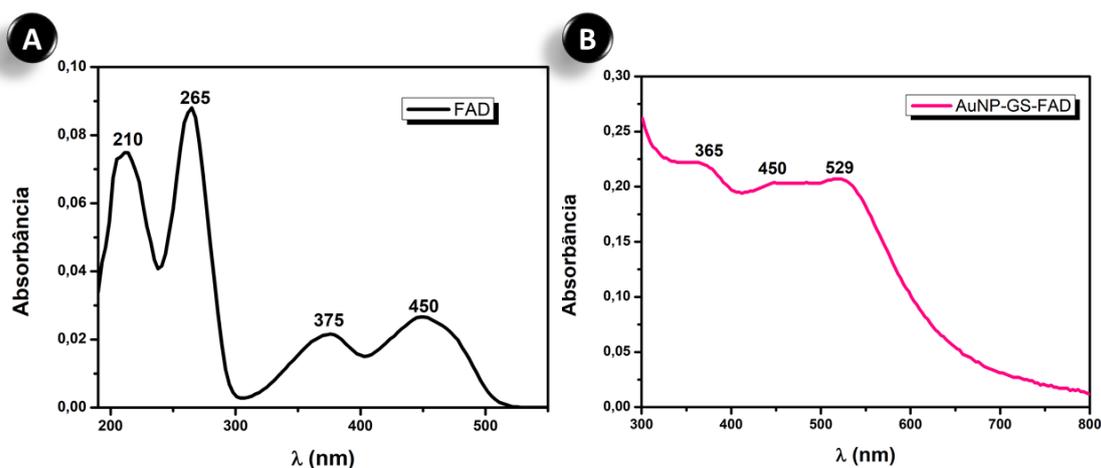


As AuNPs-GS foram armazenadas na geladeira em frasco âmbar por 3 meses. O controle da estabilidade foi realizado por espectroscopia de UV-Vis. Essa estabilidade é resultante da associação com a GSH que protege as AuNPs de formar agregados. A GSH possui dois grupos carboxila ($-\text{COOH}$) e um amina ($-\text{NH}_2$) em sua estrutura, o que fornece uma interface hidrofílica às AuNPs (CHAI et al., 2010).

A Figura 22 ilustra os espectros de absorção do FAD: 1 mmol L^{-1} e das AuNP-GS funcionalizadas com FAD (*inset*). As soluções foram feitas em tampão PBS $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 7,4. O espectro mostra que o FAD possui 4 bandas de absorbância, sendo elas em 210 e 265 nm características da isoaloxazina, um cromóforo fortemente amarelo, e as bandas em 375 e 450 nm, que indicam que o FAD se encontra na forma oxidada em pH 7,4 (MALINOWSKI, et al., 2007).

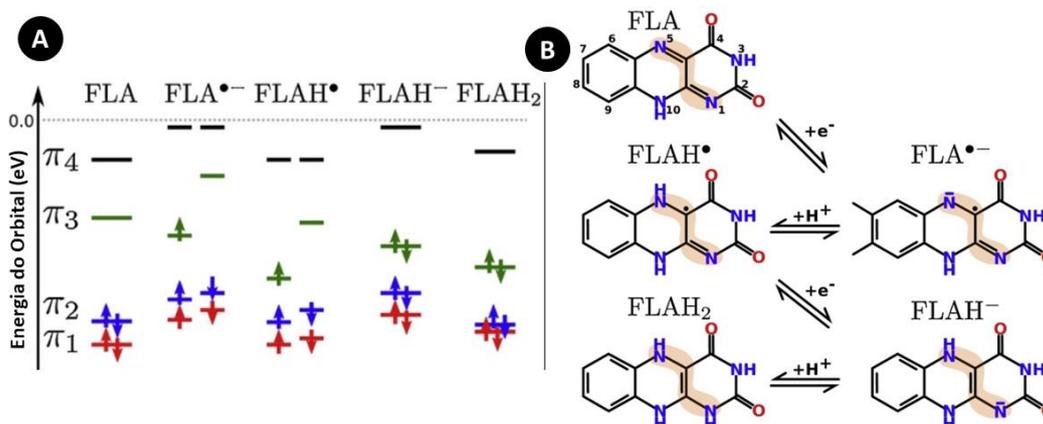
Após a funcionalização das AuNP-GS com EDC/NHS e FAD, foram identificadas as bandas de absorbância em 365 e 450 nm atribuídas ao estado oxidado do FAD, como pode ser observado na Figura 22(b). A banda em 375 nm característica do FAD livre sofreu um deslocamento de 10 nm para a região do azul após a imobilização do FAD sobre as AuNP-GS. Um deslocamento semelhante foi observado por Voicescu et al. (2021) durante a ancoragem do FAD sobre Dextran 70 e fosfatidilcolina. Esse deslocamento, portanto, indica que a ancoragem do FAD nas AuNP-GS foi bem sucedida. Não foi observado deslocamento na banda em 450 nm.

Figura 22: (a) Espectros de absorção UV-Vis do FAD: 1 mmol L^{-1} (linha amarela). (b) UV-Vis das AuNP-GS-FAD.



A forma oxidada do FAD possui 2 orbitais π totalmente preenchidos na banda de valência. A banda de condução do FAD é ocupada pelos orbitais antiligantes π_3 e π_4 , como ilustrado pela Figura 23(a). À medida que o FAD é reduzido à FADH₂, o orbital π_3 é preenchido com 2 elétrons. A Figura 23(b) ilustra a mudança na estrutura dos centros $N_5 = C_{4a}$ (ligação imina) e ligação entre $C_{4a} - C_{1a}$ (ligação de etileno) do anel isoaloxazina (MONDAL; SCHWINN; HUIX-ROTLLANT, 2020).

Figura 23: Exemplificação dos estados de energia de acordo com o estado de oxidação do anel isoaloxazina do FAD. (a) estado de energia dos elétrons nos orbitais π do anel isoaloxazina do FAD, (b) estrutura do anel de isoaloxazina do FAD de acordo com os estados de oxidação.

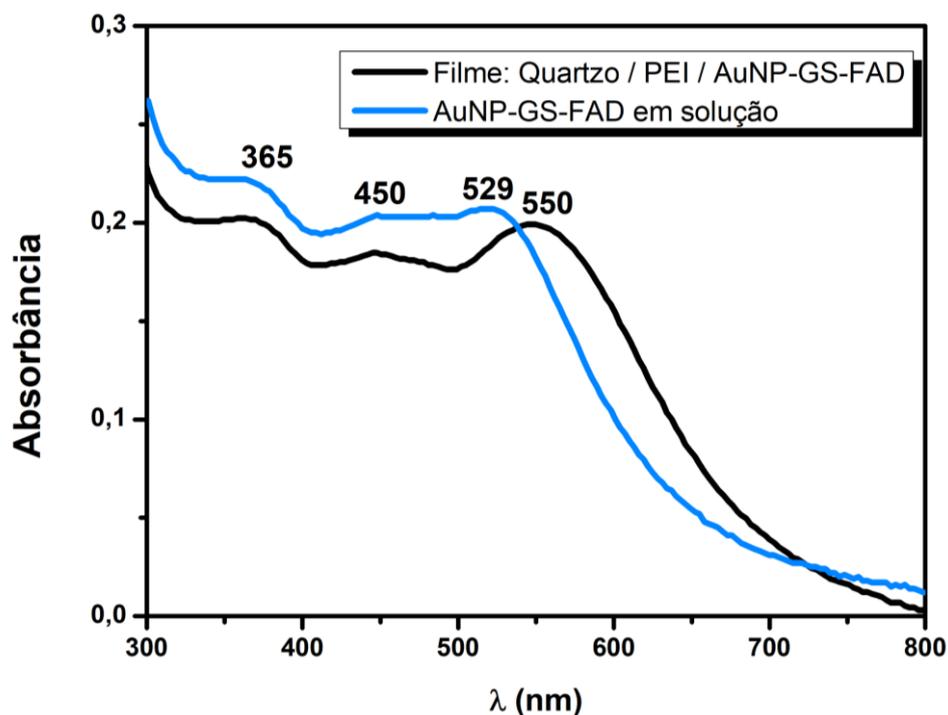


Fonte: Adaptado de (MONDAL; SCHWINN; HUIX-ROTLLANT, 2020).

As AuNP-GS e AuNP-GS-FAD foram testadas ao longo do trabalho como sensores colorimétricos para DA através da análise por UV-V, no entanto não foi possível observar alteração no espectro de absorbância a medida que a DA era adicionada, por esse motivo endossamos a importância da aplicação em sensor eletroquímico da que a arquitetura desenvolvida.

A fim de estudar as propriedades ópticas do filme construído com as AuNP-GS-FAD, foram depositadas sobre um substrato de quartzo uma camada de PEI e uma de AuNP-GS-FAD, seguindo o protocolo descrito na seção 4.5.3. Na Figura 24 é possível observar o espectro de absorbância do filme com as bandas em 365 e 450nm características do FAD e a banda de LSPR em 550 nm das AuNP-GS. Nesta mesma Figura está normalizado o espectro de absorbância das AuNP-GS-FAD em solução. As AuNPs-GS-FAD aderidas à superfície sólida tiveram sua banda LSPR deslocada em 21 nm, de 529 para 550 nm. Tal deslocamento é característico da formação de agregados de AuNPs que apresentam comprimento de onda de absorbância maiores e um alargamento da banda, ambos dependentes da distância entre as partículas que formam o agregado. A intensidade e a posição da absorbância máxima refletem a extensão da agregação, resultante do acoplamento de plasmons de superfície entre partículas próximas (HRAPOVIC et al., 2003; FREDERIX et al., 2003). Ressalta-se que a fabricação do filme foi realizada em duplicata.

Figura 24: Espectro de absorção de UV-Vis do filme na arquitetura: quartzo/PEI/AuNP-GS-FAD.

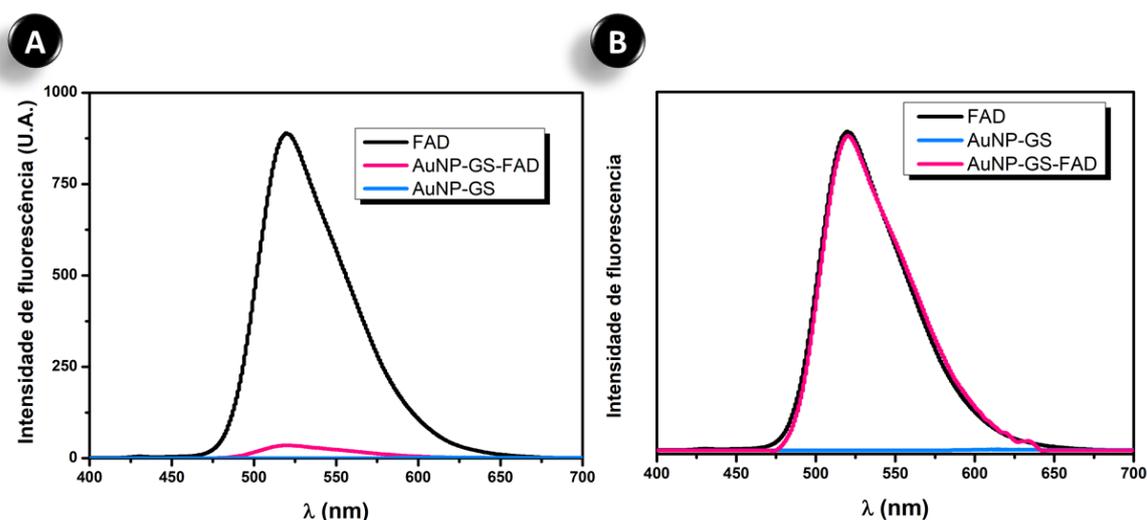


5.2. CARACTERIZAÇÃO POR ESPECTROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA

As flavinas possuem uma fluorescência intrínseca, relacionada a sua capacidade de excitação próximo ao comprimento de onda em 365 nm. Essa fluorescência atinge seu máximo na forma neutra dos três estados de oxidação, sendo que a forma catiônica é praticamente não fluorescente. Tendo em vista que a forma neutra é a encontrada no pH fisiológico, a fluorescência do FAD é de interesse no monitoramento de processos oxidativos (DRÖSSLER, HOLZER, PENZKOFER, 2002).

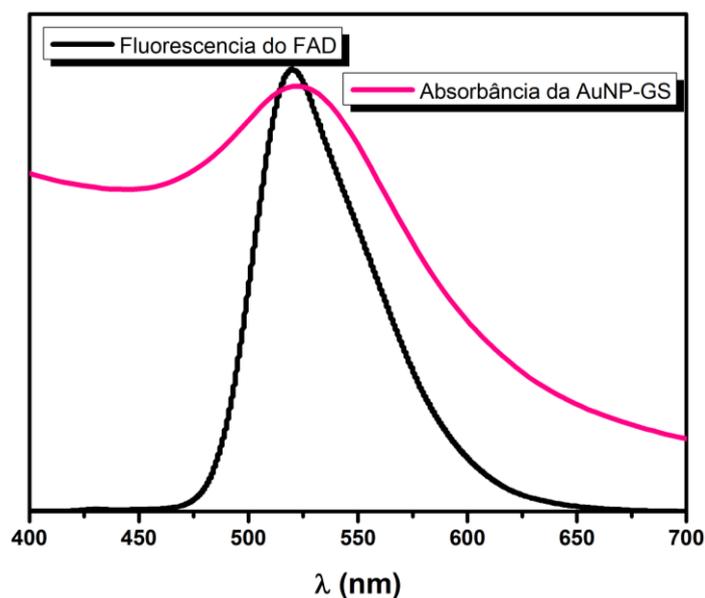
A Figura 25 apresenta espectro de fluorescência da solução de FAD: $0,48 \text{ mmol L}^{-1}$ (linha preta), suspensão de AuNP-GS (linha rosa) e suspensão de AuNP-GS-FAD (linha azul) com comprimento de onda de excitação 260 nm, todos os experimentos foram realizados em solução aquosa ($62,0 \text{ mg L}^{-1}$).

Figura 25: Espectros de emissão de fluorescência pelas suspensões de FAD (linha preta), AuNP-GS-FAD (linha rosa) e AuNP-GS (linha azul) (A). Espectros de fluorescência normalizados (B). Todas as suspensões foram feitas em água ultrapura, pH ~ 6,0.



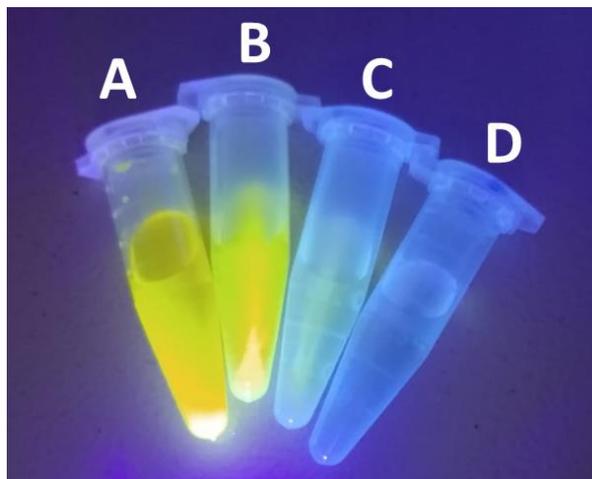
Assim como esperado a suspensão de AuNP-GS não apresentou emissão de fluorescência. A solução de FAD possui alta fluorescência, com intensidade próxima a 900 U.A. (unidades arbitrárias), já a suspensão de AuNP-GS-FAD apresentou fluorescência muito menor (~40 U.A.). A diminuição na fluorescência AuNP-GS-FAD em relação ao FAD livre pode ser explicada pela diminuição significativa. Esse processo pode ocorrer por 3 mecanismos, a desativação colisional, a transferência de elétrons e transferência de energia de ressonância. Segundo a teoria de Forster a transferência de energia ocorre se o doador e acceptor de energia estiverem próximos o suficiente, com no máximo 9 nm de distância, e se os fótons emitidos pelo estado excitado do doador puderem ser absorvidos diretamente pelo acceptor. O primeiro requisito é atendido quando existe uma ligação covalente entre o acceptor e doador e o segundo quando o espectro de emissão de fluorescência da molécula doadora de energia se sobrepõe ao espectro de absorvância da molécula acceptora (ATKINS; PAULA, 2006). O espectro de emissão do FAD é de 520 nm e o de absorvância das AuNP-GS de 529 nm. Fica claro que os dois requisitos estão sendo atendidos para gerar a redução de fluorescência do FAD no conjugado AuNP-GS-FAD o que indica que a funcionalização das nanopartículas foi bem sucedida. A sobreposição dos espectros de fluorescência do FAD e absorvância das AuNP-GS está apresentada na Figura 26.

Figura 26: Sobreposição do espectro de fluorescência do FAD e espectro de absorvância das AuNP-GS.



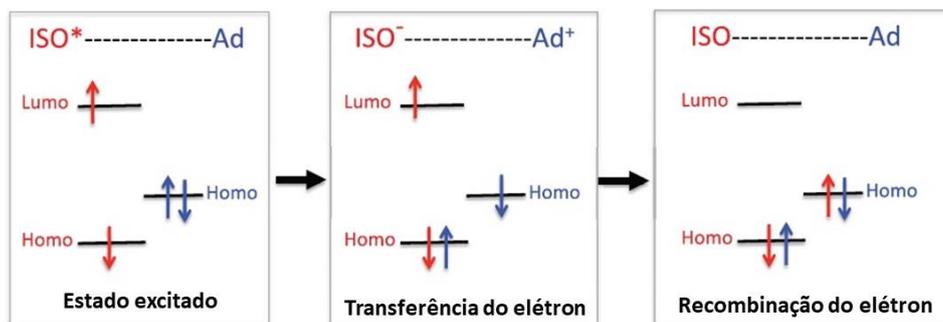
A banda intensa de emissão de luz do FAD é caracterizada pela presença da isoaloxazina. O espectro de emissão do FAD indica o estado que ele se encontra, pois em seu estado oxidado possui um pico de emissão de 520 nm, enquanto quando reduzido o espectro é deslocado para valores menores, e fica próximo a 450 nm (GALBÁN, *et al.*, 2016). Dessa forma, com o pico de 520 nm, é possível observar no espectro normalizado apresentada na Figura 26 (b) que não houve deslocamento no espectro de emissão de fluorescência das AuNP-GS-FAD, indicando que mesmo associado à AuNP-GS o FAD continua em seu estado oxidado. A Figura 27 é uma foto da fluorescência do FAD em 4 concentrações diferentes (a) $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, (b) $0,01 \text{ mol L}^{-1}$, (c) $0,001 \text{ mol L}^{-1}$, (d) $0,0001 \text{ mol L}^{-1}$, iluminadas com uma luz ultravioleta. O espectro de fluorescência do FAD apresentado na Figura 25 é equivalente à concentração de $0,01 \text{ mol L}^{-1}$.

Figura 27: Foto das soluções de FAD nas concentrações de $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (a), $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ (b), $0,001 \text{ mol L}^{-1}$ (c), $0,0001 \text{ mol L}^{-1}$ (d).



Durante a emissão de luz sobre a molécula do FAD os elétrons presentes na isoaloxazina são excitados e passam para um estado vibracional de maior energia, ou seja, o elétron é transferido do orbital HOMO para o LUMO. Neste momento há transferência de elétrons da adenina para a isoaloxazina, a fim de estabilizar o orbital com elétrons faltantes o elétron excitado que anteriormente era da isoaloxazina decai de forma radioativa para o orbital da adenina, processo exemplificado na Figura 28 (GALBÁN, *et al.*, 2016). Como nem toda energia absorvida pelo elétron decai na forma radioativa, um pouco é perdido na forma de calor e o comprimento de onda da emissão de fluorescência é maior do que o de absorção. A diferença entre eles é conhecida como deslocamento Stokes (ESNAL, *et al.*, 2012 *apud* NUNES, 2019, p. 3), que neste caso foi de 260 nm. A maioria das moléculas absorvem luz no ultravioleta, mas algumas possuem um deslocamento Stokes muito pequeno, com emissão de fluorescência muito próximo ao comprimento de onda de absorção. Esse comportamento dificulta a detecção de fluorescência (ATKINS; PAULA, 2006; PAVONI; *et al.*, 2014).

Figura 28: Ilustração da transferência redutiva de elétrons foto-induzida em FAD aquoso. Em vermelho, os elétrons que inicialmente pertenciam para isoaloxazina (Iso); em azul, elétrons que pertenciam inicialmente à adenina (Ad).

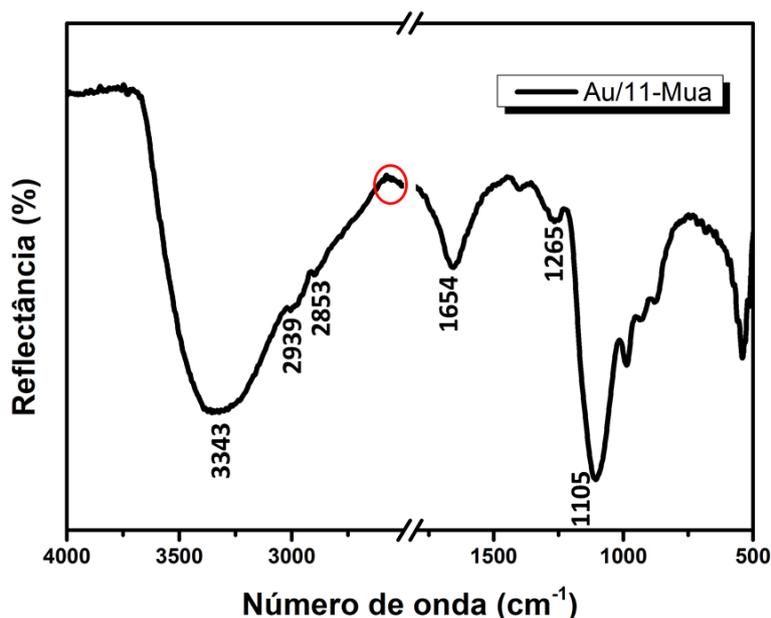


Fonte: Galbán, *et al.* (2016).

5.3. CARACTERIZAÇÃO POR ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO POR TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR)

Com o objetivo de identificar as características estruturais quanto aos grupos funcionais e ligações químicas presentes no biossensor, foi realizada a caracterização por FTIR dos diferentes materiais que compõem a arquitetura do dispositivo bem como de sua composição completa. Todas as etapas de caracterização foram realizadas no substrato de ouro. A monocamada de 11-Mua bem como a do biossensor completo foram construídas com a mesma metodologia da apresentada na seção 4.5.3. Para a caracterização dos demais materiais foi utilizada a técnica de *casting* (espalhamento de uma da solução sobre o substrato). A Figura 29 apresenta os espectros de FTIR para o 11-Mua.

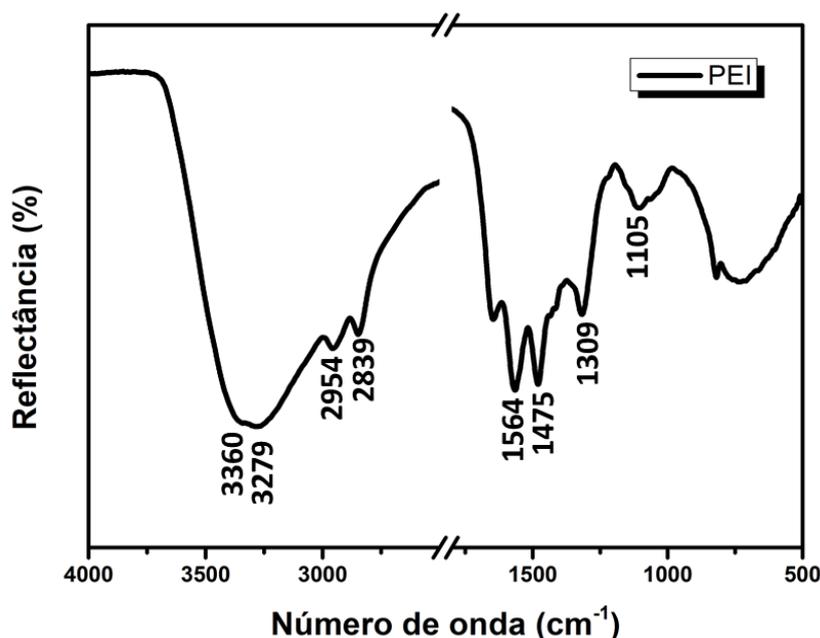
Figura 29: Espectro FTIR da monocamada de 11-Mua sobre o substrato de ouro.



É possível observar na Figura 29 uma banda larga em 3343 cm^{-1} referente ao estiramento -OH, característico da umidade presente na amostra. Em 2939 e 2852 cm^{-1} há duas bandas discretas atribuídas aos estiramentos assimétrico e simétrico de CH_2 respectivamente, referentes à cadeia alquila do 11-Mua. Uma banda bem definida em 1654 cm^{-1} é associada à ligação $\text{C}=\text{O}$ e uma banda menor em 1265 cm^{-1} é atribuída ao estiramento simétrico do grupo COO^- . Quando não está associado fortemente ao ouro o 11-Mua possui uma banda menor em 2527 cm^{-1} característica do grupo -SH. A ausência dessa banda no espectro da Figura 29 (região circunscrita em vermelho) demonstra a formação de uma ligação entre o S e o substrato de ouro (BHADRA et al., 2015).

A Figura 30 ilustra do espectro de FTIR do PEI. Neste espectro é evidente a presença de uma banda larga em $3360\text{-}3279\text{ cm}^{-1}$ atribuída ao estiramento O-H e N-H respectivamente, referentes à umidade existente na amostra e aos grupos amina da estrutura do PEI, uma banda em 2954 e uma em 2839 cm^{-1} características dos estiramentos assimétrico e simétrico dos grupos CH_2 . A banda de intensidade média em 1475 cm^{-1} é atribuída à ligação C-H. As bandas em 1309 cm^{-1} e em 1105 cm^{-1} correspondem ao estiramento das aminas presentes na amostra. Também é possível observar uma banda bem definida em 1564 cm^{-1} atribuída à ligação N-H (HUANG et al., 2014; PAPAVALU et al., 2017; XU et al., 2017).

Figura 30: Espectro FTIR do polieletrólito PEI, solução de 1 mg mL^{-1} , sobre o substrato de ouro.

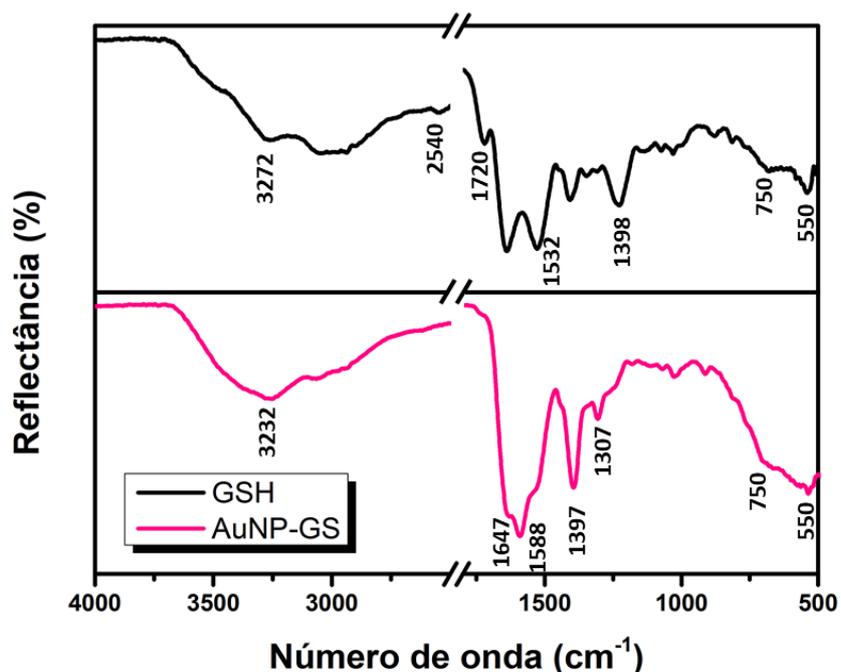


A caracterização por FTIR da GSH e das AuNP-GS está apresentada na Figura 31. O espectro da GSH possui uma banda larga em 3272 cm^{-1} associada a vibração de estiramento -OH e -NH, referentes à umidade presente na amostra e aos grupos amina da estrutura da GSH. Uma pequena banda em 2540 cm^{-1} é atribuída ao modo de estiramento -SH que desaparece no espectro da AuNP-GS indicando a desprotonação do grupo tiol da GSH e sua subsequente ligação nas AuNPs por meio do átomo de S (SILVER et al., 1985). Uma banda discreta em 1720 cm^{-1} é associada ao estiramento -C=O do grupo COOH e também está ausente no espectro da AuNP-GS, o que indica a desprotonação do grupo carbonila de GSH (BASU et al., 2007). As duas bandas bem definidas em 1532 e 1398 cm^{-1} são atribuídas aos modos de estiramento simétrico e assimétrico do grupo -COO respectivamente. Por fim as duas bandas em 750 e 550 cm^{-1} são atribuídas à vibração de estiramento -C-S cm^{-1} presente na cisteamina que é um aminoácido dentro do peptídeo GSH (BECHERI et al., 2007; JENCY et al., 2018).

A banda larga de reflectância em 3349 cm^{-1} é atribuída à vibração O-H da umidade presente na amostra. As bandas em 1588 e 1397 cm^{-1} correspondem ao modo simétrico e assimétrico de estiramento COO^- da glutatona, respectivamente, que foram deslocadas devido à ligação entre GSH e AuNP, enquanto as bandas em 1309 e 1029 cm^{-1} representam a adesão da GSH sob as AuNPs. Por fim, as bandas em 750 e 550 cm^{-1}

tornam-se mais intensas devido à coordenação da GSH em associação com as AuNPs. Portanto, as características do espectro FTIR confirmam a ligação bem sucedida da GSH na superfície das AuNPs (JENCY et al., 2018).

Figura 31: Espectro FTIR da GSH e das AuNP-GS sobre o substrato de ouro.



A Figura 32 apresenta os espectros de reflectância FTIR do FAD e das AuNP-GS-FAD. O FAD possui muitas bandas características devido à sua complexa estrutura química, composta de muitos grupos funcionais. Sendo as bandas mais intensas a de 3381 cm^{-1} atribuída ao estiramento O-H e N-H, a em 1654 cm^{-1} característica do estiramento C=N do anel da adenina, em 1545 cm^{-1} associada ao estiramento C-N do anel da isoaloxazina, em 1249 cm^{-1} atribuída ao estiramento assimétrico do grupo PO_2 e estiramento C-N e C- CH_3 e a banda em 1079 cm^{-1} atribuída à flexão C-H (UEDA; KOBAYASHI, 2004; DELFINO et al., 2017; VARGAS et al., 2019). A atribuição de todas as bandas do FAD está na Tabela 1 .

Figura 32: Espectro FTIR do FAD e das AuNP-GS-FAD sobre o substrato de ouro.

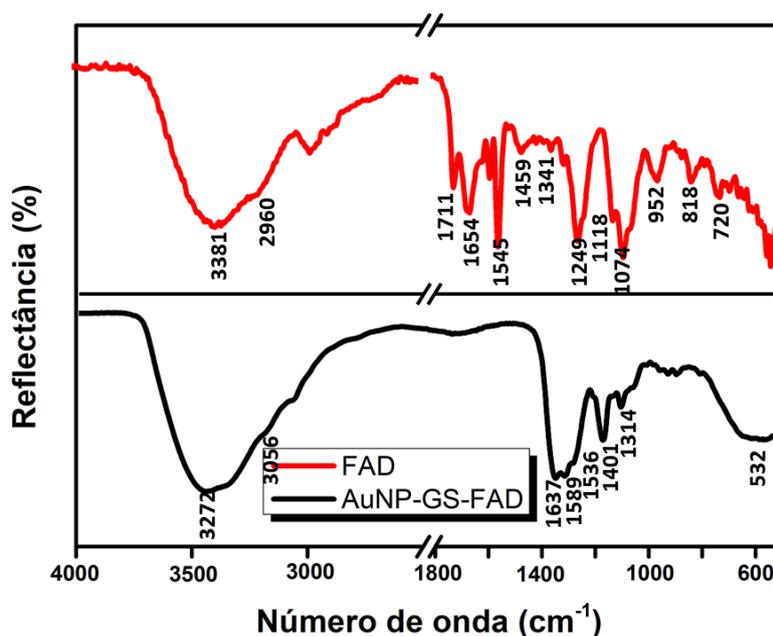


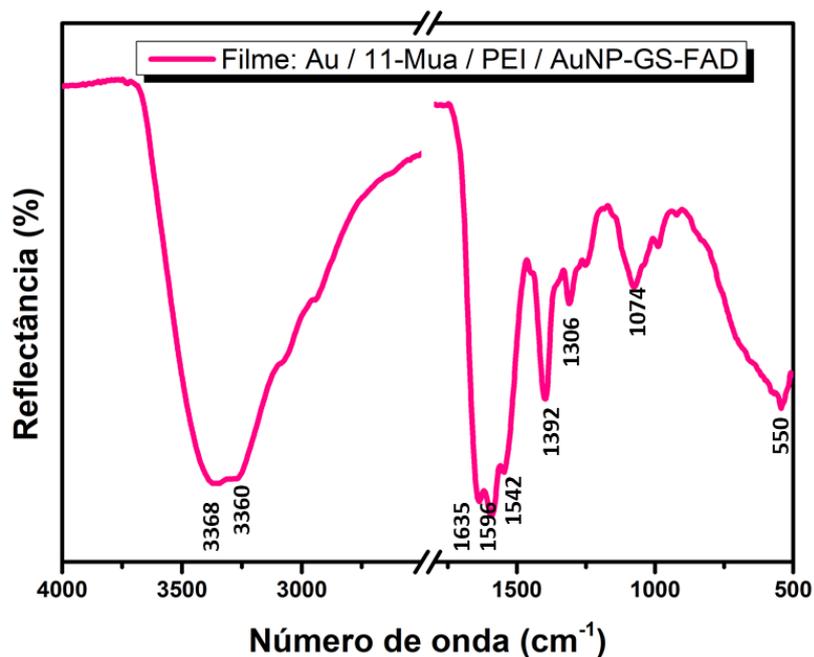
Tabela 2: Atribuição das bandas do espectro FTIR do FAD.

Número de onda	Atribuição
3381 cm ⁻¹	Estiramento -OH, -CH e -NH
2960 cm ⁻¹	Estiramento simétrico de -CN
1711 cm ⁻¹	Estiramento C=O
1654 cm ⁻¹	Estiramento C=N do anel adenina
1577 cm ⁻¹	Estiramento C=C e C=N dos anéis de adenine e isoaloxazina
1545 cm ⁻¹	Estiramento C-N do anel isoaloxazina
1459 cm ⁻¹	Estiramento C-N do anel isoaloxazina
1341 cm ⁻¹	Estiramento C-C e C-N
1249 cm ⁻¹	Estiramento assimétrico de PO ₂ e estiramento -CN e C-CH ₃
1118 cm ⁻¹	Estiramento simétrico PO ₂ ⁻
1074 cm ⁻¹	Flexão -CH
955 cm ⁻¹	Dobra -CH ₃
818 cm ⁻¹	Estiramento C-C e flexão C-N-C
720 cm ⁻¹	Estiramento CH ₃ e curvatura C=O

O espectro de refletância FTIR das AuNP-GS-FAD, também apresentado na Figura 32, exhibe bandas características da GSH e do FAD. A banda larga em 3345 cm^{-1} é atribuída à vibração OH e estiramento N-H, uma banda discreta em 2935 cm^{-1} está associada ao estiramento simétrico e ligação -CH da estrutura do FAD, a banda intensa em 1637 cm^{-1} é característico do estiramento C=N do anel adenina do FAD, outra banda com a mesma intensidade em 1589 cm^{-1} é referente ao estiramento C=C e C=N dos anéis adenina e isoaloxazina do FAD. As bandas em 1536 e 1401 cm^{-1} são atribuídos aos modos assimétrico e simétrico da GSH, respectivamente, a banda em 1536 cm^{-1} também é associado ao estiramento -CN do anel isoaloxazina do FAD, a banda 1314 cm^{-1} é atribuída ao estiramento C-C e C-N do FAD, a banda larga dentro da faixa de 716 e 586 cm^{-1} é referente à vibração CS da GSH e ao estiramento CH_3 e curvatura C=O do FAD. A presença de bandas associadas à GSH e ao FAD nesse espectro confirma a funcionalização das AuNP-GS com o FAD (UEDA; KOBAYASHI, 2004; DELFINO et al., 2017; VARGAS et al., 2019).

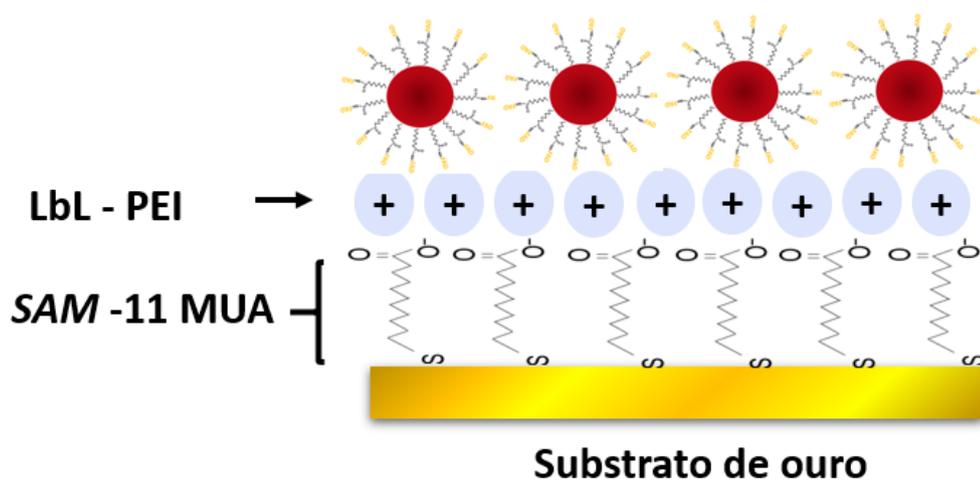
A Figura 33 apresenta o espectro de reflectância FTIR do filme Au/11-Mua/PEI/AuNP-GS-FAD. É possível observar uma banda intensa em 3368 e 3360 cm^{-1} , referente ao estiramento N-H da estrutura do FAD. Uma banda intensa em 1635 cm^{-1} é atribuída ao estiramento C=O e C=N do anel isoaloxazina do FAD e do 11-Mua e ao balanço das aminas presentes na estrutura do PEI, o aumento dessa banda demonstra que ambos os materiais estão contribuindo com o espectro. A banda intensa em 1596 cm^{-1} refere-se ao estiramento C=C e C=N do anel adenina e isoaloxazina do FAD. A intensa banda em 1542 cm^{-1} é atribuída ao estiramento C-N do anel isoaloxazina do FAD. Uma banda bem definida em 1392 cm^{-1} é referente ao estiramento assimétrico do grupo COO- da GSH. Uma banda discreta em 1309 cm^{-1} corresponde ao estiramento C-H do PEI. A banda em 1074 cm^{-1} é característica da flexão C-H do FAD. Por fim uma banda intensa em 550 cm^{-1} é atribuída à vibração de estiramento C-S da GSH e ao estiramento CH_3 e curvatura C=O do FAD. A presença de bandas referentes a todos os materiais utilizados neste espectro confirma que a construção do filme através da metodologia utilizada foi bem sucedida (SILVERTEIN; WEBSTER; KIEMLE, 2005).

Figura 33: Espectro FTIR do filme: Au/11-Mua/PEI/AuNP-GS-FAD.



A Figura 34 ilustra a construção do filme. Entre o ouro e o 11-Mua há a formação de ligações covalentes entre o grupo tiol e o ouro, já a formação das camadas de PEI e AuNP-GS-FAD ocorre por interações eletrostáticas devido a atração existente entre os materiais de cargas opostas.

Figura 34: Esquema representativo conclusivo das interações que ocorrem no filme: Au/11-Mua/PEI/AuNP-GS-FAD.



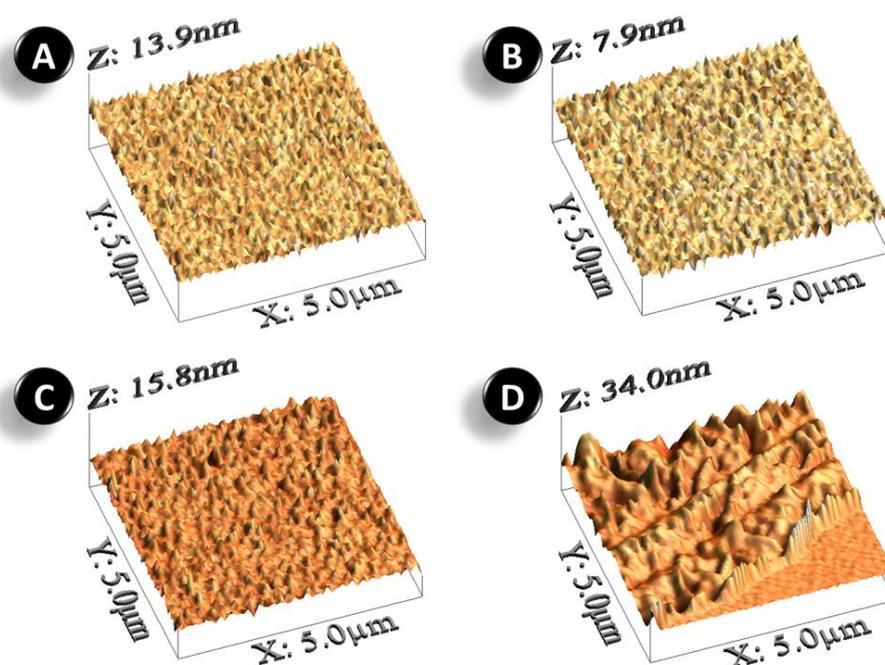
5.4. CARACTERIZAÇÃO POR MICROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA (AFM)

A caracterização por AFM foi realizada para demonstrar a topografia, altura e rugosidade dos filmes LbL nas etapas de construção do sensor, varrendo uma área de $25 \mu\text{m}^2$ para obtenção das imagens.

A fabricação do filme para essa caracterização foi realizada sobre o substrato de ouro com uma monocamada de 11-Mua com posterior deposição da camada do polieletrólito PEI e, por fim, uma camada de AuNP-GS-FAD. Os tempos de deposição e as etapas de lavagem foram realizados de acordo com o descrito na sessão 4.5.3.

A Figura 35 ilustra a topografia 3D das camadas do filme e apresenta os valores de altura média encontrados. O ouro puro apresentou altura média de 13,9 nm (Figura 35 (A)), a deposição da monocamada de 11-Mua reduziu a altura do filme para 7,9 nm (Figura 35 (B)), a adição da camada do polieletrólito PEI gerou o aumento da altura do filme que apresentou valor de 15,8 nm (Figura 35 (C)) e com camada de AuNP-GS-FAD obteve-se altura de 34,0 nm (Figura 35 (D)).

Figura 35: Imagens em 3D da caracterização por Microscopia de força atômica da construção do filme LbL. (A) Ouro puro, (B) Au/11-Mua, (C) Au/11-Mua/PEI, (D) Au/11-Mua/ PEI/AuNP-GS-FAD.



A partir da Figura 35 é possível observar que a altura média do filme aumentou entre as camadas de 11-Mua, PEI e a camada de AuNP-GS-FAD (Figura 35 (B), (C), (D)), demonstrando que houve a deposição bem sucedida do material sobre o substrato. Por outro lado, comparando o substrato de ouro puro e a camada de 11-Mua (Figura 35 (A) e (B)), houve diminuição na altura do filme. Isso ocorre devido ao cálculo do qual resulta a altura a partir dos parâmetros obtidos pela varredura da amostra com a ponta do AFM. Durante a varredura da amostra são medidas as alturas dos picos e dos vales da última camada depositada sobre o filme, logo, a altura média apresentada na Figura 31 não é a altura real do filme, mas a diferença de altura entre os picos e vales encontrados na superfície da amostra (LEITE, 2006). A altura média da topografia da amostra é calculada a partir da Equação 1:

$$\bar{Z} = \frac{1}{N} \sum_{i=0}^N Z_i \quad \text{Equação 1}$$

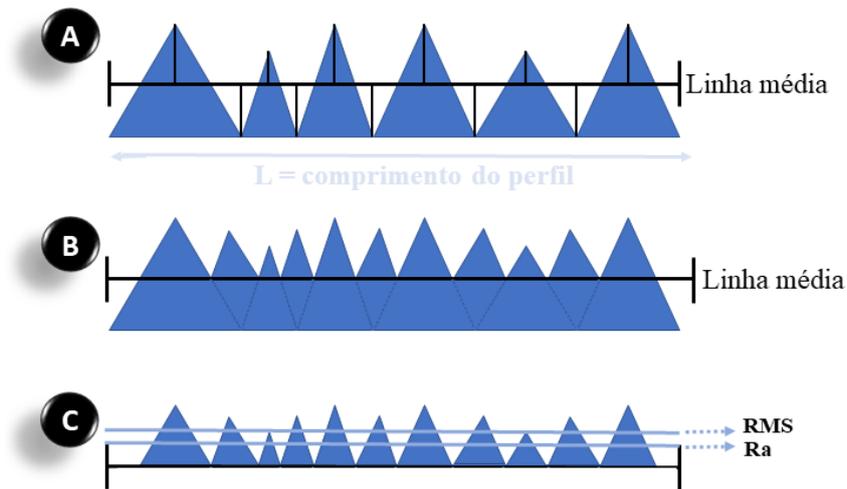
Onde \bar{Z} é a altura média da superfície, N é o número de pontos de dados no perfil e Z_i é a soma de todos os valores de altura (LEITE, 2006). Paralelamente, a ponta do AFM utilizada para varrer a amostra possui um raio de 8 nm, conseqüentemente qualquer vale presente na amostra menor ou igual a 8 nm não será percebido pela ponta e, portanto, será interpretado pelo equipamento como uma superfície plana.

Sendo assim, percebe-se que quanto mais compacta e uniforme for a camada de material depositado menor será a altura média registrada. A monocamada de 11-Mua sobre o substrato de ouro tem essa característica devido às forças atrativas de Van der Waals existentes entre as longas cadeias alquílicas, promovendo um arranjo organizado dessas moléculas e assim diminuindo a altura média da monocamada. (NELLES, *et al.*, 1998; BYUNG-KEUNOH, *et al.*, 2004).

A partir das imagens de AFM também foram extraídos os valores de rugosidade média (Ra) e rugosidade média quadrática (RMS) da amostra, para cada uma das camadas. A Ra é um parâmetro obtido através da média aritmética dos desvios da altura dos picos e vales encontrados no perfil caracterizado. Nesse processo, é definida uma linha média, que é uma linha horizontal localizada na altura em que a soma das áreas preenchidas acima da linha seja igual à soma das áreas vazias abaixo da linha. Posteriormente a rugosidade média é calculada pela soma dos valores das alturas medidas,

dividido pela quantidade das alturas medidas (N) (GADELMAWLA et al., 2002; CHI et al., 2004). A Figura 36 ilustra a delimitação da linha média (A e B) e a obtenção da Ra e da RMS (C).

Figura 36: Ilustração da delimitação da Linha média e cálculo da rugosidade média Ra de uma superfície.



Fonte: informações retiradas de (CHI et al., 2004).

O cálculo da Ra é realizado através da Equação 2:

$$Ra = \frac{1}{L} \int_{x=0}^{x=L} |z(x)| dx \quad \text{Equação 2}$$

Onde L é o comprimento do perfil medido, e $z(x)$ é a altura de cada um dos pontos medidos. O valor da rugosidade média é bastante utilizado por ser facilmente medido. No entanto, esse cálculo mascara valores que se distanciam da média e resulta no ocultamento de irregularidades da superfície. Além de não diferenciar perfis distintos, ou seja, perfis que podem apresentar morfologias diferentes, mas valores de Ra iguais (GADELMAWLA et al., 2002; CHI et al., 2004).

Por outro lado, a RMS é calculada pela Equação 3:

$$RMS = \sqrt{\frac{1}{L} \int_0^L |z^2(x)| dx} \quad \text{Equação 3}$$

A RMS é mais sensível à variação das alturas dos picos dos vales encontrados na superfície da amostra que a Ra devido às medidas de altura que são elevadas ao quadrado. Esse cálculo evidencia possíveis imperfeições contidas na superfície, dessa maneira a RMS tende a resultar em valores de rugosidade maiores que a Ra. No entanto, também não é possível fazer distinção entre a morfologia de perfis através da RMS (WHITEHOUSE, 2002). Os valores de Ra e RMS obtidos para as camadas do biossensor estão apresentados na Tabela 2.

Tabela 3: Valores de Ra, RMS e aumento da RMS em relação à Ra (%) para as etapas de construção do filme.

Camada	Ra (nm)	RMS (nm)	Aumento da RMS em relação Ra
Ouro puro	1,54	1,90	23%
Au/11-Mua	0,79	0,99	25%
Au/11-Mua/PEI	0,75	1,02	36%
Au/11-Mua/PEI/AuNP-FAD	1,76	2,43	38%

Observando a Tabela 2 é possível observar que os valores de Ra para o ouro puro, Au/11-Mua, Au/11-Mua/PEI e Au/11-Mua/PEI/AuNP-GS-FAD foram respectivamente 1,54; 0,79; 0,75 e 1,76 nm. Houve um aumento da RMS em relação à Ra que variou de 23 a 38%. Essa porcentagem indica que existem imperfeições na superfície que não são percebidas pelo cálculo da Ra. A partir dos valores da RMS é possível afirmar que a rugosidade da camada de Au/11-Mua e de Au/11-Mua/PEI são bastante semelhantes, 0,99 e 1,02 nm respectivamente. Enquanto que a RMS do substrato de ouro puro é de 1,90 nm e do Au/11-Mua /PEI/AuNP-GS-FAD é a de 2,43 nm.

Os valores de rugosidade de um material podem estar relacionados ao aumento da sensibilidade do biossensor eletroquímico, por resultar em um aumento da área superficial do material e possibilitar maior transferência de cargas na interface eletrodo-solução. No entanto, a transferência de elétrons não será influenciada apenas pela rugosidade da superfície, mas também pelo material utilizado. Por exemplo, a camada de Au/11-Mua que apresenta RMS semelhante à de Au/11-Mua/PEI na caracterização morfológica por AFM não possui a mesma resposta eletroquímica nas medidas de VC devido à

propriedade isolante das cadeias alquílicas do 11-Mua (para maior detalhamento verificar a discussão na seção 5.5. (Caracterização por Voltametria Cíclica) na qual foi calculado o Fator de rugosidade para cada uma das camadas da fabricação do filme).

O valor de RMS da camada de Au/11-Mua é o menor dentre os valores apresentados. Isso está de acordo com o esperado, devido à formação de uma monocamada organizada e compacta de 11-Mua sobre o substrato de ouro, indicando que houve total cobertura do substrato. Essa monocamada torna a superfície negativamente carregada, por conta dos grupos carboxilas presentes na cadeia do 11-Mua, o que favorece a adsorção eletrostática do polieletrólito catiônico PEI de maneira homogênea, o que é também indicado pelo valor de rugosidade da camada de Au/11-Mua/PEI, de 1,02 nm.

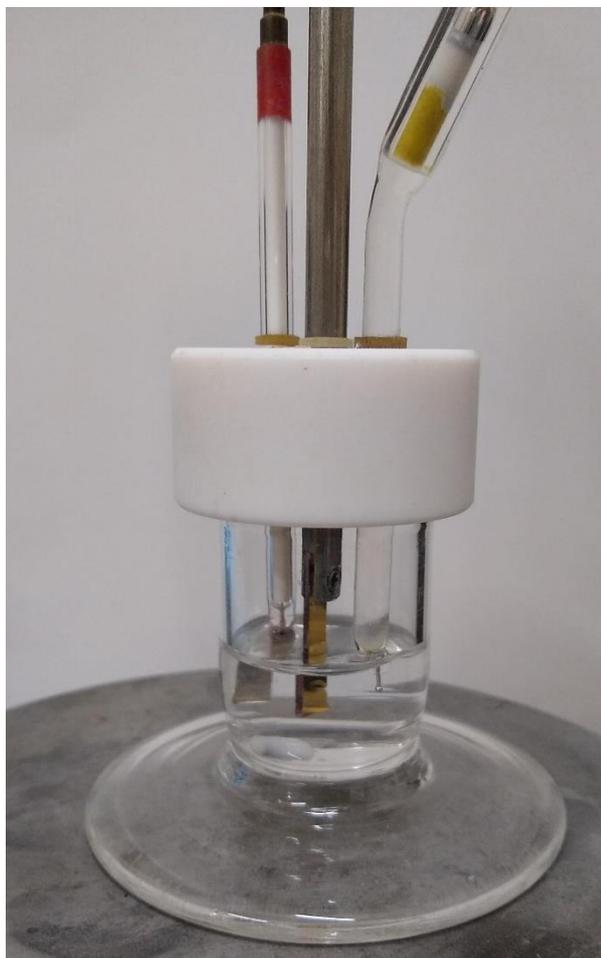
A maior RMS encontrada foi da camada de Au/11-Mua/PEI/AuNP-GS-FAD, de 2,43 nm e o aumento da RMS em relação à Ra foi de 38%. Esses valores demonstram a irregularidade da superfície e estão de acordo com a formação dos agregados das AuNP-GS-FAD na superfície do sensor durante o processo de adsorção. A formação dos agregados pode ser observada pela morfologia da superfície na Figura 35 (D) e confirmado pelo deslocamento da banda LSPR na caracterização do filme por espectroscopia de UV-Vis.

5.5. CARACTERIZAÇÃO POR VOLTAMETRIA CÍCLICA

A VC, como mencionado anteriormente, é uma técnica bastante rica na quantidade de informações que podem ser obtidas através do seu estudo. Neste trabalho utilizamos a VC como ferramenta para caracterizar os processos redox na superfície do eletrodo, determinar a área eletroativa do biossensor e comparar o desempenho eletroquímico das diversas etapas de construção do dispositivo.

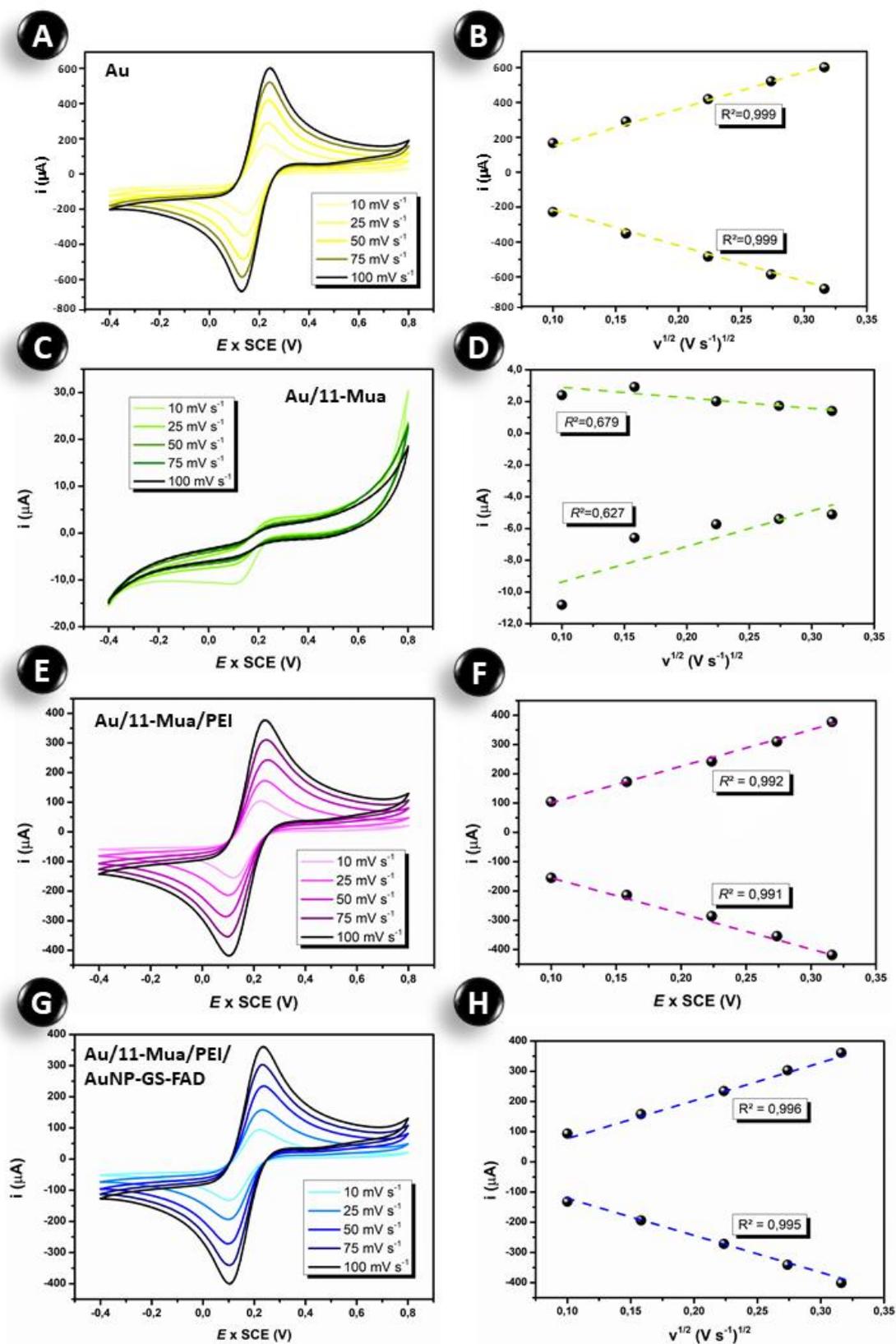
A área geométrica do eletrodo foi cuidadosamente determinada pela medição com paquímetro após cada uma das análises eletroquímicas e o valor foi utilizado para padronizar as correntes geradas nos voltamogramas a fim de obter a densidade de corrente (J), devido a interferência na corrente de pico. No entanto, os nanomateriais possuem a propriedade de aumentar sua área superficial, tornando-a maior do que a área geométrica medida. Chamamos a área aumentada de área eletroativa e essa propriedade está diretamente relacionada à resposta eletroquímica de cada eletrodo (ISHIDA et al., 2020). A Figura 37 mostra a foto da célula eletroquímica utilizada neste trabalho com os eletrodos auxiliar, de trabalho e de referência.

Figura 37: Foto da célula eletroquímica utilizada nos experimentos com o eletrodo auxiliar, à esquerda, eletrodo de trabalho, no centro, e eletrodo de referencia de calomelano saturado, à direita.



Com o objetivo de estudar o comportamento eletroquímico do dispositivo proposto, foram realizados estudos de voltametria cíclica com a sonda redox $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ a $5,0 \text{ mmol L}^{-1}$ em $\text{KCl } 0,1 \text{ mol L}^{-1}$, com velocidades de varredura de 10, 25, 50, 75 e 100 mV s^{-1} , no intervalo de potencial de $-0,4$ à $0,8 \text{ V}$. Na Figura 38 é possível observar os voltamogramas gerados para o estudo de voltametria cíclica em cada uma das etapas da construção do biossensor. Nesta etapa os voltamogramas não foram divididos por sua área geométrica porque o objetivo nesse momento calcular sua área eletroativa.

Figura 38: À esquerda, voltamogramas cíclicos com velocidades de varredura de 10, 25, 50, 75 e 100 mV s^{-1} com a sonda redox $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ a $5,0 \text{ mmol L}^{-1}$ em $\text{KCl } 0,1 \text{ mol L}^{-1}$ e, à direita, gráficos de corrente de pico anódica (ipa) e catódica (ipc) versus a raiz quadrada das velocidades de varredura para o eletrodo de ouro puro (A) e (B), Au/11-Mua (C) e (D), Au/11-Mua/PEI (E) e (F) e Au/11-Mua/PEI/AuNP-GS-FAD (G) e (H).



As retas dos gráficos de corrente de pico anódica (i_{pa}) e catódica (i_{pc}) versus a raiz quadrada das velocidades de varredura, bem como os valores de R^2 (próximos de

0,99) indicam que a corrente de pico varia linearmente a partir da velocidade de varredura na VC. As Tabelas 4 a 7 apresentam os valores de potenciais de pico anódico (Epa) e catódico (Epc), diferença entre Epa e Epc (ΔE_p), ipa, ipc e razão entre ipa e ipc para o substrato de ouro puro e para cada uma das etapas de modificação do substrato.

Tabela 4: Valores de Epa, Epc, ΔE_p , ipa, ipc e ipa/ipc obtidos através do voltamograma cíclico para o substrato de ouro com a sonda redox $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ a $5,0 \text{ mmol L}^{-1}$ em KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ em velocidades de varredura de 10, 25, 50, 75 e 100 mV s^{-1} .

Velocidade (mV s^{-1})	Epa (V)	Epc (V)	ΔE_p (V)	Ipa (μA)	Ipc (μA)	ipa/ipc
10	0,231	0,142	0,089	235	237	0,99
25	0,229	0,14	0,089	379	363	1,04
50	0,237	0,137	0,100	517	463	1,12
75	0,24	0,134	0,106	603	529	1,14
100	0,24	0,129	0,111	667	572	1,17
		Média	$0,1 \pm 0,01$		Média	$1,09 \pm 0,07$

Tabela 5: Valores de Epa, Epc, ΔE_p , ipa, ipc e ipa/ipc obtidos através do voltamograma cíclico para o eletrodo de ouro modificado com uma monocamada de 11-Mua (Au/11-Mua) com a sonda redox $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ a $5,0 \text{ mmol L}^{-1}$ em KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ em velocidades de varredura de 10, 25, 50, 75 e 100 mV s^{-1} .

Velocidade (mV s^{-1})	Epa (V)	Epc (V)	ΔE_p (V)	Ipa (μA)	Ipc (μA)	ipa/ipc
10	0,247	0,100	0,147	3,78	10	0,38
25	0,254	0,104	0,15	5,46	5,68	0,96
50	0,239	0,106	0,133	4,27	4,24	1,01
75	0,234	0,112	0,122	3,92	3,69	1,06
100	0,231	0,124	0,107	2,36	2,78	0,85
		Media	$0,131 \pm 0,02$		Media	$0,85 \pm 0,27$

Tabela 6: Valores de Epa, Epc, ΔE_p , ipa, ipc e ipa/ipc obtidos através do voltamograma cíclico para o eletrodo de ouro modificado com uma monocamada de 11-Mua e uma camada de PEI (Au/11-Mua/PEI) com a sonda redox $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ a $5,0 \text{ mmol L}^{-1}$ em KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ em velocidades de varredura de 10, 25, 50, 75 e 100 mV s^{-1} .

Velocidade (mV s^{-1})	Epa (V)	Epc (V)	ΔE_p (V)	Ipa (μA)	Ipc (μA)	ipa/ipc
10	0,22	0,119	0,11	147	151	0,97

25	0,24	0,101	0,14	215	217	0,99
50	0,25	0,092	0,16	301	299	1,01
75	0,24	0,099	0,15	383	371	1,03
100	0,24	0,104	0,14	464	442	1,05
		Média	0,14 ± 0,02		Média	1,01 ± 0,03

Tabela 7: Valores de E_{pa} , E_{pc} , ΔE_p , i_{pa} , i_{pc} e i_{pa}/i_{pc} obtidos através do voltamograma cíclico para o eletrodo de ouro modificado com uma monocamada de 11-Mua, uma camada de PEI e uma camada de AuNP-GS-FAD (Au/11-Mua/PEI/AuNP-GS-FAD) com a sonda redox $[Fe(CN)_6]^{3-/4-}$ a $5,0 \text{ mmol L}^{-1}$ em KCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ em velocidades de varredura de 10, 25, 50, 75 e 100 mV s^{-1} .

Velocidade (mV s^{-1})	E_{pa} (V)	E_{pc} (V)	ΔE_p (V)	i_{pa} (μA)	i_{pc} (μA)	i_{pa}/i_{pc}
10	0,216	0,099	0,12	130	131	0,99
25	0,229	0,099	0,13	203	201	1,01
50	0,234	0,099	0,14	288	291	0,99
75	0,233	0,101	0,13	368	365	1,01
100	0,235	0,103	0,13	433	429	1,01
		Média	0,13 ± 0,01		Media	1,00 ± 0,01

Para que um processo redox seja considerado quase-reversível ele precisa atender à alguns critérios, sendo eles: (i) i_{pc} aumenta com o aumento da velocidade de varredura, (ii) relação $|i_{pa}/i_{pc}|$ igual à 1, (iii) ΔE_p maior do que $59/n$ (mV), sendo n o número de elétrons envolvidos na reação, e (iv) E_{pc} se deslocando negativamente com o aumento da velocidade de varredura.

A partir dos valores de ΔE_p , razão i_{pa}/i_{pc} , próximos de 1, das características dos voltamogramas obtidos nos estudos de VC e apresentados nas Tabelas 3 a 6, verifica-se que o processo redox atende à todos dos critérios apresentados, com exceção do estudo realizado com o eletrodo de ouro modificado com a monocamada de 11-Mua que apresentou razão i_{pa}/i_{pc} média de 0,85 e queda na i_{pc} quando a velocidade de varredura é aumentada. Pode-se, portanto, considerar que os processos redox para o ouro puro, Au/11-Mua/PEI e Au/11-Mua/PEI/AuNP-GS-FAD sob essas condições são quase-reversíveis. Os voltamogramas obtidos com o eletrodo modificado com 11-Mua apresentam características diferentes devido à sua característica isolante.

Em sistemas quase-reversíveis, a corrente gerada pelos processos redox na superfície do eletrodo é governada por dois mecanismos: (i) a transferência de massa, na qual, sendo minimizadas a transferência por convecção e por migração, será puramente

difusional e (ii) processo de transferência de carga, uma vez que a cinética de transferência de elétrons nesse sistema não é rápida o suficiente para gerar um equilíbrio na interface eletrodo-solução, portanto a transferência de carga também é limitante para esses sistemas (PACHECO et al., 2013). O processo difusional é comprovado pelo estudo de VC através da linearidade apresentada pelo crescimento da corrente de pico em relação à raiz quadrada da velocidade de varredura, com $R^2 = 0,99$, enquanto que a limitação da transferência de carga é observada pelos valores apresentados nas Tabelas 3 a 6. Portanto, o sistema quase-reversível governa os processos redox no ouro puro, no Au/11-Mua/PEI e Au/11-Mua/PEI/AuNP-GS-FAD.

Por outro lado, o Au/11-Mua tem significativa queda na transferência de carga entre a solução e o eletrodo. Isso acontece porque em eletrodos metálicos, a taxa de transferência de elétrons de centros redox em superfície ou difusos em solução é sensivelmente dependente da espessura, compactação e composição da monocamada automontada (SAM).

O 11-Mua é um alcanotiol e atua como um isolante, bloqueando a passagem de carga na superfície do eletrodo. A significativa redução da passagem de corrente quando o eletrodo de ouro está modificado apenas como a monocamada de 11-Mua, indica a formação de uma superfície isolante com melhor orientação e compactação das moléculas do alcanotiol. A formação de uma monocamada com essa configuração também está relacionada à rugosidade presente no substrato de ouro. O fator de rugosidade expressa a semelhança entre a área real e a área geométrica de um substrato, podendo ser calculado com a Equação 4 (JARZABEK; BORKOWSKA, 1997; RODRÍGUEZ; MELIÁN; PEÑA, 2000).

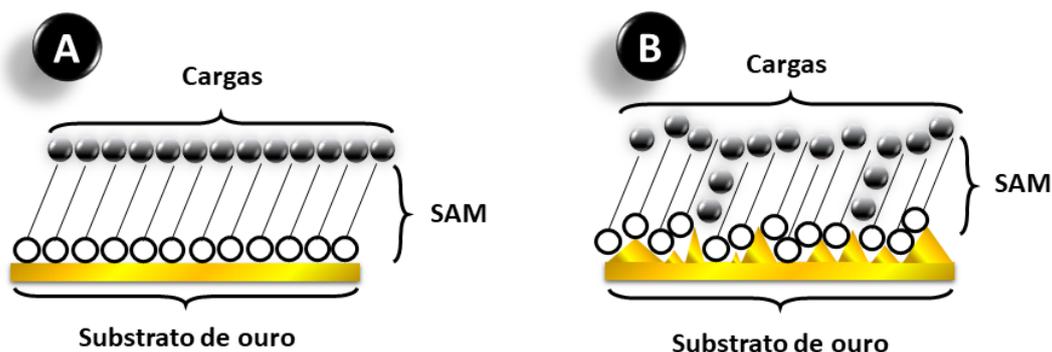
$$f_r = A_r/A_g \quad \text{Equação 4}$$

Onde f_r é o fator de rugosidade, A_r é a área real e A_g é a área geométrica. Quanto mais próximo de 1 for o fator de rugosidade, mais semelhantes serão a área real e a área geométrica, indicando uma pequena rugosidade, ou seja, uma superfície mais plana (TRASATTI; PETRII, 1991; TKAC; DAVIS, 2008).

Como ilustrado na Figura 39 um substrato com superfície pouco rugosa oferece melhor condição para a formação de uma SAM compacta e permite o bloqueio da passagem de cargas, enquanto que um substrato muito rugoso prejudica a formação da

SAM por ser uma superfície desfavorável ao empacotamento dos alcanotióis, isso diminui o poder de isolamento da SAM e expõe partes da superfície do ouro à solução, permitindo maior passagem de corrente (BENITES et al., 2014).

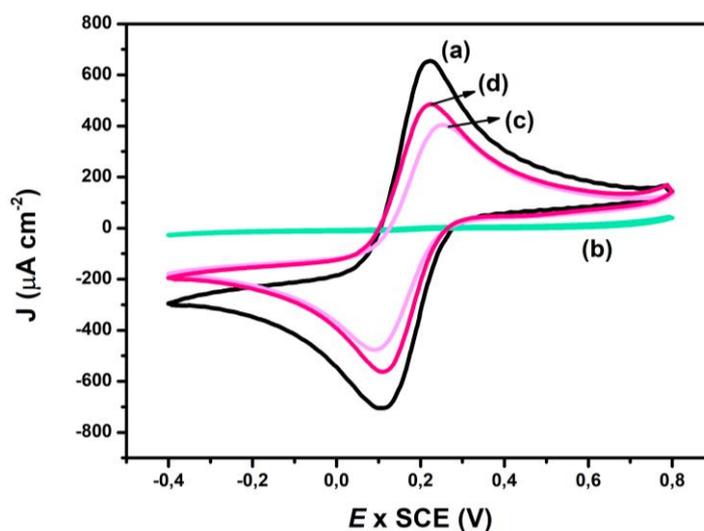
Figura 39: Ilustração da influência da rugosidade do substrato de ouro na formação da SAM de 11-Mua.



Fonte: adaptado de (BENITES et al., 2014).

Na Figura 40, os voltamogramas obtidos com a sonda redox $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ a $5,0 \text{ mmol L}^{-1}$ em $\text{KCl } 0,1 \text{ mol L}^{-1}$ em velocidade de varredura de 50 mV s^{-1} foram divididos pela área geométrica de cada eletrodo, com o objetivo de comparar a variação das correntes de pico em cada uma das etapas de modificação do eletrodo.

Figura 40: Voltamograma cíclico do ouro (A), Au/11-Mua (B), Au/11-Mua/PEI (C) e Au/11-Mua/PEI/AuNP-GS-FAD (D) versus SCE, com a sonda redox $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ a $5,0 \text{ mmol L}^{-1}$ em $\text{KCl } 0,1 \text{ mol L}^{-1}$ velocidade de varredura 50 mV s^{-1} .



A Tabela 7 apresenta a comparação dos valores de i_{pa} , i_{pc} , E_{pa} , E_{pc} e ΔE_p extraídos dos voltamogramas apresentados na Figura 40.

Tabela 8: Valores de E_{pa} , E_{pc} , ΔE_p , i_{pa} , i_{pc} e relação i_{pa}/i_{pc} para cada uma das camadas da construção do biossensor.

Modificação do substrato	E_{pa} (V)	E_{pc} (V)	ΔE_p	i_{pa} (μA)	i_{pc} (μA)	i_{pa}/i_{pc}
Ouro puro	0,237	0,137	0,1	814	744	1,09
Au/11-Mua	0,239	0,106	0,133	9,31	11,5	0,81
Au/11-Mua/PEI	0,252	0,092	0,160	506	505	1,00
Au/11-Mua/PEI/AuNP-GS-FAD	0,234	0,099	0,135	594	611	0,97

Os valores apresentados na Tabela 6 demonstram que o menor ΔE_p para a velocidade de 50 mV s^{-1} é o do ouro puro (0,1), seguido do substrato com 11-Mua (0,133), depois pelo Au/11-Mua/PEI/AuNP-GS-FAD (0,135). Já os valores de i_{pa} e i_{pc} são significativamente maiores para o substrato puro (814 e $744 \mu A$), seguido do eletrodo com presença de AuNP-GS-FAD (594 e $611 \mu A$), posteriormente do substrato com 11-Mua/PEI (506 e $505 \mu A$), e o menor valor de corrente é o do 11-Mua ($9,31$ e $11,5 \mu A$). Esses resultados são consistentes com o esperado, indicando que o ouro puro possui melhor desempenho eletroquímico, em relação ao substrato modificado, devido ao poder do 11-Mua de bloquear a passagem de corrente, característica conferida por sua longa cadeia alquila, que é recuperada com a adição do polieletrólito PEI e aumentada com a presença das AuNP-GS-FAD.

O desempenho eletroquímico do dispositivo está diretamente relacionado à área eletroativa de cada uma das camadas do biossensor. A área eletroativa pode ser calculada a partir da equação de Randles-Sevcik:

$$i_p = (2,69 \times 10^5) n^{2/3} A D_0^{1/2} \nu^{1/2} C_0 \quad \text{Equação 5}$$

Onde:

i_p = pode ser substituído pelo coeficiente angular da reta gerada pelo gráfico de pico anódica ou catódica versus a raiz quadrada das velocidades de varredura, excluindo-se o ν da equação (velocidade de varredura);

n = número de elétrons envolvidos no processo redox;

A = área eletroativa do eletrodo [cm^2];

D = coeficiente de difusão da sonda redox [$\text{cm}^2 \text{s}^{-1}$] = $7,6 \times 10^{-6}$;

O = concentração da espécie oxidada [mol cm^{-3}];

A equação de Randles-Sevcik foi utilizada para calcular a área eletroativa de cada uma das etapas de modificação do substrato e os valores encontrados estão na Tabela 7, juntamente com os valores de área geométrica e o aumento relativo da área geométrica pela modificação do substrato (%).

Tabela 9: Valores de área geométrica, área eletroativa, % de aumento da área em relação à área geométrica e fator de rugosidade para as diversas camadas do biossensor.

Modificação do substrato	área geométrica (cm^2)	área eletroativa (cm^2)	% de aumento em relação à área geométrica	fator de rugosidade
Ouro puro	0,64	0,94	49%	1,49
Au/11-Mua	0,52	0,01	-97,6%	0,02
Au/11-Mua/PEI	0,60	0,67	12%	1,12
Au/11-Mua/PEI/AuNP-GS-FAD	0,48	0,67	38%	1,38

A partir dos valores apresentados na Tabela 8 verifica-se um aumento de 49% da área em relação à área geométrica do ouro puro, 12% para a camada com PEI, 38% para a camada com AuNP e uma redução de 97,6% da área modificada com 11-Mua. O aumento da área tem relação com a rugosidade proporcionada pelo material em contato com a solução.

Para encontrar o fator de rugosidade de cada uma das camadas do dispositivo foram divididos os valores da área eletroativa pela área geométrica dos eletrodos (valores também apresentados na Tabela 8). Os resultados obtidos demonstram que o fator de rugosidade é de fato maior para o ouro puro (1,49), mas não tão acentuado a ponto de prejudicar a formação da SAM de 11-Mua, já que ela além de ter isolado a passagem de corrente nos voltamogramas, apresentou a construção de uma superfície sem rugosidade. Benites et al. (2014) descreve o valor de 1,6 como um valor crítico para o fator de rugosidade do ouro. Substratos de ouro com fator de rugosidade acima de 1,6 tendem a ser desfavoráveis a formação da monocamada de 11-Mua. As AuNP-GS-FAD proporcionaram uma superfície suficientemente rugosa (com fator de rugosidade de 1,38)

como já esperado, devido ao aumento da área superficial proporcionado por esse tipo de material.

A Tabela 9 compara os valores de Ra e RMS obtidos com a caracterizados por AFM e os fatores de rugosidade obtidos pelo estudo de VC para cada camada de modificação do substrato.

Tabela 10: Comparação dos valores de Ra, RMS e o fator de rugosidade para cada uma das camadas de modificação do substrato.

Camada	Ra (nm)	RMS (nm)	Fator de rugosidade
Ouro puro	1,54	1,90	1,49
Au/11-Mua	0,79	0,99	0,02
Au/11-Mua/PEI	0,75	1,02	1,12
Au/11-Mua/PEI/AuNP-GS-FAD	1,76	2,43	1,38

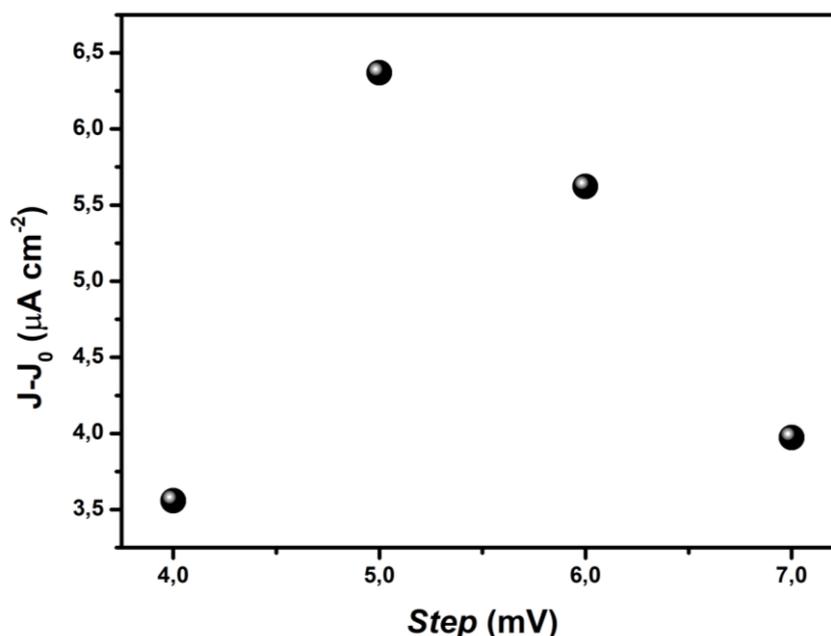
A partir da Tabela 9 é possível notar que o fator de rugosidade encontrado através do estudo por VC não é diretamente comparável aos valores de Ra e RMS obtidos com a técnica de AFM. Isso é facilmente observado pela comparação entre as camadas de Au/11-Mua e Au/11-Mua/PEI que apresentaram valores de Ra e RMS bastante semelhantes (0,79 e 0,99 para o Au/11-Mua e 0,75 e 1,02 para o Au/11-Mua/PEI), enquanto seus valores de fator de rugosidades são expressivamente diferentes, sendo 0,02 para o Au/11-Mua e 1,12 para o Au/11-Mua/PEI. Isso acontece porque nas técnicas eletroquímicas um dos principais fatores interferentes é a condutividade do material. Quanto maior for a condutividade, maior será o aumento da área eletroativa, enquanto que nos experimentos de AFM apenas a morfologia do material é caracterizada. Poderíamos esperar valores de fator de rugosidade e de Ra/RMS proporcionais se estivéssemos caracterizando com a VC superfícies de um mesmo material, que variasse apenas com relação à sua rugosidade. Portanto, o fator de rugosidade calculado aqui expressa a influência da condutividade do material para o aumento da área eletroativa.

5.6. OTIMIZAÇÃO DOS PARÂMETROS DE DPV

A fim de escolher os parâmetros para melhor performance do biossensor, analisou-se a resposta eletroquímica obtida para os parâmetros da DPV. Foram estudados o incremento de varredura (*step*), a modulação de amplitude (*ma*), a modulação de tempo (*mt*) e o intervalo de tempo (*it*). Para esta otimização foi fixado o valor de $8 \mu\text{mol L}^{-1}$ de DA em tampão PBS $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, pH 7,4.

O primeiro parâmetro a ser avaliado foi o *step*. O *step* juntamente com os valores de modulação de tempo e intervalo de tempo irão determinar a velocidade da técnica. Os valores analisados de *step* foram de 4, 5, 6 e 7 mV. A Figura 41 representa o estudo da influência dos *step* no aumento da densidade de corrente. É possível observar que o valor de 4 mV foi o que apresentou o menor valor de densidade corrente, enquanto o valor de 5 mV foi o que apresentou melhor desempenho, com o maior valor de densidade de corrente. Houve uma queda linear da corrente à medida que o valor de *step* sobe para 6 e 7 mV. Devido a melhor resposta foi fixado o valor de 5 mV para o *step*.

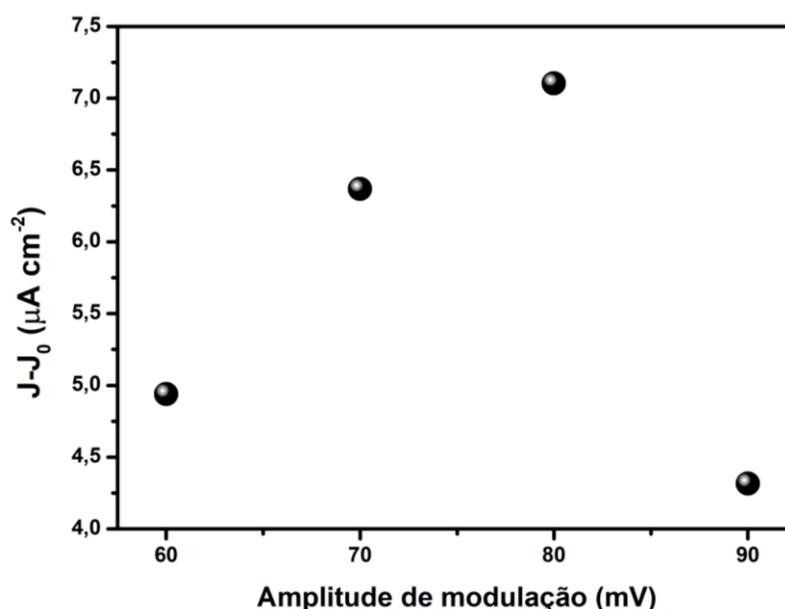
Figura 41: Efeito do *step* para a altura do pico densidade de corrente na detecção de DA. Condições experimentais: concentração de DA $8,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ em tampão PBS (pH 7,4), modulação de amplitude de 70 mV, modulação de tempo de 0,05 s, intervalo de tempo de 0,5 s.



O segundo parâmetro otimizado foi a amplitude de modulação. Esse parâmetro determina qual será a dimensão do pulso aplicado ao longo da medida de DPV. Os valores

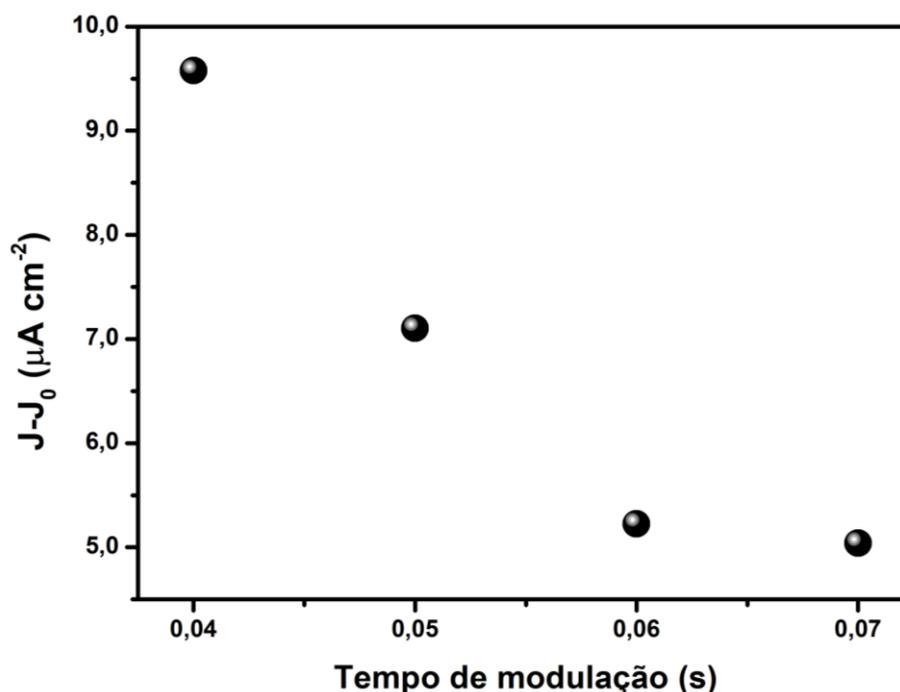
testados foram de 60, 70, 80 e 90 mV. Na Figura 42 é possível notar que há um crescimento linear da densidade de corrente passando pelo valor de 60, 70 e 80 mV, e uma queda significativa em 90 mV. Sendo o de 80 mV o valor fixado para o a amplitude de modulação.

Figura 42: Efeito da modulação de amplitude para a altura do pico anódico da detecção de DA. Condições experimentais: concentração de DA $8,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ em tampão PBS (pH 7,4), modulação de *step* 5,0 mV, modulação de tempo de 0,05 s, intervalo de tempo de 0,5 s.



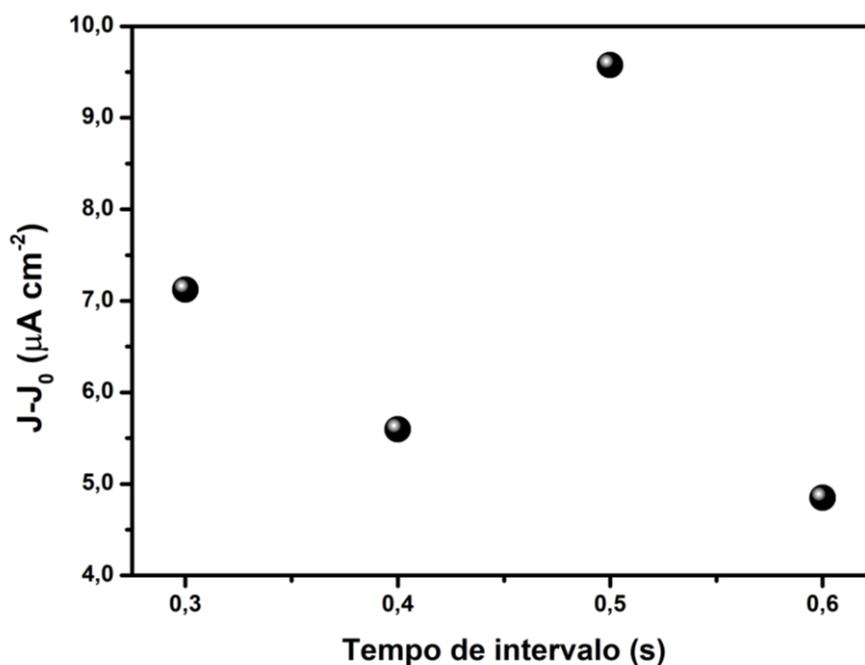
Posteriormente, foi analisada a influência da modulação de tempo sobre a densidade de corrente. Esse parâmetro indica qual a duração do pulso de potencial aplicado sobre o eletrodo de trabalho. Foram testados os valores de 0,04, 0,05, 0,06 e 0,07 segundos. Os valores de densidade de corrente para cada um dos valores de modulação de tempo estão apresentados na Figura 43. O valor de modulação de tempo que apresentou a maior densidade de corrente foi o de 0,04 segundos apresentando uma queda à medida que o valor subia para 0,05 e 0,06 segundos. Os valores de 0,06 e 0,07 apresentaram valores de densidade de corrente bastante semelhantes. Devido à melhor resposta gerada o valor fixado foi o de 0,04 segundos.

Figura 43: Efeito da modulação de tempo para a altura do pico anódico da detecção de DA. Condições experimentais: concentração de DA $8,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ em tampão PBS (pH 7,4), modulação de *step* 5 mV, modulação de amplitude de 80 mV, intervalo de tempo de 0,5 s.



O último parâmetro da DPV testado foi o de intervalo de tempo. Esse parâmetro está diretamente relacionado à velocidade da varredura, pois determina qual será o período entre a aplicação dos pulsos de potencial. Foram testados os valores de 0,3, 0,4, 0,5 e 0,6 segundos. Na Figura 44 observa-se que o valor apresentou maior densidade de corrente foi o de 0,5. Os menores valores de densidade de corrente foram apresentados pelos valores de 0,4 e 0,6 segundos de intervalo de tempo e o valor de 0,3 segundos apresentou valor intermediário de densidade de corrente. Portanto, o valor de 0,5 segundos foi fixado para o intervalo de tempo.

Figura 44: Efeito do intervalo de tempo para a altura do pico anódico da detecção de DA. Condições experimentais: concentração de DA $8,0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ em tampão PBS (pH 7,4), modulação de *step* 5 mV, modulação de amplitude de 80 mV, modulação de tempo de 0,04 s.



Os valores dos parâmetros foram fixados de acordo com a altura de pico gerada na detecção de DA a fim de melhorar a resposta do sensor ao analito. Os valores fixados e a faixa estudada para cada parâmetro da DPV estão resumidos na Tabela 10.

Tabela 11: Parâmetros experimentais estudados para a técnica de DPV e os respectivos valores fixados para a detecção de DA em tampão PBS 0,1 mol L⁻¹, pH 7,4.

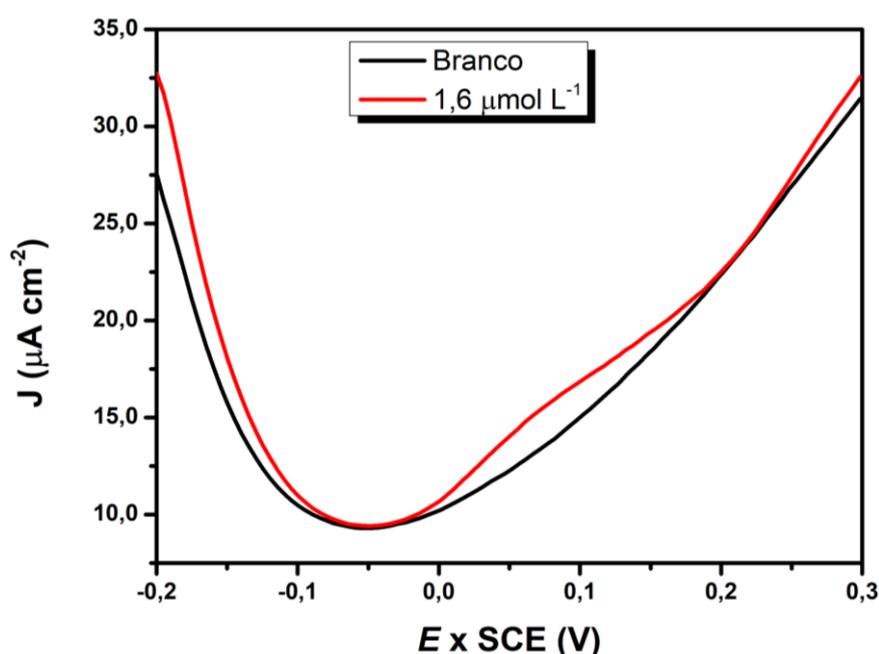
Parâmetro	Faixa estudada	Valor fixado
Step	4 - 7 mV	5 mV
Modulação de amplitude	60 - 90 mV	80 mV
Modulação de tempo	0,04 - 0,07 s	0,04 s
Intervalo de tempo	0,3 - 0,6 s	0,5 s

5.7. DETECÇÃO POR VOLTAMETRIA DE PULSO DIFERENCIAL (DPV)

A fim de avaliar a capacidade da unidade sensorial Au/11-Mua/PEI/AuNP-GS-FAD foi realizada a detecção de DA através da técnica de DPV em tampão PBS, pH 7,4. As medidas foram realizadas em duplicata, após 10 medidas do branco para total estabilização do sensor. As curvas foram obtidas após a adição de DA no sistema, então elas foram subtraídas da medida do branco e divididas pela área geométrica do eletrodo, o

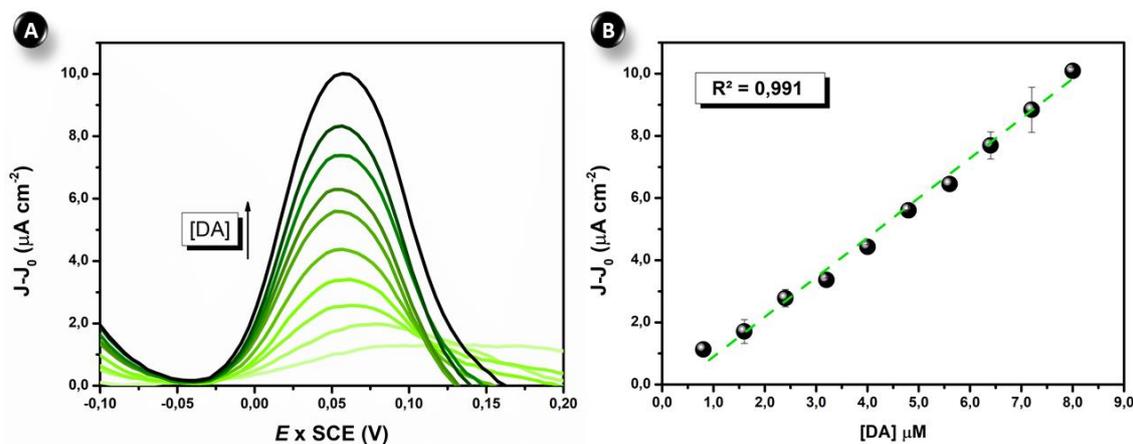
que resultou em uma densidade de corrente por centímetro quadrado (J ($\mu\text{A cm}^{-2}$)) com exceção das medidas apresentadas na Figura 45 que ilustra a última medida de branco realizada e a detecção de $1,6 \mu\text{mol L}^{-1}$ de DA, com intervalo de varredura entre $-0,2$ e $0,3$ V. Nessa Figura é possível observar que o eletrodo de Au/11-Mua/PEI/AuNP-GS-FAD possui um pico que se inicia em $-0,05$ V e cresce em direção ao potencial $0,3$ V, se sobrepondo ao potencial de oxidação da DA em $0,05$ V, o que torna o voltamograma inclinado. Além disso o menor ponto de corrente do voltamograma está em $4,6 \mu\text{A}$ e não em 0 como seria o ideal. Por esses motivos a subtração da medida do branco das curvas de detecção é necessária, a fim de normalizar o voltamograma como ilustrado na Figura 45.

Figura 45: Detecção de DA $1,6 \mu\text{mol L}^{-1}$ por DPV com a medida de branco.



Conforme mostrado na Figura 46(A) o potencial de pico anódico de oxidação da DA emerge em $0,05$ V e é observado um aumento linear na corrente de pico anódica à medida que a concentração de DA aumenta de $0,8$ a $8,0 \mu\text{mol L}^{-1}$. A curva de calibração observada na Figura 46(B) foi elaborada com base na faixa linear de experimentos de detecção da DA que foram realizados em duplicata. Neste mesmo gráfico está traçada reta gerada pela equação linear expressa como $I_{pa} = (1,25 \times 10^{-5}) \times [\text{DA}] + (-3,10 \times 10^{-7})$, $R^2 = 0,991$.

Figura 46: (A) Detecção de DA por DPV em tampão fosfato pH 7,4, nas concentrações de 0,8 a 8,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Parâmetros: *step*: 5mV, *modulation amplitude*: 90mV, *modulation time*: 50 ms. (B) Curva de calibração para as diversas concentrações de DA com valor de R^2 e o erro da medida.



O limite de detecção (LOD), que é definido como a menor concentração do analito que pode ser detectada de maneira qualitativa pelo sensor, sem ser quantificada, foi calculado pelo método de Miller e Miller (2005) utilizando todos os pontos e o coeficiente angular da reta, através da Equação 6:

$$LOD = a + 3S_{y/x} \quad \text{Equação 6}$$

Na qual a é o valor do coeficiente angular da reta e $S_{y/x}$ é calculado por:

$$S_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum_i (y_i - \hat{y}_i)^2}{n-2}} \quad \text{Equação 7}$$

$S_{y/x}$: desvio padrão dos valores calculados dos coeficientes angular e linear;

y_i : valor de y para cada concentração do analito (x);

\hat{y}_i : valor ajustado de y calculado pelos coeficientes angular e linear;

n : número de concentrações utilizadas para construção da curva analítica.

E o limite de quantificação (LOQ) que é menor concentração do analito possível de ser quantificada pelo sensor, foi calculado pela Equação 8:

$$LOQ = 3,33 \times LD$$

Equação 8

Através das equações acima se obteve os seguintes valores de $LOD = 0,525 \mu\text{mol L}^{-1}$ e $LOQ = 1,75 \mu\text{mol L}^{-1}$. A sensibilidade apresentada pelo dispositivo foi de $1,25 \mu\text{A}/\mu\text{mol L}^{-1} \text{ cm}^{-2}$.

A fim de avaliar o biossensor desenvolvido com as características de outros presentes da literatura foi elaborada a Tabela 11, que apresenta a arquitetura, técnica eletroquímica utilizada, faixa linear de detecção e o limite de detecção de 15 biossensores eletroquímicos para DA além do proposto neste trabalho.

Tabela 12: Comparação da técnica eletroquímica, faixa linear de trabalho e valores de LOD de biossensores eletroquímicos para detecção de DA encontrados na literatura.

Arquitetura do biossensor	Técnica eletroquímica	Faixa linear de detecção	LOD	Fonte
CPE / AuNP-PAH / lacase	SWV	0,49-23,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$	0,26 $\mu\text{mol L}^{-1}$	(SILVA; VIEIRA, 2016)
GCE / AuNPs / NB / rGO-Aptâmero	SWV	10,0 nmol L^{-1} - 0,2 mmol L^{-1}	1 nmol L^{-1}	(JIN et al., 2018)
AuPE/ AuNET / MCJ / MB / Aptâmero	DPV	25,0 pg mL^{-1} - 3,0 ng mL^{-1}	2 pg mL^{-1}	(TAHERI; ESKANDARI; NEGAHDARY, 2018)
GCE / rGO / Lac	DPV	0,1-3,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$	91 nmol L^{-1}	(KOHORI; SILVA; CESARINO, 2018)
GCE/MXene/DNA/Pd/Pt nanocomposite/DNA	DPV	0,2-1000 $\mu\text{mol L}^{-1}$	30,0 nmol L^{-1}	(ZHENG et al., 2018)
GCE/ Lac / Fe ₃ O ₄ @ SiO ₂ @vmSiO ₂	DPV	1,5-75 $\mu\text{mol L}^{-1}$	0,177 $\mu\text{mol L}^{-1}$	(LI et al., 2018)
GCE/ CNTs/ DA/ AuNP / DNA	DPV	30 pmol L^{-1} -30 nmol L^{-1}	18,0 pmol L^{-1}	(LIU et al., 2018)
GCE / DNA-CNT/ NEG	DPV	0,02-1 $\mu\text{mol L}^{-1}$	14,0 nmol L^{-1}	(KETEKLARIJANI et al., 2019)
GCE / GO / GCSC / Aptâmero	DPV	1-1000 nmol L^{-1}	0,75 nmol L^{-1}	(WEI et al., 2019)
GCEi /quitosana / rGO / Tirosinase	VC	0,4–8 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e 40–500 $\mu\text{mol L}^{-1}$	22,0 nmol L^{-1}	(LIU et al., 2019)

GCE / AQ / ssDNA / MB / Aptâmero	SWV	20-350 $\mu\text{mol L}^{-1}$	10,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$	(GUO et al., 2020)
Au/apptâmero-Fc (ferroceno)	EIS	0,1-10 nmol L^{-1}	20,0 pmol L^{-1}	(ABU-ALI et al., 2020)
GCE/ Au₁Pt₃NP / Poli (L-metionina)	DPV	0,5–200 $\mu\text{mol L}^{-1}$	0,07 $\mu\text{mol L}^{-1}$	(ZHANG et al., 2020)
OEET / MCH / Aptâmero	SWV	5-70 $\mu\text{mol L}^{-1}$	1 $\mu\text{mol L}^{-1}$	(LIANG et al., 2020)
ITO/[PEI/(MAO-B/POPG:4DPPG)]₇	Aperometria	1,4-1000 $\mu\text{mol L}^{-1}$	0,86 $\mu\text{mol L}^{-1}$	(MIYAZAKI et al., 2016)
Au/11-Mua/PEI/ AuNP-GS-FAD	DPV	0,8–8,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$	0,525 $\mu\text{mol L}^{-1}$	Este trabalho

A partir dos dados apresentados na Tabela 11 é possível comparar os valores de LOD e faixa de trabalho linear de biossensores reportados na literatura com os valores obtidos em neste trabalho. Cerca de metade dos 15 trabalhos encontrados utilizam a técnica de DPV para detecção de DA, mesma técnica utilizada neste trabalho. Quatro dos artigos relatam a utilização da técnica de SWV e as técnicas de amperometria, EIS e VC são representadas cada uma por um trabalho. Com exceção da técnica de VC, todas possuem sensibilidade semelhante à DPV.

Alguns trabalhos apresentam LOD bastante baixos, na ordem de nano e pico molar, como é o caso do biossensor desenvolvido por Jin et al (2018), Wei et al (2019) e Abu-Ali et al (2020). Destaca-se que estes autores utilizam técnicas eletroquímicas bastante sensíveis, além de biomoléculas que possuem alta sensibilidade ao analito, tais como os aptâmeros e anticorpos, e nanomateriais com grande capacidade de condutividade elétrica como o grafeno.

O dispositivo proposto neste trabalho apresentou LOD de 0,525 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Este valor está acima dos LODs da maioria dos artigos encontrados na literatura. No entanto, destaca-se que ele que é capaz de detectar a presença de DA em amostras biológicas, em grande parte da faixa de variação das concentrações de DA no sangue (0,1 e 1,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$), além de também poder quantificar concentrações de DA em amostras farmacêuticas por possuir uma faixa de trabalho linear que vai até 8,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Adicionalmente, destaca-se que biossensor proposto apresentou LOD menor do que o trabalho de Guo et al (2020), Liang et al (2020) e do que um trabalho anteriormente publicado pelo nosso grupo de pesquisa (MIYAZAKI et al, 2016), sendo esse último um biossensor enzimático

que utilizou 7 bicamadas de MAO-b e fosfolipídios, o que encarece o dispositivo. O biossensor proposto aqui, por outro lado, utiliza apenas uma camada de AuNP-GS funcionalizadas com FAD, que é um cofator 62x mais barato que a enzima MAO, além de diminuir o tempo de fabricação por possuir uma arquitetura mais simples.

5.8. REPETIBILIDADE *INTER-DAY*

A repetibilidade de um método é dada pela concordância entre as diversas medições de um mesmo analito, com a execução de um mesmo procedimento, utilizando o mesmo equipamento de medição, mesmo operador, mesmo local e mesmas condições de operação em um curto período de tempo (INMETRO, 2012). A repetibilidade pode ser expressa pelo desvio padrão relativo (RSD) das medidas, a partir da média aritmética dos resultados obtidos para cada uma das adições de concentrações diferentes ao branco da amostra.

O cálculo do RSD é realizado a partir da Equação 9:

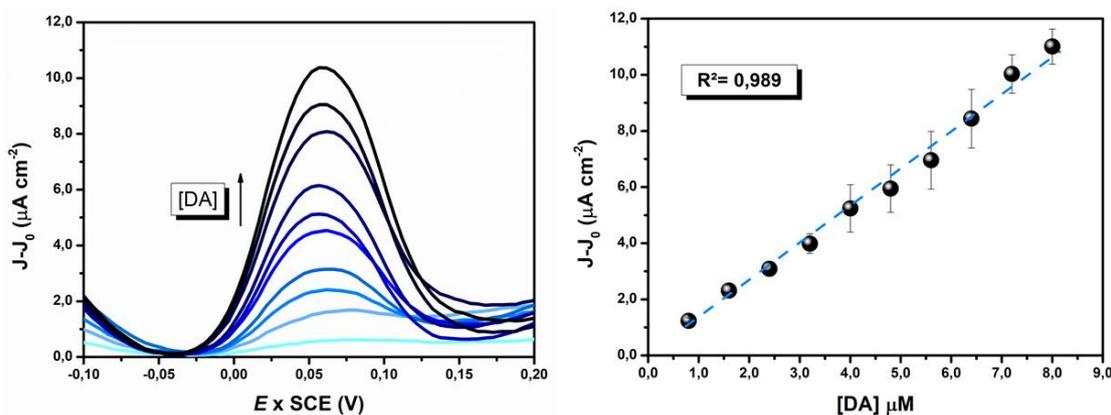
$$RSD = \frac{SD}{\bar{x}} \times 100 \quad \text{Equação 9}$$

Sendo \bar{x} a média aritmética dos valores obtidos em cada uma das adições de concentrações, e SD o desvio padrão. Os valores de RSD devem ser inferiores à 15% para que o método seja considerado preciso (RIBANI; et al., 2004).

A fim de avaliar a repetibilidade do método proposto, foram realizadas detecções DA em 3 dias diferentes. Em cada dia um novo eletrodo foi fabricado seguindo o mesmo protocolo descrito na seção de 4.5.3., tornando todas as medições independentes, pois em cada dia foram realizadas todas as etapas do trabalho, com exceção da síntese das AuNPs. As medidas foram todas realizadas em tampão PBS, pH 7,4, com concentrações de DA que variaram em um faixa de trabalho de 0,8 a 8,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$.

A Figura 47(A) representa as curvas derivadas da medida de DPV, com aumento da corrente de pico anódica regado pelo aumento da concentração de DA e a Figura 47(B) representa o gráfico de calibração com base na faixa linear de experimentos de detecção que foram realizados em 3 dias diferentes. A reta gerada pela equação linear é expressa como $I_{pa} = (1,35 \times 10^{-5}) \times [DA] + (-1,24 \times 10^{-7})$, $R^2 = 0,989$.

Figura 47: (A) Detecção de DA por DPV em tampão fosfato pH 7.4, nas concentrações de 0,8 a 8,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Parâmetros: *step*: 5mV, *modulation amplitude*: 90mV, *modulation time*: 50 ms. (B) Curva de calibração para as diversas concentrações de DA com valor de R^2 e o erro da medida.



A Tabela 12 apresenta os valores de *RSD* para cada uma das adições realizadas nos três dias de experimento. É possível observar que os valores obtidos foram baixos, quase todos os valores inferiores à 15%, com exceção da medida realizada com concentração de 4,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ que apresentou valor de 16,1%. Portanto, verifica-se que o biossensor produzido com Au/11-Mua/PEI/AuNP-FAD apresenta boa repetibilidade, indicando que o método de fabricação proposto é reprodutível e preciso.

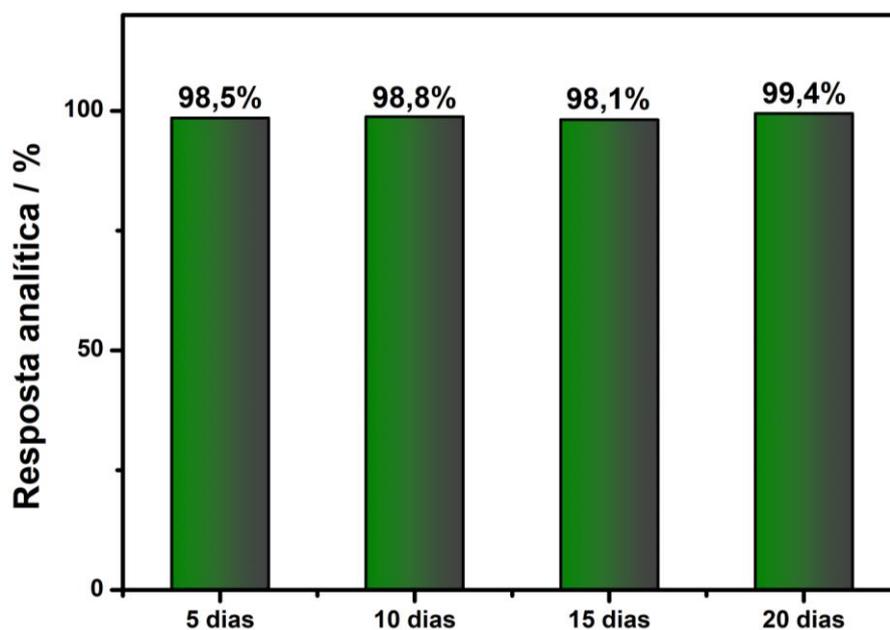
Tabela 13: Valores de *RSD* para cada uma das concentrações de DA das medidas realizadas em 3 dias diferentes.

[DA] x 10^{-6} mol L ⁻¹	RSD
0,8	8,97%
1,6	8,66%
2,4	7,75%
3,2	8,76%
4	16,1%
4,8	14,3%
5,6	14,8%
6,4	12,4%
7,2	6,85%
8	5,68%

5.9. TESTE DE ESTABILIDADE

A estabilidade do biossensor foi estudada em um período de 20 dias. Para essa finalidade foram fabricados 5 biossensores no mesmo dia e todos foram armazenados em temperatura ambiente, imersos em tampão PBS, pH 7,4. Os dispositivos foram testados em sua capacidade sensorial com a técnica de DPV, sob as mesmas condições das detecções anteriores, com concentrações fixas de DA $1,6 \text{ mol L}^{-1}$. A fim de comparar o desempenho do biossensor após dias de armazenamento, o valor da corrente de pico obtida com a detecção no dia primeiro dia de fabricação dos biossensores foi definida como 100%. Na Figura 48 verifica-se que a estabilidade do biossensor manteve-se ao longo dos dias, com as respostas analíticas variando entre 98,1 e 99,4%. Esses valores caracterizam o dispositivo proposto como estável durante o período de estudo.

Figura 48: Gráfico do estudo de estabilidade do biossensor para 5, 10, 15 e 20 dias de armazenamento em tampão PBS, pH 7,4.



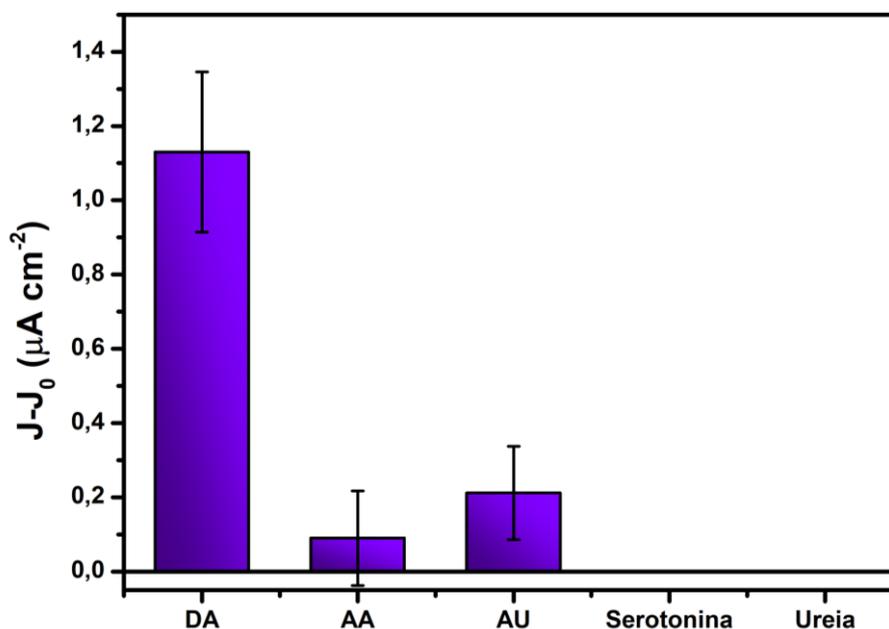
5.10. TESTE DE INTERFERENTES

A seletividade pode ser descrita como a preferência de um sensor em interagir com um analito em detrimento de outros. Quanto mais seletivo for um biossensor menos o resultado a sua detecção será afetado por outros componentes de uma amostra

complexa. Na eletroquímica consideramos que um componente pode ser considerado um interferente quando ele possui potencial de oxidação ou redução semelhante e corrente de pico igual ou maior para concentrações correspondentes ao analito de interesse. O grau máximo da seletividade é chamado de especificidade, quando não há interferência de nenhum componente da amostra na detecção (VESSMAN et al., 2001).

A detecção de DA pode ser afetada pela presença de alguns interferentes, por esse motivo a seletividade do biossensor foi estudada através da exposição ao ácido ascórbico (AA), ácido úrico (AU), serotonina e ureia. Os quatro possíveis interferentes estudados são encontrados na urina humana, amostra real utilizada para a detecção de DA neste trabalho. A Figura 49 apresenta a resposta na corrente de pico anódico gerada pelo biossensor na presença de $0,8 \mu\text{mol L}^{-1}$ de DA e $5 \mu\text{mol L}^{-1}$ de AA, AU, serotonina e ureia, cada interferente foi medido separadamente e posteriormente foi adicionada a DA, sob condições de tampão PBS, pH 7,4, com a técnica de DPV.

Figura 49: Gráfico da comparação da corrente de pico gerada pela interação do biossensor com a DA e os possíveis interferentes AA, AU, serotonina e ureia.

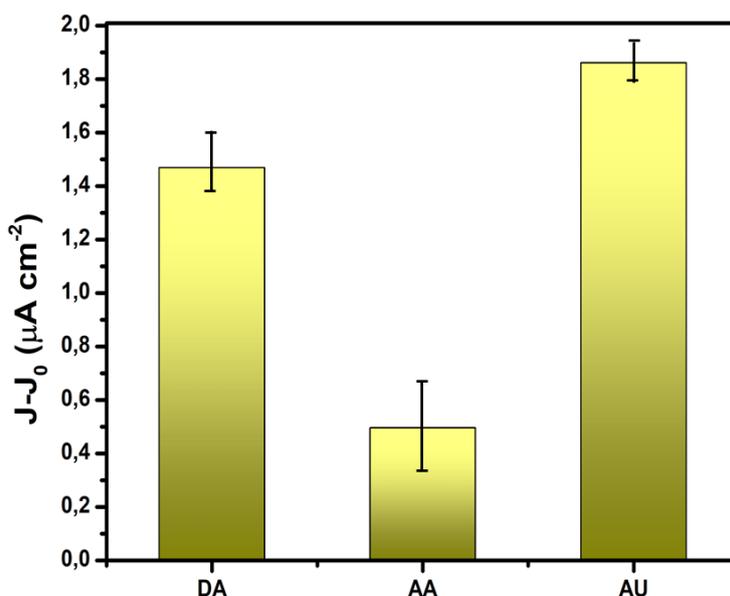


A resposta gerada pelo AA corresponde à 2% da resposta gerada por DA, enquanto que o AU gerou uma resposta correspondente à apenas 8% da resposta de DA. Por outro lado, a serotonina e a ureia não apresentaram pico de oxidação no mesmo potencial de DA (0,05 V). A serotonina foi detectada pelo biossensor proposto no potencial de 0,3 V e a ureia não apresentou nenhum pico de oxidação na faixa de potencial

estudada (-0,2 a 0,5 V). Por essa razão nenhum dos componentes da urina estudados foi considerado um interferente significativo para a DA. Pode-se então afirmar que o biossensor proposto possui alta seletividade à DA.

Como intuito de testar a seletividade do dispositivo, foi realizado o estudo da detecção de DA, AA e AU no substrato de ouro puro, bem como na arquitetura, sem a funcionalização com FAD: Au/11-Mua/PEI/AuNP-GS. A Figura 50 ilustra o desempenho analítico na detecção das 3 moléculas com o substrato de ouro. A DA foi testada em concentração de $0,8 \mu\text{mol L}^{-1}$ e $1,6 \mu\text{mol L}^{-1}$ de AA e AU.

Figura 50: Gráfico da comparação da densidade de corrente gerada pela interação do substrato de ouro com a DA ($0,8 \mu\text{mol L}^{-1}$) e os possíveis interferentes AA e AU ($1,6 \mu\text{mol L}^{-1}$).

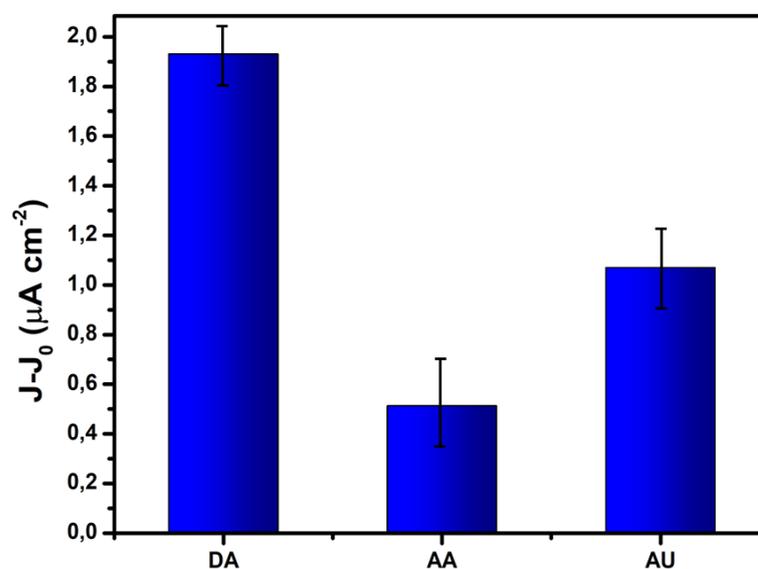


Na Figura 50 é possível observar que não existe seletividade do ouro pela DA. A concentração de $1,6 \mu\text{mol L}^{-1}$ de AA apresentou 33,7% da resposta analítica de $0,8 \mu\text{mol L}^{-1}$ de DA e o AU apresentou 127% da resposta de DA. Dessa maneira é possível concluir que o ouro possui grande afinidade pelo AA e AU e não é capaz de detectar seletivamente a DA em amostras complexas.

Na Figura 51 está ilustrada a densidade de corrente gerada pela detecção de $0,8 \mu\text{mol L}^{-1}$ e $1,6 \mu\text{mol L}^{-1}$ de AA e AU no dispositivo com a arquitetura Au/11-Mua/PEI/AuNP-GS, sem a funcionalização com FAD. Neste gráfico verifica-se que a seletividade do sensor pela DA aumenta em relação ao ouro puro. O AA e o AU

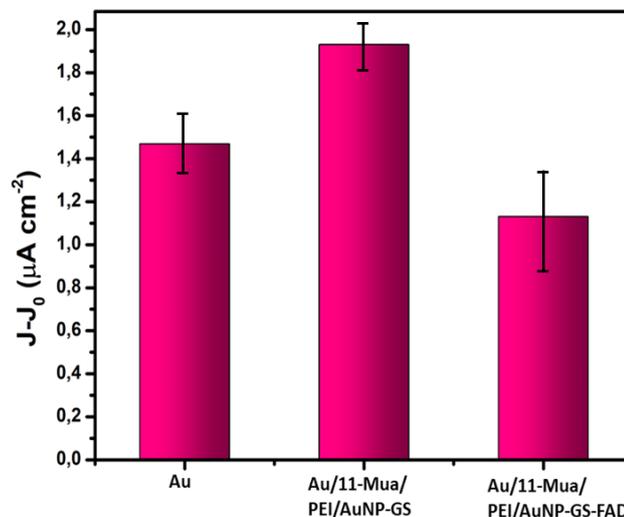
apresentaram respectivamente 26 e 55% da resposta analítica da DA. No entanto, essa resposta ainda é elevada, considerando que em amostras complexas o AA e AU irão contribuir para superestimar a concentração de DA durante a detecção eletroquímica pela metodologia testada.

Figura 51: Gráfico da comparação da densidade de corrente gerada pela interação do dispositivo Au/11-Mua/PEI/AuNP-GS com a DA ($0,8 \mu\text{mol L}^{-1}$) e os possíveis interferentes AA e AU ($1,6 \mu\text{mol L}^{-1}$).



Por fim, foram comparados os desempenhos dos 3 dispositivos: (i) ouro puro, (ii) Au/11-Mua/PEI/AuNP-GS e (iii) Au/11-Mua/PEI/AuNP-GS-FAD na detecção de $0,8 \mu\text{mol L}^{-1}$ de DA, ilustrado na Figura 52. Verifica-se que o desempenho do dispositivo proposto neste trabalho, funcionalizado com o FAD é o menor entre os 3 testados, apresentando 77 e 58% da densidade de corrente do ouro puro e do Au/11-Mua/PEI/AuNP-GS, respectivamente.

Figura 52: Comparação da densidade de corrente gerada pela interação de DA com os dispositivos: ouro puro, Au/11-Mua/PEI/AuNP-GS e Au/11-Mua/PEI/AuNP-GS-FAD.



A partir dos dados aqui apresentados é possível verificar que o desempenho da detecção da DA pelo dispositivo funcionalizado com o FAD é prejudicado em relação à sua densidade de corrente, possivelmente devido ao comprometimento da transferência de carga na interface eletrodo-solução pela presença da molécula biológica. No entanto, em relação à sua seletividade, o dispositivo proposto possui desempenho melhorado, apresentando preferência na interação com a DA, mesmo sendo exposto a altas concentrações de AA e AU como demonstrado na Figura 49. A seletividade é uma característica almejada no desenvolvimento de biossensores, em especial para aplicação em amostras complexas como será apresentado na próxima seção.

5.11. AMOSTRA REAL

A exatidão da medida é definida pelo grau de concordância entre a medida na amostra real e o valor esperado, para concentrações determinadas do analito. Deve-se usar no mínimo 3 concentrações diferentes da curva de calibração, sendo uma baixa, uma média e uma alta, cada uma em triplicata. A exatidão é expressa pelos valores de recuperação que irão demonstrar a proximidade dos resultados obtidos na medida de amostra com os valores verdadeiros (ANVISA, 2017). A recuperação é calculada pela Equação 10:

$$\text{Recuperação} = \frac{\text{concentração média experimental}}{\text{concentração teórica}} \times 100 \quad \text{Equação 10}$$

Quanto mais próximo de 100%, mais exato será considerado o método, no entanto, são considerados valores entre 80% e 120%. A variação na porcentagem de recuperação tem relação com o efeito matriz da amostra biológica. Os componentes de uma matriz complexa podem interferir na seletividade e na sensibilidade do método analítico, reduzindo ou aumentando os valores de recuperação (ANVISA, 2003; MELO; SOUZA, 2015).

A fim de testar a detecção do biossensor em uma matriz complexa, e checar a exatidão da metodologia proposta foram realizadas as medidas de detecção em amostras de urina humana. A urina foi centrifugada à 5000 rpm por 30 minutos, com o objetivo de separar partículas maiores da suspensão, pelo fato de células do epitélio do sistema urinário interferirem na detecção eletroquímica. O sobrenadante foi diluído 10 vezes em tampão PBS, pH 7,4, e foi realizada a adição de DA à essa mistura. A amostragem de hormônios e seus metabólitos em urina se mostra desejável por ser uma amostra que é, na maioria das vezes, não invasiva, em comparação com o sangue.

Foram realizadas 3 adições da amostra real para detecção de DA, nos valores de 2,4, 4,0 e 8,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$, sendo realizadas em triplicata. A Tabela 13 apresenta os valores de recuperação obtidos para cada uma das adições de DA com a amostra real, sob as mesmas condições da detecção *intraday* e *interday*.

Tabela 14: Resultados de recuperação do método para detecção de DA nas concentrações em 2,4, 4,0 e 8,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ em urina humana.

[DA] $\mu\text{mol L}^{-1}$	Recuperação	RSD
2,4	85%	6,8%
6,4	87%	8,0%
8,0	90%	1,4%

A partir da Tabela 11 verifica-se que o dispositivo desenvolvido possui capacidade de detecção de DA em amostras biológicas, pois apresenta valores de recuperação que variam entre 85 e 90%. Adicionalmente os baixos valores de RSD, que ficaram entre 1,4 e 8,0% demonstram a boa repetibilidade dos resultados de detecção obtidos em matriz complexa. Dessa maneira o método desenvolvido pode ser considerado exato.

6. CONCLUSÃO

A detecção de DA é de grande interesse clínico por ser um bom biomarcador para doenças como a doença de Parkinson e a esquizofrenia que afetam milhões de pessoas ao redor do mundo. A DA é um neurotransmissor produzido em diversas partes do cérebro e degradado pela enzima MAO. O FAD é o cofator presente no sítio ativo da MAO e responsável pela transferência de elétrons durante a reação de oxidação da DA.

Neste trabalho foi possível testar a detecção de DA através de um biossensor que utiliza o FAD como biorreceptor para a DA, e AuNPs, o polieletrólito catiônico PEI, o alcanotiol 11-Mua e o substrato de ouro como transdutores de sinal. A síntese das AuNPs estabilizadas com GSH foi confirmada pela técnica de espectroscopia de UV-Vis e FTIR. A ancoragem do FAD nas AuNP-GS foi evidenciada pelas técnicas de espectroscopia de UV-Vis, Fluorescência e FTIR. A modificação do substrato de ouro com o 11-Mua, PEI e AuNP-GS-FAD foi monitorada pelas técnicas de espectroscopia de UV-Vis, FTIR, AFM, e VC.

O biossensor desenvolvido foi testado através da técnica de DPV e apresentou limite de detecção de $0,525 \mu\text{mol L}^{-1}$, limite de quantificação de $1,75 \mu\text{mol L}^{-1}$ e sensibilidade de $1,25 \mu\text{A} / \mu\text{mol L}^{-1} \text{cm}^{-2}$, com faixa linear de trabalho de $0,8-8,0 \mu\text{mol L}^{-1}$. A detecção de DA também foi testada em amostra de urina humana e os valores de recuperação encontrados ficaram entre 85-90%. Esses resultados indicam que a metodologia desenvolvida é capaz de detectar a presença de DA em amostras biológicas e quantificar concentrações de DA em amostras farmacêuticas. Além disso o biossensor foi estudado com base em sua repetibilidade *intraday* e *interday* demonstrando ser um método reprodutível. O dispositivo também apresentou boa estabilidade, de até 20 dias, com respostas analíticas semelhantes ao do primeiro dia. Adicionalmente o biossensor foi considerado seletivo para DA ao ser testado na presença de altas concentrações de possíveis interferentes presentes na urina humana, como o ácido úrico, ácido ascórbico, serotonina e ureia.

Ressalta-se que a arquitetura desenvolvida neste trabalho é inédita e não se limita apenas a detecção de DA já que durante o texto de interferentes foi possível detectar a serotonina em um potencial de 0,3 V, o que coloca em perspectiva a detecção simultânea de neurotransmissores. Dessa maneira é possível afirmar que a metodologia desenvolvida possui boa perspectiva de aplicação em amostras biológicas e farmacêuticas, contribuindo

para a melhora dos tratamentos fornecidos à pacientes com esquizofrenia, e limitando o agravamento do quadro clínico desses pacientes.

REFERENCIAS

- A. ABI-DARGHAM , R. GIL , J. KRYSTAL , R. BALDWIN , J. SEIBYL , M. BOWERS , C. VAN DYCK , D. CHARNEY , R. INNIS, M. L. Increased striatal dopamine transmission in schizophrenia: confirmation in a second cohort. **Am. J. Psychiatry**, v. 155, p. 761–767, 1998.
- A. E., L.; A. M., L. Parkinson's Disease. **Academic Medicine**, v. 339, n. 16, p. 1130–1143, 1998.
- ABHIGYAN SENGUPTA, RAHUL V.KHADE, P. H. pH dependent dynamic behavior of flavin mononucleotide (FMN) and flavin adenine dinucleotide (FAD) in femtosecond to nanosecond time scale. **Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry**, v. 221, n. 1, p. 105–112, 2011.
- ABTAHI, S. M. H. **Synthesis and characterization of metallic nanoparticles with photoactivated surface chemistries**. [s.l.] Virginia Polytechnic Institute and State University, 2013.
- ABU-ALI, H. et al. Electrochemical Aptasensor for Detection of Dopamine. **Chemosensors**, v. 8, n. 2, p. 28, 2020.
- ALEIXO, L. M. Voltametria: Conceitos e Técnicas. **Chemkeys**, p. 1–21, 2003.
- AMENDOLA, V.; MENEGHETTI, M. Size Evaluation of Gold Nanoparticles by UV–vis Spectroscopy. **J. Phys. Chem. C**, v. 113, n. 11, p. 4277–4285, 2009.
- ANVISA. **Dispõe sobre a validação de métodos analíticos e dá outras providências. RESOLUÇÃO RDC Nº 166, DE 24 DE JULHO DE 2017. DOU 25/07/2017, Ed. 141, seção 1, p. 87.**, [s.d.].
- ANVISA. **Resolução RDC nº 360, 23 de dezembro de 2003**, 2003. Disponível em: <em:%3Chttp://portal.anvisa.gov.br/documents/33880/2568070/res0360_23_12_2003.pdf/5d4fc713-9c66-4512-b3c1-afee57e7d9bc>
- ARYA, UNIL K. et al. Cholesterol biosensor based on N-(2-aminoethyl)-3-aminopropyl-trimethoxysilane self-assembled monolayer. **Analytical Biochemistry**, v. 363, n. 2, p. 210–218, 2007.

ATKINS, P.; PAULA, J. DE. **ATKINS' PHYSICAL CHEMISTRY**. 8^a ed. New York: W. H. Freeman and Company New York, 2006.

BARBETA, V. B. et al. Magnetic properties of Fe₃O₄ nanoparticles coated with oleic and dodecanoic acids. **Journal of Applied Physics**, v. 107, p. 073913, 2010.

BARD, A. J.; FAULKNER, L. R. **Electrochemical methods. Fundamentals and Applications**. 2. ed. [s.l: s.n.].

BARROSA, A. DE et al. High performance of electrochemical sensors based on LbL films of gold nanoparticles, polyaniline and sodium montmorillonite clay mineral for simultaneous detection of metal ions. **Electrochimica Acta**, v. 235, p. 700–708, 2017.

BARTCZAK, D.; KANARAS, A. G. Preparation of Peptide-Functionalized Gold Nanoparticles Using One Pot EDC/Sulfo-NHS Coupling. **Langmuir**, v. 27, n. 16, p. 10119–10123, 2011.

BASU, S. et al. Biomolecule induced nanoparticle aggregation: Effect of particle size on interparticle coupling. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 313, n. 2, p. 724–734, 2007.

BECHERI, A. et al. Synthesis and characterization of zinc oxide nanoparticles: application to textiles as UV-absorbers. **Journal of Nanoparticle Research**, v. 10, p. 679–689, 2007.

BEITOLLAHI, H.; SAFAEI, M.; TAJIK, S. Different Electrochemical Sensors for Determination of Dopamine as Neurotransmitter in Mixed and Clinical Samples: A Review. **Analytical and Bioanalytical Chemistry Research**, v. 6, n. 1, p. 81–96, 2019.

BENITES, T. A. et al. EFEITOS DA RUGOSIDADE SUPERFICIAL NAS PROPRIEDADES DE PASSIVAÇÃO DE MONOCAMADAS ORGÂNICAS AUTOMONTADAS. **Quim. Nova**, v. 37, n. 9, p. 1533–1537, 2014.

BHADRA, P. et al. Studies on varying n-alkanethiol chain lengths on a gold coated surface and their effect on antibody– antigen binding efficiency. **RSC Advances**, v. 5, n. 98, p. 80480, 2015.

BINDA, C. et al. Structure of human monoamine oxidase B , a drug target for the treatment of neurological disorders. v. 9, n. 1, 2002.

BRETT, C. M. A. . A. M. O. B. **ELECTROCHEMISTRY Principles, Methods, and Applications**. 1^a ed. ed. New York: Oxford University Press Inc., 1993.

BYUNG-KEUNOH, YOUNG-KEEKIM, KWANG WONPARKA, WON HONGLEE,

- J.-W. Surface plasmon resonance immunosensor for the detection of Salmonella typhimurium. **Bioelectronics, Biosensors and**, v. 19, n. 11, p. 1497–1504, 2004.
- CALLIER, S. et al. Evolution and cell biology of dopamine receptors in vertebrates. **Biology of cell**, v. 95, p. 489–502, 2003.
- CAO, G. **Nanostructures & Nanomaterials synthesis, properties & applications**. London: Imperial College Press, 2004.
- CARVALHAL, R. F. **DESENVOLVIMENTO DE SENSOR BIOMIMÉTICO EMPREGANDO MONOCAMADAS AUTO-ORGANIZADAS DE TIÓIS SOBRE ELETRODOS DE OURO**. [s.l.] Universidade Estadual de Campinas, 2005.
- CECILIA LETE, BORIS LAKARD, JEAN-YVES HIHN, FRANCISCO JAVIER DEL CAMPO, S. L. Use of sinusoidal voltages with fixed frequency in the preparation of tyrosinase based electrochemical biosensors for dopamine electroanalysis. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 240, p. Pages 801-809, 2017.
- CHAI, F. et al. Colorimetric Detection of Pb²⁺ Using Glutathione Functionalized Gold Nanoparticles. **ACS Appl. Mater. Interfaces**, v. 2, n. 5, p. 1466–1470, 2010.
- CHI, T. et al. **Surface Texture Analysis Using Dektak Stylus Profilers Veeco Instruments Inc**, 2004.
- CIVELLI, O.; BUNZOW, J. R.; GRANDY, D. K. Molecular diversity of the dopamine receptors. **Annu Rev Pharmacol Toxicol** ., v. 32, p. 281–307, 1993.
- COSTA, D. S. **BIOCONJUGAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE OURO COM PEPTÍDEOS SINTÉTICOS BASEADOS EM SEQUÊNCIAS IMUNOGÊNICAS DE NS1 ORIUNDAS DOS VÍRUS DENGUE TIPO I, II, III E IV**. [s.l.] UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO, 2017.
- DA SILVA, R. P., LIMA, A. W. O., & SERRANO, S. H. P. Simultaneous voltammetric detection of ascorbic acid, dopamine and uric acid using a pyrolytic graphite electrode modified into dopamine solution. **Analytica Chimica Acta**, v. 612, n. 1, p. 89–98, 2008.
- DANIEL, M.-C.; ASTRUC, D. Gold Nanoparticles: Assembly, Supramolecular Chemistry, Quantum-Size-Related Properties, and Applications toward Biology, Catalysis, and Nanotechnology. **Chem. Rev.**, v. 104, n. 1, p. 293–346, 2004.
- DAVID L. NELSON; MICHAEL M. COX. **Princípios de Bioquímica Lehninger**. 6^a edição ed. [s.l.] artmed, 2014.
- DECHER, G. Fuzzy Nanoassemblies: Toward Layered Polymeric Multicomposites.

Science, v. 277, n. 5330, p. 1232–1237, 1997.

DELFINO, I. et al. Dynamical and structural properties of flavin adenine dinucleotide in aqueous solutions and bound to free and sol–gel immobilized glucose oxidase. **Journal of Sol-Gel Science and Technology**, v. 82, p. 239–252, 2017.

DHAND, C. et al. Polyaniline–carbon nanotube composite film for cholesterol biosensor. **Analytical Biochemistry**, v. 383, n. 2, p. 194–199, 2008.

DIAS, F. R. F. .; FERREIRA, V. F. .; CUNHA, A. C. Uma Visão Geral dos Diferentes Tipos de Catálise em Síntese Orgânica. **Rev. Virtual Quim.**, v. 4, n. 6, p. 840–871, 2012.

DIJKMAN, W. P. et al. Flavoprotein oxidases: classification and applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 97, p. 5177–5188, 2013.

DING, Z. et al. Production and characterization of laccase from *Pleurotus ferulae* in submerged fermentation. **Annals of Microbiology**, v. 64, p. 121–129, 2014.

DOUGLAS E. CAMILO, CELINA M. MIYAZAKIA, FLÁVIO M. SHIMIZU, M. F. Improving direct immunoassay response by layer-by-layer films of gold nanoparticles – Antibody conjugate towards label-free detection. **Materials Science & Engineering C**, v. 102, p. 315–323, 2019.

E.S.GADELMAWLA et al. Roughness parameters. **Journal of Materials Processing Technology**, v. 123, n. 1, p. 133–145, 2002.

EDMUND R. MALINOWSKI, MICHAEL J. BARBER, GRAHAM T. WHITAKER, E. T. S. Factor analysis of spectroelectrochemical reduction of FAD reveals the pK_a of the reduced state and the reduction pathway. **J. Chemometrics**, v. 21, p. 520–528, 2007.

F.DE, L. L. et al. Layer-by-Layer nanostructured films of magnetite nanoparticles and polypyrrole towards synergistic effect on methylparaben electrochemical detection. **Applied Surface Science**, v. 505, p. 144278, 2020.

FELISMINA T. C. MOREIRA, ROSA A. F. DUTRA, JOÃO P. C. NORONHA, M. G. F. S. Electrochemical biosensor based on biomimetic material for myoglobin detection. **Electrochimica Acta**, v. 107, p. 481–487, 2013.

FERNANDO V. PAULOVICH, MARLI L. MORAES, RAFAEL MITSUO MAKI, MARYSTELA FERREIRA, O. N. O. J.; OLIVEIRA, AND M. C. F. DE. Information visualization techniques for sensing and biosensing. **Analyst**, v. 136, n. 7, p. 1344–1350, 2011.

FLÁVIO C. BEDATTY FERNANDES, P. R. B. Optimized electrochemical biosensor

for human prostatic acid phosphatase. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 253, p. 1106–1112, 2027.

FREDERIX, F. et al. Biosensing Based on Light Absorption of Nanoscaled Gold and Silver Particles. **Anal. Chem.**, v. 75, n. 24, p. 6894–6900, 2003.

FU, C. et al. Ultrasensitive sandwich-like electrochemical biosensor based on core-shell Pt@CeO₂ as signal tags and double molecular recognition for cerebral dopamine detection. **TALANTA**, v. 223, p. 121719, 2019.

GABRIELE NELLES, HOLGER SCHÖNHERR, MANFRED JASCHKE, HEIKO WOLF, MATTHIAS SCHAUB, JÖRG KÜTHER, WOLFGANG TREMEL, ERNST BAMBERG, HELMUT RINGSDORF, AND H.-J. B. Two-Dimensional Structure of Disulfides and Thiols on Gold(111). **Langmuir**, v. 14, n. 4, p. 808–815, 1998.

GRIESHABER, D., ET AL. Electrochemical Biosensors - Sensor Principles and Architectures. **Sensors (Basel)**, v. 8, n. 3, p. 1400–1458, 2008.

GUO, T. et al. A Novel Ratiometric Electrochemical Biosensor Based on a Split Aptamer for the Detection of Dopamine with Logic Gate Operations. **Phys. Status Solidi**, v. 217, p. 1900924, 2020.

GUYTON, A. C.; HALL, J. E. . **Medical physiology**. 13^a ed. Philadelphia: Elsevier Inc, 2016.

HODA ILKHANI, S. F. A novel electrochemical DNA biosensor for Ebola virus detection. **Analytical Biochemistry**, v. 557, p. 151–155, 2018.

HOSSEINI, H. et al. A novel electrochemical sensor based on metal-organic framework for electro-catalytic oxidation of L-cysteine. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 42, p. 426–429, 2013.

HOWES, O. D.; KAPUR, S. The dopamine hypothesis of schizophrenia: version III--the final common pathway. **Schizophr Bull**, v. 35, n. 3, p. 549–562, 2009.

HRAPOVIC, S. et al. New Strategy for Preparing Thin Gold Films on Modified Glass Surfaces by Electroless Deposition. **Langmuir**, v. 19, n. 9, p. 3958–3965, 2003.

HU, K. et al. A carbon nanotubes based fluorescent aptasensor for highly sensitive detection of adenosine deaminase activity and inhibitor screening in natural extracts. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, v. 95, p. 164–168, 2014.

HUANG, Y. et al. Selective removal of mercury ions using thymine-grafted electrospun polymer nanofibers. **New Journal of Chemistry**, v. 38, n. 4, p. 1533–1539, 2014.

IKEBUKURO, N. S. Y. T. K. T. H. H. M. T. K. A. W. Y. S. F. S. K. K. S. K. Simultaneous improvement of specificity and affinity of aptamers against *Streptococcus mutans* by in silico maturation for biosensor development. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 111, n. 3, p. 454–461, 2014.

INMETRO. **VIM - Vocabulário Internacional de Metrologia: conceitos fundamentais e gerais e termos associados**. 1ª Edição ed. Duque de Caxias: [s.n.].

ISHIDA, T. et al. Importance of Size and Contact Structure of Gold Nanoparticles for the Genesis of Unique Catalytic Processes. **Chem. Rev.**, v. 120, n. 2, p. 464–525, 2020.

JARZABEK, G.; ZOFIA BORKOWSKA. On the real surface area of smooth solid electrodes. **Electrochimica Acta**, v. 19, p. 2915–2918, 1997.

JAVIER GALBÁN, ISABEL SANZ-VICENTE, J. N. AND S. DE M. The intrinsic fluorescence of FAD and its application in analytical chemistry: a review. **Methods Appl. Fluoresc.**, v. 4, n. 4, p. 042005, 2016.

JENCY, D. A. et al. Glutathione Functionalized Gold Nanoparticles as Efficient Surface Enhanced Raman Scattering Substrate for Poly Chlorinated Biphenyl Detection. **Journal of Cluster Science**, v. 28, p. 281–287, 2018.

JIN, H. et al. Reduced graphene oxide/nile blue/gold nanoparticles complex-modified glassy carbon electrode used as a sensitive and label-free aptasensor for ratiometric electrochemical sensing of dopamine. **Analytica Chimica Acta**, v. 1025, p. 154–162, 2018.

JOÃO H. COELHO, ANA P.P. EISELE, CAMILA F. VALEZI, GABRIEL J. MATTOS, J. G. S.; ROBERT F.H. DEKKER, ANELI M. BARBOSA-DEKKER, E. R. S. Exploring the exocellular fungal biopolymer botryosphaeran for laccasebiosensor architecture and application to determine dopamine and spironolactone. **Talanta**, v. 204, p. 475–483, 2019.

JOHANNA BRAZARD et al. New Insights into the Ultrafast Photophysics of Oxidized and Reduced FAD in Solution. **J. Phys. Chem. A**, v. 115, n. 15, p. 3251–3262, 2011.

JÖRGEN VESSMAN et al. SELECTIVITY IN ANALYTICAL CHEMISTRY. **Pure Appl. Chem.**, v. 73, n. 8, p. 1381–1386, 2001.

JUCAITE, A. Dopaminergic modulation of cerebral activity and cognitive functions. **Medicina (Kaunas)** ., v. 38, n. 4, p. 357–362, 2002.

JUNQUEIRA, L. C. U.; CARNEIRO, J. **Biologia celular e molecular**. 9. ed. Rio de

Janeiro: Guanabara, 2012.

K.BAKHSHI; S.A.CHANCE. The neuropathology of schizophrenia: A selective review of past studies and emerging themes in brain structure and cytoarchitecture. **Neuroscience**, v. 303, p. 82–102, 2015.

KETEKLAHIJANI, Y. Z. et al. Enhanced Sensitivity of Dopamine Biosensors: An Electrochemical Approach Based on Nanocomposite Electrodes Comprising Polyaniline, Nitrogen-Doped Graphene, and DNA-Functionalized Carbon Nanotubes. **J. Electrochem. Soc.**, v. 166, p. B1415, 2019.

KHASHAYAR, P. et al. An Electrochemical Biosensor Based on AuNP-Modified Gold Electrodes for Selective Determination of Serum Levels of Osteocalcin. **IEEE Sensors Journal**, v. 17, n. 11, p. 3367–3374, 2017.

KIM, S.-J. et al. CD4+ CD25+ Regulatory T Cell Depletion Modulates Anxiety and Depression-Like Behaviors in Mice. **PLOS ONE**, v. 7, n. 7, p. 1–11, 2012.

KIMLING, J. et al. Turkevich Method for Gold Nanoparticle Synthesis Revisited. **J. Phys. Chem. B**, v. 110, n. 32, p. 15700–15707, 2006.

KOHORI, N. A.; SILVA, M. K. L. DA; CESARINO, I. Evaluation of graphene oxide and reduced graphene oxide in the immobilization of laccase enzyme and its application in the determination of dopamine. **J Solid State Electrochem**, v. 22, p. 141–148, 2018.

KONG, R.-M. et al. An ultrasensitive electrochemical “turn-on” label-free biosensor for Hg²⁺ with AuNP-functionalized reporter DNA as a signal amplifier. **Chemical Communications**, n. 37, p. 5633–5635, 2009.

KUMAR, S. et al. Electrochemical Sensors and Biosensors Based on Graphene Functionalized with Metal Oxide Nanostructures for Healthcare Applications. **ChemistrySelect**, v. 4, n. 18, p. 5322–5337, 2019.

KWON, O. S. ET AL. Conducting Nanomaterial Sensor Using Natural Receptors. **Chemical Reviews**, v. 119, p. 36–93, 2018.

LEITE, F. DE L. **Estudos de filmes de polímeros condutores por microscopia de força atômica: processos de adsorção e propriedades eletrônicas**. [s.l.] Universidade de São Paulo, 2006a.

LEITE, F. L. **Estudos de filmes de polímeros condutores por microscopia de força atômica: processos de adsorção e propriedades eletrônicas**. [s.l.] Universidade de São Paulo, 2006b.

LEUNG, C. M. et al. A review on applications of magnetoelectric composites: from heterostructural uncooled magnetic sensors, energy harvesters to highly efficient power converters. **Journal of Physics D: Applied Physics**, v. 51, p. 263002, 2018.

LEVITT, J. J. et al. A Selective Review of Volumetric and Morphometric Imaging in Schizophrenia. **Behavioral Neurobiology of Schizophrenia and Its Treatment**, v. 4, p. 243–281, 2010.

LI, Z. et al. Fabrication of biosensor based on core–shell and large void structured magnetic mesoporous microspheres immobilized with laccase for dopamine detection. **Journal of Materials Science**, v. 53, p. 7996–8008, 2018.

LIANG, Y. et al. Label-Free Split Aptamer Sensor for Femtomolar Detection of Dopamine by Means of Flexible Organic Electrochemical Transistors. **Materials**, v. 13, n. 11, p. 2577, 2020.

LIEBERMAN, J. A.; SMALL, S. A.; GIRGIS, R. R. Early Detection and Preventive Intervention in Schizophrenia: From Fantasy to Reality. **Am J Psychiatry**, v. 176, n. 10, p. 794–810, 2019.

LIMA, L. F. DE; PEREIRA, E. A.; FERREIRA, M. Electrochemical sensor for propylparaben using hybrid Layer-by-Layer films composed of gold nanoparticles, poly(ethylene imine) and nickel(II) phthalocyanine tetrasulfonate. **SENSORS AND ACTUATORS B-CHEMICAL**, v. 310, p. 127893, 2020.

LIN, K. C.; HUANG, J. Y.; CHEN, S. M. Simultaneous determination of ascorbic acid, dopamine, uric acid and hydrogen peroxide based on co-immobilization of PEDOT and FAD using multi-walled carbon nanotubes. **Anal. Methods**, v. 6, p. 8321–8327, 2014.

LIU, C.-Y. et al. Tyrosinase/Chitosan/Reduced Graphene Oxide Modified Screen-Printed Carbon Electrode for Sensitive and Interference-Free Detection of Dopamine. **Appl. Sci.**, v. 9, n. 4, p. 622, 2019.

LIU, X. et al. Growing TiO₂ nanotubes on graphene nanoplatelets and applying the nanonocomposite as scaffold of electrochemical tyrosinase biosensor. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 209, p. 328–335, 2015.

LIU, Z. et al. Dual molecular recognition strategy for highly sensitive electrochemical detection of dopamine based on amplification of DNA-Au bio-bar codes. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 823, p. 253–260, 2018.

M.A.VALVERDE-ALVA et al. Synthesis of silver nanoparticles by laser ablation in

ethanol: A pulsed photoacoustic study. **Applied Surface Science**, v. 355, p. 341–349, 2015.

M.URS, N.; PETERSON, S. M.; G.CARONABC, M. New Concepts in Dopamine D2 Receptor Biased Signaling and Implications for Schizophrenia Therapy. **Biological Psychiatry**, v. 81, n. 1, p. 78–85, 2017.

M.VARGAS, E. et al. Solid catalysts obtained from wastes for FAME production using mixtures of refined palm oil and waste cooking oils. **Renewable Energy**, v. 136, p. 873–883, 2019.

MARCOS EGUÍLAZ, REYNALDO VILLALONGA, J. M. PINGARRÓN, NANCY F. FERREYRA, G. A. R. Functionalization of bamboo-like carbon nanotubes with 3-mercaptophenylboronic acid-modified gold nanoparticles for the development of a hybrid glucose enzyme electrochemical biosensor. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 216, p. 629–637, 2015.

MARYSTELA FERREIRA, LUIS R. DINELLI, KAREN WOHNATH, ALZIR A. BATISTA, O. N. O. J. Langmuir–Blodgett films from polyaniline/ruthenium complexes as modified electrodes for detection of dopamine. **Thin Solid Films**, v. 446, p. 301–306, 2004.

MEDER, D. et al. The role of dopamine in the brain - lessons learned from Parkinson's disease. **NeuroImage**, v. 190, p. 79–93, 2019.

MELO, M. L. S.; SOUZA, J. R. DE. Imprimir PDF Estudo do efeito de matriz na determinação de metais em óleos básicos rerrefinados por fluorescência de raios X por energia dispersiva. **Química Nova**, v. 38, n. 5, p. 614–621, 2015.

MILLER, J. N.; MILLER, J. C. **Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry**. 5^a ed. London: Pearson/Prentice Hall, 2005.

MIYAZAKI, CELINA MASSUMI, TAMYRIS PASCHOAL PEREIRA, DANIELA BRANCO TAVARES MASCAGNI, M. L. DE M.; FERREIRA, M. Monoamine oxidase B layer-by-layer film fabrication and characterization toward dopamine detection. **Materials Science and Engineering: C**, v. 58, p. 310–315, 2016.

MORAES, ANTONIO RIUL JR, MARYSTELA FERREIRA, DANIELA BRANCO TAVARES MASCAGNIA, CELINA MASSUMI MIYAZAKI, NILSON CRISTINO DA CRUZ, M. L. DE. Layer-by-layer assembly of functionalized reduced graphene oxide for direct electrochemistry and glucose detection. **Materials Science and Engineering:**

C, v. 68, p. 739–745, 2016.

MORAWSKI, F. DE M. et al. A novel electrochemical platform based on mesoporous silica/titania and gold nanoparticles for simultaneous determination of norepinephrine and dopamine. **Materials Science and Engineering: C**, v. 120, p. 111646, 2021.

NATHALIA C. DE LUCENA, CELINA M. MIYAZAKI, F. M. S.; CARLOS J.L. CONSTANTINO, M. F. Layer-by-layer composite film of nickel phthalocyanine and montmorillonite clay for synergistic effect on electrochemical detection of dopamine. **Science, Applied Surface**, v. 436, p. 957–966, 2018.

NICHOLSON, R. S. Theory and Application of Cyclic Voltammetry for Measurement of Electrode Reaction Kinetics. **Anal. Chem.**, v. 37, n. 11, p. 1351–1355, 1965.

NJOKI, P. N. ET AL. Size Correlation of Optical and Spectroscopic Properties for Gold Nanoparticles. **J. Phys. Chem**, v. 111, n. 40, p. 14664–14669, 2007.

OLIVEIRA, R. F., ET AL. **Nanoestruturas, princípios e aplicações. Coleção Nanociência e Nanotecnologia**. 1 ed. ed. Rio de Janeiro: [s.n.].

OPAS. **O que é Mal de Parkinson, Sintomas, Tratamento, Causas e Mais**. Disponível em: <<https://opas.org.br/o-que-e-mal-de-parkinson-sintomas-tratamento-causas-e-mais/>>.

OPAS. **Transtornos mentais - Esquizofrenia e outras psicoses**. Disponível em: <<https://www.paho.org/pt/topicos/transtornos-mentais>>.

ÖZCAN, H. M.; SEZGINTÜRK, M. K. Detection of parathyroid hormone using an electrochemical impedance biosensor based on PAMAM dendrimers. **Biotecnology Progress**, v. 31, n. 3, p. 815–822, 2015.

P.DRÖSSLER, W.HOLZER, A.PENZKOFER, P. H. pH dependence of the absorption and emission behaviour of riboflavin in aqueous solution. **Chemical Physics**, v. 282, n. 3, p. 429–439, 2002.

PACHECO, W. F.;* SEMAAN, F. S.; ALMEIDA, V. G. K.; RITTA, A. G. S. L. .; AUCÉLIO, R. Q. Voltametrias: Uma Breve Revisão Sobre os Conceitos. **Rev. Virtual de Química**, v. 5, n. 4, p. 516–537, 2013.

PADMABATI MONDA, KARNO SCHWINN, M. H.-R. Impact of the redox state of flavin chromophores on the UV–vis spectra, redox and acidity constants and electron affinities. **Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry**, v. 387, p. 112164, 2020.

PANELG.DECHERJ.D.HONGJ.SCHMITT, A. LINKS OPEN OVERLAY. Buildup of ultrathin multilayer films by a self-assembly process: III. Consecutively alternating adsorption of anionic and cationic polyelectrolytes on charged surfaces. **Thin Solid Films**, v. 210–211, p. 831–835, 1992.

PAPAVLU, A. P. et al. Matrix-Assisted Pulsed Laser Evaporation of Organic Thin Films: Applications in Biology and Chemical Sensors. **Laser Ablation - From Fundamentals to Applications**, 2017.

PARNETTI, L. et al. CSF and blood biomarkers for Parkinson's disease. **THE LANCET NEUROLOGY**, v. 18, n. 6, p. 573–586, 2019.

PAVONI, J. F. et al. Uma montagem experimental para a medida de fluorescência. **Revista Brasileira de Ensino de Física**, v. 36, n. 4, p. 4501, 2014.

PHILIP, D. et al. Murraya Koenigii leaf-assisted rapid green synthesis of silver and gold nanoparticles. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 78, n. 2, p. 899–904, 2011.

POWER, A. C. et al. Carbon nanomaterials and their application to electrochemical sensors: a review. **Nanotechnology Reviews**, v. 7, n. 1, p. 19–41, 2017.

RAYMOND P. BRIÑAS, MINGHUI HU, LUPING QIAN, ELENA S. LYMAR, AND J. F. H. Gold Nanoparticle Size Controlled by Polymeric Au(I) Thiolate Precursor Size. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 130, n. 3, p. 975–982, 2008.

RIBANI, M. et al. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, n. 5, p. 771–780, 2004.

RILSTONE, J. J.; ALKHATER, R. A.; MINASSIAN, B. A. Brain dopamine-serotonin vesicular transport disease and its treatment. **New England Journal of Medicine**, v. 368, n. 6, p. 543–550, 2013.

ROBERT L.RUBIN, DAVID WALL, K. N. K. Electrochemical biosensor for quantitation of anti-DNA autoantibodies in human serum. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 51, p. 177–183, 2014.

RODRÍGUEZ, J. M. D.; MELIÁN, J. A. H.; PEÑA, J. P. Determination of the Real Surface Area of Pt Electrodes by Hydrogen Adsorption Using Cyclic Voltammetry. **J. Chem. Educ.**, v. 77, n. 9, p. 1195, 2000.

SALEM, A. et al. Synthesis and characterization of CdSe nanoparticles via thermal treatment technique. **Results in physics**, v. 7, p. 1556–1562, 2017.

- SALIM, M. et al. Review of nano piezoelectric devices in biomedicine applications. **Journal of Intelligent Material Systems and Structures**, v. 29, n. 10, p. 2105–2121, 2018.
- SANJAY KISAN METKAR; GIRIGOSWAMI, K. Diagnostic biosensors in medicine – A review. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 17, p. 271–283, 2019.
- SANTENS, P. et al. The pathophysiology of motor symptoms in Parkinson’s disease. **Acta neurol. belg**, v. 103, p. 129–134, 2003.
- SCHREIBER, F. Structure and growth of self-assembling monolayers. **Progress in Surface Science**, v. 65, n. 5–8, p. 151–257, 2000.
- SCHWEITZER, J. S. et al. Personalized iPSC-Derived Dopamine Progenitor Cells for Parkinson’s Disease. **N Engl J Med**, v. 382, p. 1926–1932, 2020.
- SEGUNDO, J. E. D. V.; VILAR, E. O. Grafeno: Uma revisão sobre propriedades, mecanismos de produção e potenciais aplicações em sistemas energéticos. **Revista Eletrônica de Materiais e Processos**, v. 11, n. 2, p. 54–57, 2016.
- SILVA, D. P. B. et al. Layer-by-Layer Films of Gold Nanoparticles and Carbon Nanotubes for Improved Amperometric Detection of Cholesterol. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v. 19, n. 9, p. 5483- 5488(6), 2019.
- 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**, v. 141, n. 1, p. 216–224, 2016.
- SILVER, J. et al. Studies of the reactions of ferric iron with glutathione and some related thiols. Part V. Solid complexes containing FeII and glutathione or FeIII with oxidized glutathione. **Inorganica Chimica Acta**, v. 107, n. 3, p. 169–178, 1985.
- SILVERTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X.; KIEMLE, D. J. **Spectrometric Identification of Organic Compounds**. 7^a ed. New York: John Wiley & Sons, INC., 2005.
- SILVERTHORN, D. U. **Fisiologia Humana: uma abordagem integrada**. 7^a ed. Porto Alegre: artmed, 2017.
- SONG, Y. et al. A dopamine-imprinted chitosan Film/Porous ZnO NPs@carbon Nanospheres/Macroporous carbon for electrochemical sensing dopamine. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 298, p. 126949, 2019.
- SOUZA, P. H. M. DE. **ESTUDOS ELETROQUÍMICOS DE COMPLEXOS DE Cu (II) DE ANTIBIÓTICOS DA CLASSE DAS FLUORQUINOLONAS**. [s.l.]

Universidade Federal de Minas Gerais, 2011.

SUESS, D. et al. Topologically protected vortex structures for low-noise magnetic sensors with high linear range. **Nature Electronics**, v. 1, p. 362–370, 2018.

TAHERI, R. A.; ESKANDARI, K.; NEGAHDARY, M. An electrochemical dopamine aptasensor using the modified Au electrode with spindle-shaped gold nanostructure. **Microchemical Journal**, v. 143, p. 243–251, 2018.

TAMILVANAN, A. et al. Copper Nanoparticles: Synthetic Strategies, Properties and Multifunctional Application. **International Journal of Nanoscience**, v. 13, n. 2, p. 1430001, 2014.

TEODORO, W. L. G. **Depressao corpo, mente e alma**. 3^a ed. Uberlândia: [s.n.].

TKAC, J.; DAVIS, J. An optimised electrode pre-treatment for SAM formation on polycrystalline gold. **JOURNAL OF ELECTROANALYTICAL CHEMISTRY**, v. 621, n. 1, p. 117–120, 2008.

TOLBA, M. et al. A bacteriophage endolysin-based electrochemical impedance biosensor for the rapid detection of *Listeria* cells. **Analyst**, v. 137, n. 24, p. 5749–5756, 2021.

TRASATTI, S.; PETRII, O. A. Real surface area measurements in electrochemistry. **Pure Appl. Chem.**, v. 63, n. 5, p. 711–734, 1991.

TYRONE D. CANNON. How Schizophrenia Develops: Cognitive and Brain Mechanisms Underlying Onset of Psychosis. **CellPres**, v. 19, n. 12, p. 744–756, 2015.

TZSCHENTKE, T. M. The medial prefrontal cortex as a part of the brain reward system. **Amino Acids** ., v. 19, n. 1, p. 211–219, 2000.

UEDA, Y.; KOBAYASHI, M. Spectroscopic studies of autofluorescence substances existing in human tissue: influences of lactic acid and porphyrins. **Appl Opt.**, v. 43, n. 20, p. 3993–3998, 2004.

ULMAN, A. Formation and Structure of Self-Assembled Monolayers. **Chem. Rev.**, v. 96, n. 4, p. 1533–1554, 1996.

VOICESCU, M. et al. Spectroscopic, molecular dynamics simulation and biological studies of Flavin MonoNucleotide and Flavin Adenine Dinucleotide in biomimetic systems. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 5, p. 118997, 2021.

WEI, B. et al. Facile preparation of a collagen-graphene oxide composite: A sensitive and robust electrochemical aptasensor for determining dopamine in biological samples.

International Journal of Biological Macromolecules, v. 125, p. 400–406, 2019.

WHITEHOUSE, D. J. **Surfaces and their Measurement**. 1^a ed. London: Hermes Penton Science - HPS, 2002.

WINIARSKI, J. P. et al. Electrochemical reduction of sulfite based on gold nanoparticles/silsesquioxane-modified electrode. **Electrochimica Acta**, v. 251, p. 522–531, 2017.

XIAO, T. Au and Au-Based nanomaterials: Synthesis and recent progress in electrochemical sensor applications. **Talanta**, v. 206, p. 120–210, 2019.

XU, G. et al. Hyaluronic acid-functionalized electrospun PLGA nanofibers embedded in a microfluidic chip for cancer cell capture and culture. **Biomaterials Science**, v. 5, n. 4, p. 752–761, 2017.

YADOLLAH MORTAZAVIC, HENGAMEH FATEMIA ABBAS ALI KHODADADI, A. A. F. Apple – biomorphic synthesis of porous ZnO nanostructures for glucose direct electrochemical biosensor. **Current Applied Physics**, v. 12, n. 4, p. 1033–1038, 2012.

YAN, X.; LI, H.; SU, X. Review of optical sensors for pesticides. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 103, p. 1–20, 2018.

YEH, Y. C. ET AL. Gold nanoparticles: preparation, properties, and applications in bionanotechnology. **Nanoscale**, v. 4, n. 6, p. 1871–1880, 2012.

YOUDIM, M. B. H.; BAKHLE, Y. S. Monoamine oxidase: isoforms and inhibitors in Parkinson's disease and depressive illness. **Br J Pharmacol**, v. 147, n. suppl 1, p. S287–S296., 2006.

ZHANG, B. et al. Coral-like Au₁Pt₃ alloy nanoparticles with multiple surface defects modified by poly(L-methionine) membrane for the selective detection of dopamine in biological samples. **Journal of Alloys and Compounds**, v. 815, p. 152643, 2020.

ZHENG, J. et al. Synthesis of MXene/DNA/Pd/Pt nanocomposite for sensitive detection of dopamine. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 816, p. 189–194, 2018.