UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE FÍSICA DE SÃO CARLOS

LAÍS RIBOVSKI

Biossensores eletroquímicos para fins ambientais e medicinais

São Carlos
2015

LAÍS RIBOVSKI

Biossensores eletroquímicos para fins ambientais e medicinais

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Física do Instituto de Física de São Carlos da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Física Aplicada

Opção: Física Biomolecular

Orientador: Prof. Dr. Bruno Campos Janegitz

Versão Corrigida

(versão original disponível da Unidade que aloja o Programa)

São Carlos
2015

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Ficha catalográfica elaborada pelo Serviço de Biblioteca e Informação do IFSC,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Ribovski, Laís

Biossensores eletroquímicos para fins ambientais e
medicinais / Laís Ribovski; orientador Bruno Campos
Janegitz - versão corrigida -- São Carlos, 2015.
110 p.

Dissertação (Mestrado - Programa de Pós-Graduação em
Física Aplicada Biomolecular) -- Instituto de Física
de São Carlos, Universidade de São Paulo, 2015.

1. Nanobastões de ouro. 2. Tirosinase. 3.
Compostos fenólicos. 4. Genossensor. 5. Câncer de
mama. I. Campos Janegitz, Bruno, orient. II. Título.

*À minha família, especialmente aos meus
pais, Edilberto e Vivian, e minha irmã
Marina, pelo apoio e amor incondicional.*

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Edilberto e Vivian, pelo carinho, educação e confiança. O amor e apoio de vocês foram fundamentais em cada momento. Obrigada.

À minha irmã, Marina, pelo companheirismo e amizade.

Aos meus avós, Izabel, Waldemar, Bernarda e José, por serem um exemplo a ser seguido.

Ao Prof. Dr. Bruno Campos Janegitz por tudo que me ensinou, todos os conselhos e principalmente pela orientação nesses anos. Obrigada pela confiança.

Ao Prof. Dr. Valtencir Zucolotto pela paciência, preocupação e confiança. Obrigada

A todos que fizeram ou fazem parte do Grupo de Nanomedicina e Nanotoxicidade: Laís, Juliana, Valéria, Idelma, Lilian, Camila, Fabrício, Rodrigo, Victor, Iêda, Cris, Camilo, Jaqueline, Julielle, Wagner, Maria, Olavo, Henrique, Denise, Edson, Thiers, Patrícia e Leonardo. Em especial à Valéria pela ajuda com os nanorods e atenção a todas as minhas dúvidas.

À Eulália, Ives e Cecilia por sempre estarem presentes e por me incentivarem a sempre buscar mais.

À Raíssa por ser uma grande amiga, pelas horas de conversa e estudo que sempre me fizeram bem.

À melhor colega e amiga de laboratório, Laís B, pelas discussões de experimentos, pela companhia no laboratório e no PQ.

Ao IFSC pela infraestrutura fornecida, aos docentes e funcionários que fazem parte do instituto.

À Biblioteca do IFSC, ao Serviço de Pós-Graduação do IFSC, em especial ao Ricardo e à Patrícia por serem tão prestativos e sempre estarem dispostos a ajudar.

A todos que contribuíram ou fizeram parte de alguma forma desses anos de trabalho. Obrigada!

*“Daher ist es die Aufgabe, nicht sowohl zu sehen,
was noch keiner gesehen hat, als bei dem, was jeder sieht,
zu denken, was noch keiner gedacht hat.”*

*“Portanto, a tarefa não é tanto ver o que ninguém viu ainda,
mas pensar o que ninguém ainda pensou sobre aquilo que todo mundo vê.”*

(Tradução pelo autor)

Arthur Schopenhauer

RESUMO

RIBOVSKI, L. **Biossensores eletroquímicos para fins medicinais e ambientais**. 2015. 110 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2015.

Embora exista considerável progresso na área de biossensores, ainda é primordial aprimorar muitos desses dispositivos. Este trabalho tem por objetivo contribuir para o contínuo crescimento dos biossensores a base de enzimas e de moléculas de DNA, sendo dois biossensores eletroquímicos descritos. O primeiro trata-se de um biossensor enzimático utilizando tirosinase (Tyr) imobilizada por intermédio de cistamina (CYS) e glutaraldeído (GA) para a detecção de compostos fenólicos. Eletrodos de carbono impressos (SPCE) foram modificados com nanobastões de ouro (AuNRs) em filme de poli(amido amina) (PAMAM) geração 4 para o favorecimento da transferência direta de elétrons (DET) entre o eletrodo e o sítio ativo da enzima. Para caracterizar os AuNRs e AuNRs-PAMAM, espectroscopia de absorção no UV-Visível, espalhamento de luz dinâmico (DLS) e microscopia eletrônica de varredura (SEM) foram empregadas. As etapas do biossensor foram estudadas por voltametria cíclica e linear, amperometria e microscopia de força atômica (AFM) na presença de dois analitos: catecol (CAT) e dopamina (DA). A faixa linear para CAT foi de 2,8 a 30,3 $\mu\text{mol L}^{-1}$ com um limite de detecção (LD) de 1,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ enquanto para a DA, a faixa linear foi de 27,8 a 448,7 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e LD de 10,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Além de apresentar ótima resposta frente a possíveis interferentes, o sensor também mostrou excelente desempenho em amostras reais, que atrelados aos testes de repetibilidade e reprodutibilidade mostram a estabilidade e acurácia do biossensor. O segundo sensor, trata-se de um sensor de DNA impedimétrico em eletrodo de ouro para a detecção da mutação c.68_69del relacionada à predisposição ao câncer de mama. A imobilização da sequência de captura (SH-ssDNA) no eletrodo ocorreu pela ligação ouro- enxofre (Au-S) e o modelo de hibridização escolhido foi a hibridização direta. O genossensor distinguiu eficientemente entre as sequências alvo (tarDNA) e não-complementar (ncsDNA), apresentando faixa linear de 1 a 200 nmol L^{-1} e LD de 0,14 nmol L^{-1} . Os resultados sugerem que ambos

biossensores têm potencial e que as estratégias propostas são promissoras para o desenvolvimento de outros biossensores.

Palavras-chave: Nanobastões de ouro. Tirosinase. Compostos fenólicos. Genossensor. Câncer de mama.

ABSTRACT

RIBOVSKI, L. **Electrochemical biosensors to medical and environmental applications**. 2015. 110 p. Dissertação (Mestrado em Ciências)) - Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2015.

Despite a considerable progress in the area of biosensors, it is still crucial to improve most of these sensors. This study aims to contribute to the ongoing growth of enzyme- and DNA-based biosensors, being described two electrochemical biosensors. The first one is an enzyme-based biosensor with immobilized Tyrosinase (Tyr), through cystamine (CYS) and glutaraldehyde (GA), for detection of phenolic compounds. Screen-printed carbon electrodes (SPCE) were modified by gold nanorods (AuNRs) stabilized with poly(amide amine) PAMAM generation 4 to facilitate direct electron transfer (DET) between electrode and enzyme active site. AuNRs and AuNRs-PAMAM were characterized using UV-Visible absorption spectroscopy, dynamic light scattering (DLS) e scanning electron microscopy (SEM). Biosensor stages were studied by cyclic and linear voltametry, amperometry and atomic force microscopy (AFM) and tested against two analytes: catechol (CAT) and dopamine (DA). Detection limit (LD) for CAT is 1 $\mu\text{mol L}^{-1}$ and linear range from 2.8 to 30.3 $\mu\text{mol L}^{-1}$, for DA, LD is 10.0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ and linear range 27.8 to 448.7 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Besides, the biosensor shows great response in the presence of interferents, it also had an excellent performance in real samples that along with repeatability and reproducibility tests indicate stability and accuracy of the biosensor. The second sensor is an impedimetric DNA sensor prepared on gold electrode to detect c.68_69del mutation related to breast cancer predisposition. Capture sequence (HS-ssDNA) immobilization occurred due to gold-sulfur bond (Au-S) and direct hybridization was the chosen hybridization model. The genosensor was able to distinguishing between target sequence (tarDNA) and non-complementary sequence (ncsDNA) and linear range and LD were found to be 1 to 200 nmol L^{-1} and 0.14 nmol L^{-1} , respectively. Results suggest both biosensors have potential and proposed strategies are promising for other biosensors development.

Key-words: Gold nanorods. Tyrosinase. Phenolic compounds. Genosensor.
Breast cancer.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Representação do funcionamento de um biossensor	30
Figura 2 - Representação do funcionamento de um biossensor primeira geração...	32
Figura 3 - Representação do funcionamento de um biossensor de segunda geração..	33
Figura 4 - Representação do funcionamento de um biossensor de terceira geração....	34
Figura 5 - (a) Estrutura cristalina de tirosinase de <i>Agaricus bisporus</i> obtida por difração de raio-X (2,30 Å) (PDB ID 2Y9W) (b) Exemplo de reação catalisada por Tyr ...	41
Figura 6 - Heterodímero formado entre os domínios BRCA1 e BARD RING. Estrutura obtida por ressonância magnética nuclear (PDB ID 1JM7).....	44
Figura 7 - Eletrodo de carbono impresso	48
Figura 8 - Esquema da preparação do biossensor Tyr-AuNRs-PAMAM/SPCE	50
Figura 9 - Espectros no UV-Visível de AuNRs(-) e AuNRs/PAMAM (-)	53
Figura 10 - Estudo do efeito do pH no potencial ζ de AuNRs, AuNRs/PAMAM e PAMAM	54
Figura 11 - (a) Imagens de AuNRs obtidas por MEV (b) Imagens de AuNRs-PAMAM por MEV	55
Figura 13 - Voltamogramas cíclicos para o eletrodo SPCE (—) e AuNR-PAMAM/SPCE (—) em KCl 0,1 mol L ⁻¹ e [Fe(CN) ₆] ⁴⁻ 1 mmol L ⁻¹ , ν = 100 mV s ⁻¹ ..	59
Figura 14 – Representação do mecanismo da Tyr	60
Figura 15 - Voltamogramas cíclicos para (a) AuNR-PAMAM/SPCE (—) e Tyr-AuNR-PAMAM/SPCE (—) em tampão fosfato 0,1 mol L ⁻¹ (pH 7,0); ν = 100 mV s ⁻¹ (b) para Tyr-AuNR-PAMAM/SPCE (—) em tampão fosfato 0,1 mol L ⁻¹	61
Figura 16 - (a) Voltamogramas cíclicos do biossensor Tyr-AuNRs-PAMAM/SPCE em tampão fosfato 0,1 mol L ⁻¹ a pH 7,0 com ν variando de 10 a 400 mV s ⁻¹ (b) Potenciais de pico catódico e anódico $E_{pc}(V)$ vs. $\log \nu(V s^{-1})$ e (c) $\Delta E_p(V)$ vs. $\log \nu(V s^{-1})$	63
Figura 17 - Imagens de AFM observando a (a) fase do SPCE (b) fase do Tyr-AuNRs-PAMAM/SPCE (c) altura do SPCE e (d) altura do Tyr-AuNRs-PAMAM/SPCE...	65
Figura 20 – (a) Curva analítica do Tyr-AuNR-PAMAM/SPCE para CAT com concentrações de 2,8 a 30,3 $\mu\text{mol L}^{-1}$ em tampão fosfato 0,1 mol L ⁻¹ (pH 7,0), potencial aplicado=-0,4V (b) Molécula de catecol.....	69
Figura 21 – (a) Curva analítica do Tyr-AuNR-PAMAM/SPCE para DA com concentrações de 27,8 a 448,7 $\mu\text{mol L}^{-1}$ em tampão fosfato 0,1 mol L ⁻¹ (pH 7,0); potencial aplicado=-0,4V (b) Molécula de dopamina	70

Figura 22 - Representação eletrodo cilíndrico de ouro	78
Figura 23 - Diagrama de Nyquist para espectro de impedância faradaica.....	80
Figura 24 - Circuito equivalente	80
Figura 25 - Representação esquemática da montagem do genossensor	83
Figura 26 - Diagramas de Nyquist para eletrodo de ouro e HS-ssDNA 100 nmol L ⁻¹ obtidos em solução de ([Fe(CN) ₆]) ^{-3/-4} 5,0 mmol L ⁻¹ preparada em tampão fosfato 0,1 mol L ⁻¹ (pH 7,0)	85
Figura 27 - Diagramas de Nyquist para eletrodo de ouro, HS-ssDNA 100 nmol L ⁻¹ e HS-ssDNA+2-ME obtidos em solução de ([Fe(CN) ₆]) ^{-3/-4} 5,0 mmol L ⁻¹ preparada em tampão fosfato 0,1 mol L ⁻¹ (pH 7,0)	86
Figura 28 - Diagramas de Nyquist para HS-ssDNA e dsDNA (a) obtidos em solução de ([Fe(CN) ₆]) ^{-3/-4} 5,0 mmol L ⁻¹ preparada em tampão fosfato 0,1 mol L ⁻¹ (pH 7,0)	87
Figura 29 - (a) Diagramas de Nyquist para eletrodo de ouro, HS-ssDNA 100 nmol L ⁻¹ , HS-ssDNA+2-ME e dsDNA obtidos em solução de ([Fe(CN) ₆]) ^{-3/-4} 5,0 mmol L ⁻¹ preparada em tampão fosfato 0,1 mol L ⁻¹ (pH 7,0) (b) R _p vs. tempo ...	88
Figura 30 - Diagramas de Nyquist para eletrodo de ouro, (HS-ssDNA+2-ME)+dsDNA e HS-ssDNA+2-ME+dsDNA obtidos em solução de ([Fe(CN) ₆]) ^{-3/-4} 5,0 mmol L ⁻¹ preparada em tampão fosfato 0,1 mol L ⁻¹ (pH 7,0)	89
Figura 31 - (a) Diagramas de Nyquist para HS-ssDNA (100,0 nmol L ⁻¹)+2-ME e HS- ssDNA (100,0 nmol L ⁻¹)+2-ME +ncsDNA(25,0 nmol L ⁻¹) obtidos em solução de ([Fe(CN) ₆]) ^{-3/-4} 5,0 mmol L ⁻¹ preparada em tampão fosfato 0,1 mol L ⁻¹ (pH 7,0) (b) gráfico de barras comparando R _p de HS-ssDNA (100,0 nmol L ⁻¹) +2-ME e HS-ssDNA (100,0 nmol L ⁻¹)+2-ME +ncsDNA (25,0 nmol L ⁻¹)	90
Figura 32 – (a) Diagramas de Nyquist para seis valores de concentração: 1,0, 10,0, 50,0, 100,0, 150,0 e 200,0 nmol L ⁻¹ da sequência tarDNA. (b) Curva analítica para HS-ssDNA+2-ME+dsDNA.....	92

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Valores de desvio padrão relativo para os interferentes KCl, K₂CO₃ e

Na₂CO₃ para amostra ambiental.....71

Tabela 2 - Determinação de compostos fenólicos em plasma sanguíneo artificial. ..72

Tabela 3 - Determinação de compostos fenólicos em amostras reais de água72

Tabela 4 - Comparação entre biossensores de Tyr reportados na literatura.74

Tabela 5 - Sequências de DNA utilizadas no desenvolvimento do genossensor para
a mutação c.68_69del (185delAG)77

Tabela 6 - Comparação entre genossensores reportados na literatura.93

Lista de abreviaturas

A - adenina
AFM - microscopia de força atômica
AuNRs - nanobastões de ouro (*gold nanorods*)
BRCA1 - gene do câncer de mama humano 1 (*breast cancer associated gene 1*)
BRCA2 - gene do câncer de mama humano 2 (*breast cancer associated gene 2*)
C - citosina
CAT - catecol
CNTs - nanotubos de carbono (*carbon nanotubes*)
CONAMA - Conselho Nacional do Meio Ambiente
CTAB - brometo de hexadeciltrimetilamônio
DA - dopamina
DNA - ácido desoxirribonucleico (*deoxyribonucleic acid*)
DET - transferência direta de elétrons (*direct electron transfer*)
DLS - espalhamento de luz dinâmico (*dynamic light scattering*)
EDTA - ácido etileno diamino tetraacético
G - guanina
GA - glutaraldeído
IUPAC - União Internacional de Química Pura e Aplicada (*International Union of Pure and Applied Chemistry*)
SEM - microscopia eletrônica de varredura (*scanning electron microscopy*)
ncsDNA - sequência não-complementar (*non-complementary sequence*)
NHS - N-hidroxissuccinimida
NPs - nanopartículas
PAMAM - dendrímero poli(amido amina)
Potencial ζ - potencial zeta
SPE - Eletrodo impresso (*screen printed electrode*)
SPCE - Eletrodo impresso de carbono (*screen printed carbon electrode*)
SPR - ressonância de plasma de superfície (*surface plasmon resonance*)
HS-ssDNA - sequência de captura
T - timina
tarDNA - sequência alvo (*target DNA*)
Tyr –tirosinase (*tyrosinase*)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	29
2 TÓPICOS DE INTERESSE.....	30
2.1 Biossensores.....	30
2.1.1 Definição e classificação de biossensores	31
2.1.2 Técnicas de imobilização de biomoléculas.....	35
2.1.3 Biossensores enzimáticos	36
2.1.4 Genossensores	37
2.2 Aplicação de nanomateriais em biossensores.....	38
2.2.1 Nanobastões de ouro.....	38
2.3 Aplicação de biossensores enzimáticos na detecção de compostos fenólicos ...	39
2.3.1 Polifenol oxidase.....	40
2.4 Aplicação de biossensores na detecção de mutações relacionadas ao câncer..	42
2.4.1 DNA.....	42
2.4.2 Câncer de mama	43
2.4.3 Gene BRCA1	43
3 OBJETIVOS	45
4 Biossensor de terceira geração em eletrodo impresso de carbono modificado com nanobastões de ouro e tirosinase	47
4.1 Objetivos específicos	47
4.2 MATERIAIS E MÉTODOS	47
4.2.1 Materiais.....	47
4.2.2 Síntese de nanobastões de ouro	48
4.2.3 Preparação do biossensor Tyr-AuNRs-PAMAM/SPCE	49
4.2.4 Morfologia	50

4.2.5 Medidas de espectrofotométricas.....	50
4.2.6 Medidas de espalhamento de luz dinâmico (DLS).....	51
4.2.6 Medidas eletroanalíticas.....	51
4.2.7 Célula Eletroquímica	51
4.2.8 Amostras	51
4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	52
4.3.1 Caracterização AuNRs e AuNRs-PAMAM	52
4.3.2 Caracterização do eletrodo AuNRs-PAMAM/SPCE.....	56
4.3.3 Caracterização do biossensor Tyr-AuNR-PAMAM/SPCE.....	59
4.3.4 Determinação de compostos fenólicos.....	65
4.3.4 Efeito do pH.....	66
4.3.5 Curva Analítica	68
4.3.6 Estudo de interferência e análise de amostra	71
5 SENSOR DE DNA PARA MUTAÇÃO GENÉTICA RELATIVA À PREDISPOSIÇÃO AO CÂNCER DE MAMA.....	77
5.1 Objetivos específicos.....	77
5.2.1 Materiais	77
5.2.2 Medidas eletroanalíticas.....	79
5.2.3 Célula Eletroquímica	79
5.2.4 Espectroscopia de Impedância eletroquímica (EIS).....	79
5.2.5 Ressuspensão, preparo e armazenamento de alíquotas de DNA	81
5.2.6 Limpeza dos eletrodos de ouro	81
5.2.7 Preparação do sensor de DNA.....	81
5.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	84
5.3.1 Caracterização do genossensor	84
5.2.6 Otimização da hibridização	87
5.2.8 Seletividade de hibridização.....	90

5.2.7 Detecção da hibridização.....	91
5.3 CONCLUSÕES	94
6 CONCLUSÕES GERAIS	95
7 PERSPECTIVAS.....	97
REFERÊNCIAS.....	99

1 INTRODUÇÃO

O desenvolvimento de sensores é motivado por diversas áreas como saúde, ambiente e segurança. Na saúde, são importantes ferramentas de diagnóstico em evolução, principalmente para o uso no local de atendimento ao paciente, os denominados dispositivos *point-of-care*.¹⁻³ Para propósitos ambientais tem se construído sensores para detecção de poluentes como pesticidas⁴⁻⁶, compostos fenólicos⁷⁻¹⁰ e metais pesados¹¹⁻¹³ buscando dispositivos simples, rápidos, portáteis e de baixo custo. No campo da segurança, agentes patógenos¹⁴, principalmente ligados a atividades de bioterrorismo como *Bacillus anthracis*¹⁵, são um grande foco, visando a identificação do agente para controle imediato.

Entre os sensores, os biossensores se destacam cada vez mais devido a sua especificidade, consequência de um material biológico que confere afinidade específica para uma molécula ou grupo de moléculas alvo. Usualmente esse material consiste de enzimas, ácidos nucleicos, anticorpos, receptores ou células.¹⁶ A escolha de um elemento biológico ou outro dependerá do analito de interesse. A partir dessa combinação, a técnica de detecção e arquitetura do sensor são planejados. Devido a especificidade tem-se uma melhor seletividade e portanto, uma quantificação mais exata. Além da seletividade, os biossensores também atraem atenção por serem de fácil preparo, custo relativamente baixo, apresentarem boas perspectivas de miniaturização do sistema e, conseqüente, portabilidade.

Visando melhorar a performance dos sensores, tem-se feito amplo uso de nanomateriais na análise eletroquímica. A aplicação de nanomateriais em dispositivos de detecção possibilita novas arquiteturas de sensores cujas características são potencializadas, especialmente seletividade e sensibilidade. Entre os materiais mais utilizados estão nanopartículas (NPs) metálicas¹⁷⁻¹⁹, grafeno¹⁸⁻²², nanotubos de carbono (CNT)²³⁻²⁵ e *quantum dots*²⁶⁻²⁸. Em consequência do seu tamanho reduzido, nanomaterias apresentam propriedades mecânicas, ópticas e eletrônicas distintas dos materiais na macroescala (do inglês *bulk materials*) que são favoráveis ao desenvolvimento de novos sensores.

Neste trabalho de mestrado tivemos como objetivo desenvolver biossensores eletroquímicos para propósitos ambientais e medicinais: um biossensor enzimático, propondo uma nova arquitetura, caracterizando-a e em seguida empregando-a para determinar compostos fenólicos. Também um sensor de DNA, mostrando a

capacidade de distinguir uma mutação específica relacionada ao câncer de mama de uma sequência sem a mutação, monitorando a hibridização entre sequências complementares de DNA.

2 TÓPICOS DE INTERESSE

2.1 Biossensores

De acordo com a União Internacional de Química Pura e Aplicada (International Union of Pure and Applied Chemistry, IUPAC) define-se um biossensor eletroquímico como “um dispositivo que usa reações bioquímicas específicas mediadas por enzimas isoladas, imunossistemas, tecidos, organelas ou células inteiras para detectar compostos químicos usualmente por sinal elétrico, térmico ou ótico”²⁹⁻³⁰ Os componentes básicos de um biossensor estão representados na Figura 1 e são: um bioreceptor, que reconhece o analito; um transdutor, que converte o evento de reconhecimento em um sinal mensurável; um amplificador, que amplifica o sinal de saída do transdutor; um processador de sinal, que produz resultados mais simples de analisar a serem exibidos e salvos em um computador ou dispositivo que permita interpretação do resultado por um software.

Figura 1 – Representação do funcionamento de um biossensor

Fonte: Elaborada pelo autor

Conhecendo os princípios básicos de um sensor, o ideal é obter uma plataforma que possa ser de fácil operação e manuseio. Grieshaber *et al*³¹ sugerem

algumas condições para a construção de um biossensor mais simples e facilmente utilizável (*user-friendly*). O elemento biológico de reconhecimento deve apresentar uma elevada especificidade, estabilidade em condições normais de armazenamento e ensaios com pequena ou nenhuma alteração entre si. As variáveis que afetam a reação de detecção devem ser minimizadas, reduzindo a necessidade de pré-tratamento da amostra. Dentro do intervalo de concentração de interesse é fundamental ter uma resposta linear que tenha boa acurácia e seja reproduzível, sem necessidade de ajuste da concentração da amostra. Para garantir a segurança, caso o biossensor seja de uso invasivo é importante que a sonda seja pequena, biocompatível e não apresente nenhuma reação tóxica. Por fim, resultados rápidos, portabilidade e custo reduzido são fatores que contribuem para o uso efetivo do dispositivo e comercialização.

Os biossensores são classificados com base na sua arquitetura, definidos por três gerações, e de acordo com o evento de reconhecimento: de afinidade e catalíticos.

2.1.1 Definição e classificação de biossensores

Biossensor de primeira geração

Um biossensor de primeira geração mede o produto de uma reação enzimática ou o consumo de um co-fator. A reação biocatalítica envolve a redução ou oxidação do produto da reação enzimática ou de algum reagente ligado direta ou indiretamente à reação. Os mais conhecidos biossensores de primeira geração são os de glicose, baseados no cofator oxigênio e na geração e detecção de peróxido de hidrogênio.

Figura 2 - Representação do funcionamento de um biossensor primeira geração

Fonte: Elaborada pelo autor

Primeiramente desenvolvidos por Clark e Lyons em 1962³², o biossensor usava glicose oxidase imobilizada no eletrodo de trabalho em que o consumo de oxigênio da reação catalítica era medido. As reações a seguir descrevem o funcionamento do sensor, sendo que a segunda é relativa ao potencial negativo aplicado no eletrodo de platina para detecção da redução do consumo de oxigênio.³³

Contudo, o uso do oxigênio como aceptor de elétrons está sujeito às limitações estereoquímicas do oxigênio e a variações na concentração de oxigênio na amostra. Para reduzir ou eliminar a dependência do oxigênio em biossensores surgem algumas alternativas: sensores em eletrodo cilíndrico bidimensional³⁴, em que o oxigênio se propaga pela membrana em duas direções, enquanto a glicose apenas em uma, e eletrodos de compósitos ricos em oxigênio.³⁵ Outra maneira de contornar essa dependência é usando mediadores, substituindo o oxigênio como aceptor de elétrons por um aceptor não fisiológico, estes são chamados biossensores de segunda geração.

Biossensor de segunda geração

Como uma evolução dos biossensores de primeira geração, os biossensores de segunda geração trazem a vantagem de serem independentes da concentração de oxigênio dissolvida na amostra. Isso porque, a redução do oxigênio é evitada pelo uso de aceptores artificiais de elétrons. Considerando-se o biossensor de glicose, é possível comparar a primeira e segunda gerações de biossensores (Figura 2 e 3), sendo a diferença mais evidente a presença de mediadores redox nos biossensores de segunda geração, os quais podem estar nas formas reduzidas ou oxidadas dependendo de suas reações com os substratos.

Figura 3 - Representação do funcionamento de um biossensor de segunda geração

Fonte: Elaborada pelo autor

O mediador atuará no transporte (shuttling) de elétrons entre a enzima e o eletrodo, permitindo a redução do potencial de trabalho utilizado em relação ao biossensor de primeira geração. O biossensor de segunda geração dependerá do potencial de oxidação/redução do mediador, de maneira que as substâncias cujo potencial redox for inferior ao potencial do mediador serão interferentes, contribuindo para o sinal eletroquímico. Dependendo do potencial do mediador, é possível reduzir o potencial utilizado em comparação aos biossensores de primeira geração, que eram elevados.¹⁶

Biossensor de terceira geração

Ainda buscando melhorar os resultados e reduzir as interferências, há muito interesse no desenvolvimento de biossensores usando transferência direta de elétrons (DET, *direct electron transfer*) entre o eletrodo e o par redox do sítio ativo da molécula. Neste tipo de biossensor, um par redox no sítio ativo tende a ceder elétrons e a outra a aceitar elétrons durante a conversão do substrato em produto. Esses biossensores são conhecidos como biossensores de terceira geração.

Figura 4 - Representação do funcionamento de um biossensor de terceira geração

Fonte: Elaborada pelo autor

Nesse caso, a ausência de mediadores é uma grande vantagem, já que permite usar potenciais do par redox no sítio ativo, que são ainda mais baixos, levando a menores interferências. Entretanto, para que ocorra a DET possíveis dificuldades precisam ser superadas, como a orientação das enzimas, e o sítio eletroativo das enzimas escondidos ou encapsulados. A orientação da enzima pode facilitar a DET garantindo que o sítio ativo da molécula fique mais próximo e direcionado à superfície do eletrodo, evitando impedimentos na difusão do substrato e dos elétrons, e ainda podendo reduzir o caminho que os elétrons precisam percorrer.³⁶ Buscando meios de superar esses problemas, eletrodos modificados tem sido largamente estudados.

2.1.2 Técnicas de imobilização de biomoléculas

A imobilização de biomoléculas na camada biorreceptora de biossensores tem sido reportada na literatura por vários métodos, sendo quatro os mais importantes: ligação covalente³⁷⁻⁴⁰, aprisionamento (*entrapment*)⁴¹⁻⁴², adsorção física⁴³⁻⁴⁴ e ligação covalente cruzada (*crosslinking*)^{19; 37; 45}. É fundamental optar por uma imobilização adequada, uma vez que cada técnica apresenta características diferentes, e portanto, vantagens e desvantagens, que influenciam a resposta analítica final. Também importantes são as condições de imobilização, que podem ser aprimoradas durante a otimização do sensor, levando em conta basicamente pH, temperatura, tampão escolhido e tempo de reação.⁴⁶

Ligação covalente

A ligação covalente de uma enzima a um suporte é um dos métodos mais comuns e aplicados para imobilização de enzimas. Grupos nucleofílicos não essenciais à atividade catalítica da enzima se ligam covalentemente a grupos reativos ligados a superfície do transdutor. Exemplos de alguns agentes de ligação utilizados são glutaraldeído (GA)⁴⁷, N-hidroxisuccinimida (NHS)⁴⁸ e aminaotóis. Uma desvantagem dessa técnica, é que há redução da atividade enzimática, entretanto, como não há formação de barreira de difusão, o tempo de resposta do biossensor será menor.⁴⁹

Ligação covalente cruzada

A imobilização por ligação covalente cruzada consiste na interação entre um agente de reticulação, GA, por exemplo, e a enzima. Esse agente, geralmente bifuncional, se liga a biomolécula formando um sistema reticulado rígido. A rede pode conter a enzima apenas ou adicionalmente, uma proteína funcionalmente inerte como albumina de soro bovino. A simplicidade é a principal vantagem do método, mas a enzima também apresenta redução considerável da atividade.⁴⁹

Aprisionamento

A técnica de aprisionamento usa géis ou polímeros, como sílica gel⁵⁰ e polipirrol⁵¹, que formam uma matriz tridimensional na qual as biomoléculas são aprisionadas em poros. Nessa matriz, grandes quantidades de enzima podem ser aprisionadas, sendo interessante para moléculas de alta massa molar ou para variedade de enzimas, já que o tamanho dos poros e geometria podem ser controlados. Além disso, comparada às demais técnicas, exibe maior estabilidade química e térmica⁵¹. Outro ponto importante é que a atividade da enzima não é afetada, pois não ocorrem reações entre a matriz e as enzimas.⁴⁹

Adsorção

Baseada em interações fracas como interação de Van der Waals e de hidrogênio, o processo de imobilização é simples. Durante um intervalo de tempo pré-estabelecido, a superfície de interesse é colocada em contato com uma solução contendo a enzima e depois lavada com tampão. As moléculas não adsorvidas são removidas e a atividade enzimática não deve sofrer alterações significativas.⁴⁹ Suportes comumente usados são grafite⁵², resinas de troca iônica⁵³ e eletrodos modificados com nanomateriais.⁵⁴

2.1.3 Biossensores enzimáticos

Biossensores enzimáticos já são bastante presentes e acessíveis a população em geral, como é o caso do biossensor de glicose. Os biossensores para monitoramento de glicose vem evoluindo constante quanto as técnicas utilizadas e abordagens de uso, invasivas ou não.⁵⁵ Amplamente difundido, esse biossensor mede os níveis de glicose no sangue e permite que o paciente possa monitorar esses níveis sem auxílio de um profissional. Tal facilidade e autonomia são vitais para melhorar a qualidade de vida de pacientes com diabetes que precisam ter um controle glicêmico contínuo.

Entretanto, a área da saúde não é a única que busca utilizar os benefícios dos biossensores enzimáticos. Muitos biossensores para análises ambientais também vem sendo estudados, principalmente para controle de poluentes.⁵⁶⁻⁵⁷ Os

poluentes podem ser separados em grupos de diferentes estruturas químicas e a partir disso pode-se selecionar a enzima adequada para a construção do biossensor. A enzima, por sua vez, garantirá alta especificidade ao biossensor. Algumas enzimas são capazes de catalisar reações em que elétrons são produzidos ou consumidos, estas enzimas são conhecidas como enzimas-redox. Quando essas enzimas são empregadas para a construção de biossensores, os elétrons envolvidos na reação serão detectados e os parâmetros para a construção dos biossensores, como concentração do analito e densidade de corrente, podem ser determinados a partir do sinal gerado a partir dos elétrons.³¹ A eficiência desse biossensor ainda dependerá da imobilização da biomolécula, pois cada estratégia de imobilização altera o ambiente da proteína e com isso a sua estabilidade. Para amenizar esse problema, o uso de nanomateriais vem se consolidando na construção de biossensores enzimáticos. Imobilizadas em, por exemplo, nanopartículas de ouro, a atividade enzimática das enzimas é conservada e ainda há a facilitação da DET entre a biomolécula e a superfície do eletrodo.⁵⁸

2.1.4 Genossensores

A complementariedade entre fitas de DNA é de grande interesse para a construção de biossensores altamente específicos, já que com um número suficiente de nucleotídeos, o oligonucleotídeo é único e só será capaz de interagir especificamente com a fita complementar a ele.⁵⁹ Baseados nessa alta especificidade, muitos genossensores, também conhecidos como sensores de DNA, vem sendo estudados para a detecção de mutações genéticas⁶⁰⁻⁶¹ e patógenos⁶²⁻⁶³.

Entre as técnicas aplicadas para se construir um genossensor, o sensoriamento via métodos eletroquímicos é bastante promissor. Duas formas de hibridização são bastante adotadas: a hibridização direta e a hibridização do tipo sanduíche. No primeiro caso, dois oligonucleotídeos são necessários, um que será imobilizado no transdutor e um segundo, complementar ao primeiro. A sequência complementar interage em solução com a sequência imobilizada ocorrendo a hibridização. A formação da dupla-fita pode ser distinguida da fita simples comparando os perfis eletroquímicos de ambos casos. A segunda forma exige o planejamento de três sequências de nucleotídeos. Uma primeira sequência será imobilizada no eletrodo. Em seguida, uma segunda sequência, parcialmente

complementar à imobilizada em uma extremidade, é colocada em contato com o eletrodo. Na região complementar a sequência imobilizada ocorre hibridização com a primeira fita. A outra extremidade será complementar ao terceiro oligonucleotídeo. O terceiro oligonucleotídeo hibridiza com região complementar a ele. Esses três passos também podem ser distinguidos comparando seus perfis eletroquímicos.^{59; 64}

2.2 Aplicação de nanomateriais em biossensores

A biocompatibilidade, resistência mecânica elevada e alta condutividade elétrica são características favoráveis de muitos nanomateriais para a construção de biossensores. Em combinação com nanomateriais, a reatividade dos produtos enzimáticos é aumentada, melhorando a transferência de elétrons e eletrocatalise, reduzindo o potencial de trabalho e, conseqüentemente, os efeitos de interferência.

A eficiência do uso de nanomateriais na transferência direta de elétrons se apresenta na construção de muitos biossensores aplicando diversos nanomateriais como nanopartículas de ouro⁶⁵, nanotubos de carbono⁶⁶ e grafeno.⁶⁷ Outro exemplo desses nanomateriais são os nanorods ou nanobastões de ouro (AuNRs).

2.2.1 Nanobastões de ouro

Nanobastões são nanopartículas anisotrópicas e alongadas com propriedades dependentes de direção e portanto, mais de um parâmetro estrutural é necessário para descrevê-los. Como os demais nanomateriais de ouro, AuNRs exibem boa biocompatibilidade. Além disso, AuNRs podem ser preparados por métodos químicos simples, apresentando alta estabilidade.

Um atributo importante dos nanobastões é a razão entre diâmetro e comprimento, sendo capaz de alterar as propriedades físico-químicas do material, sendo que o valor dessa razão pode ser controlado durante a síntese dos nanorods. Pode-se, por exemplo, utilizar sítios de nucleação, conhecidos como seeds, a partir dos quais ocorrerá o crescimento dos nanobastões. Murphy et al⁶⁸ observaram dependência entre a razão diâmetro/comprimento dos nanobastões e o tamanho das seeds. Seeds menores costumam gerar nanorods de ouro ou prata cuja razão é maior. Também observaram que o número de nanorods menores aumenta se o tamanho das seeds for aumentado.⁶⁹

Este material apresenta-se adequado e promissor para imobilização de enzimas e fabricação de biossensores, portanto, alguns trabalhos já são encontrados na literatura. Chen et al relataram um biossensor óptico utilizando ressonância de plasma de superfície (surface plasmon resonance, SPR), em que AuNRs foram imobilizados em lâminas de vidro e funcionalizados com biotina.⁷⁰ Asif et al⁷¹ descrevem um sensor eletroquímico para glicose em que nanorods de óxido de zinco foram crescidos da ponta de um capilar de vidro revestido com prata.

2.3 Aplicação de biossensores enzimáticos na detecção de compostos fenólicos

O uso crescente e contínuo de produtos químicos tem aumentado a preocupação com a poluição ambiental. Muitos são os compostos tóxicos à saúde humana e ao ambiente, entre eles destacam-se os compostos fenólicos, como fenol e catecol. Em humanos, a absorção desses compostos é bastante fácil, independente de ocorrer por contato, ingestão ou outro meio de exposição.⁷² Diversos ramos da indústria produzem fenóis, pois são usados como precursores e componentes de produtos como resinas, corantes, plásticos, medicamentos e pesticidas.⁷³ Por exemplo, na indústria têxtil os fenóis são usado como matéria-prima de poliamida (nylon), na moveleira como resinas na produção de compensados e na farmacêutica como matéria-prima do ácido acetilsalicílico. Muitas dessas indústrias têm seus efluentes fenólicos ligados à rede pública de coleta de esgotos. A Resolução 397/08 do CONAMA define que esses efluentes somente poderão ser lançados, direta ou indiretamente, nos corpos de água desde que obedeçam ao limite de $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ de fenóis totais (substâncias que reagem com 4-aminoantipirina).⁷⁴ Em águas doces de classe 1, ou seja, destinadas ao abastecimento para consumo humano, com tratamento simplificado; à proteção das comunidades aquáticas; à recreação de contato primário, como natação, esqui aquático e mergulho; à irrigação de hortaliças que são consumidas cruas e de frutas que se desenvolvam rentes ao solo e que sejam ingeridas cruas sem remoção de película; e à proteção das comunidades aquáticas em Terras Indígenas; a Resolução 357/2005 impõe um limite máximo bastante restritivo de $0,003 \text{ mg L}^{-1}$ para o padrão de potabilidade.⁷⁵

Também são compostos fenólicos alguns neurotransmissores e hormônios. Da família das catecolaminas, a dopamina (DA) é um neurotransmissor cujos níveis

estão ligados a ocorrência da doença de Parkinson e da depressão.⁷⁶⁻⁷⁷ Baixas concentrações de DA fazem parte do prognóstico da doença de Parkinson, uma vez que a comunicação entre os neurônios da substância nigra e da gânglia basal depende da liberação desse neurotransmissor, controlando a coordenação motora fina. Em pacientes com Parkinson, os neurônios da substância nigra gradativamente se degradam e portanto, os níveis de dopamina diminuem.⁷⁸ A deficiência de dopamina também pode levar a depressão clínica.⁷⁹ Sendo alguns dos sintomas da depressão subjetivos para uma quantificação e nem sempre tão simples de se avaliar. Uma forma simples e rápida de medir os níveis de dopamina pode ser decisiva no diagnóstico e acompanhamento da doença.

2.3.1 Polifenol oxidase

A enzima tirosinase (Tyr), também conhecida como monofenol oxidase (E.C. 1.14.18.1), é uma metaloenzima que apresenta dois átomos de cobre situados no sítio ativo e coordenados por átomos de oxigênio e nitrogênio de resíduos de histidina.⁸⁰⁻⁸¹ De acordo com a atual classificação, a Tyr faz parte da família de proteínas do tipo 3 (Figura 5 (a)).

A Tyr é capaz de catalisar dois tipos de reações: ortho-hidroxilação de fenóis levando a catecóis e desidrogenação de catecóis para o-quinonas.⁸² Por isso, esta enzima é muito utilizada para a construção de biossensores altamente seletivos para compostos fenólicos e difenólicos como catecol, fenol, ou dopamina.

Devido aos átomos de cobre, a transferência direta de elétrons é possível entre esta enzima e um eletrodo, permitindo a construção de biossensores de terceira geração. Contudo, existem poucos trabalhos na literatura reportando a DET, (trabalhos DET Tyr) pois o centro ativo da Tyr está dentro um bolso hidrofóbico, o que dificulta a DET.⁸⁰ A arquitetura do biossensor é, portanto, essencial para que se tenham bons resultados e o uso de nanomateriais é interessante para o aumento da DET entre a enzima e o eletrodo.

Figura 5 - (a) Estrutura cristalina de tirosinase de *Agaricus bisporus* obtida por difração de raio-X (2.30 Å) (PDB ID 2Y9W) (b) Exemplo de reação catalisada por Tyr

(a)

(b)

Fonte: Elaborada pelo autor

2.4 Aplicação de biossensores na detecção de mutações relacionadas ao câncer

2.4.1 DNA

Ácidos nucleicos, ácidos desoxirribonucleicos (DNA) ou ácidos ribonucleicos⁴⁶, são responsáveis por armazenar e transmitir a informação genética. O DNA entretanto, é estruturalmente mais estável que o RNA e portanto, mais adequado a armazenar a informação genética. Isto porque a ligação fosfodiéster no RNA tem mais chance de sofrer hidrólise devido ao grupo 2'-OH presente na pentose. Ainda, o DNA é mais fácil de reparar. Tanto DNA quanto RNA são polímeros de nucleotídeos, o DNA composto por adenina (A), timina (T), guanina (G) e citosina (C) e no RNA a T é substituída pela uracila (U). Os dois ácidos podem sofrer deaminação e essa reação converterá uma C em U. Porém, O DNA não contém a base nitrogenada U e assim, o erro será facilmente reconhecido e a molécula reparada, enquanto no RNA não será possível distinguir entre a uracila que ocorre naturalmente e a resultado da deaminação.⁸³

Apesar de mais estável, o DNA apresenta e sofre mutações. Essas mutações podem ser somáticas, as quais ocorrem em uma célula que se duplicará dando origem a uma população de células mutantes, entretanto a mutação não é transmitida às células germinativas. Além dessas, as mutações podem ser germinativas, as quais atingem as células germinativas que formam os gametas, fazendo com que a mutação possa ser transmitida à próxima geração. Cânceres estão ligados as mutações somáticas que levam ao crescimento celular descontrolado gerando os tumores. Os mecanismos que causam essas mutações ainda não são claros, entretanto sabe-se que a exposição a fatores mutagênicos ou cancerígenos induz essas mutações. Mutações germinativas também podem estar relacionadas ao câncer.

Certas mutações já foram identificadas como indicativos de predisposição ao desenvolvimento de certos tipos de câncer.⁸⁴ São marcadores genéticos muitas vezes ligados a inativação de genes supressores ou proto-oncogenes. A molécula de DNA apresenta uma estrutura composta por duas fitas em forma de dupla hélice unidas por interações de hidrogênio. Os nucleotídeos se ligam dois a dois, sempre uma purina com uma pirimidina, sendo que A pareia com T por duas interações de

hidrogênio e C pareia com T por três interações de hidrogênio. Escolhendo adequadamente uma sequência com um número suficiente de nucleotídeos é possível identificar um organismo específico⁶² ou uma mutação genética relacionada a uma doença⁸⁵, monitorando a hibridização entre fitas complementares. A hibridização com a fita complementar ocorre de maneira antiparalela, isto é, uma fita no sentido 5' → 3' é complementar a outra fita no sentido 3' → 5'.

2.4.2 Câncer de mama

O câncer de mama é o câncer que mais mata mulheres tanto em países desenvolvidos quanto em países em desenvolvimento.⁸⁶ O risco de desenvolver esse câncer aumenta com fatores reprodutivos como uso de anticoncepcionais orais, terapia hormonal pós-menopausa, menarca precoce, menopausa tardia, nunca ter tido filhos (nuliparidade) ou a primeira gestação após os 30 anos.⁸⁷

Se detectado em estágios iniciais, o câncer de mama apresenta maiores chances de cura. Aliado ao acesso e avanço nos tratamentos, muitos países da Europa ocidental e os Estados Unidos apresentam taxas menores de mortalidade se comparados a países menos desenvolvidos.⁸⁸ A mamografia e o autoexame das mamas são grandes aliados para a detecção precoce. Muitas mulheres também têm buscado testes genéticos para detectar mutações ligadas à predisposição ao desenvolvimento deste câncer. Entre as mutações, as mais conhecidas e que apresentam maior incidência são as mutações nos genes do câncer de mama humano (BRCA1, breast cancer associated gene 1) e 2 (BRCA2, breast cancer associated gene 2).

2.4.3 Gene BRCA1

Os genes BRCA1 e BRCA2 são genes supressores de tumor, isto é, produzem proteínas supressoras de tumor que auxiliam no reparo do DNA e assim, evitam o aparecimento das mutações somáticas que levam ao câncer. Sendo mutações germinativas, o indivíduo portador as herdou de um de seus pais, logo, aconselha-se realizar um teste genético caso exista histórico familiar que sugira a presença de mutação nociva nesses genes.

Localizado no cromossomo 17 no braço longo (q) na região 2 banda 1 (17q21), o gene BRCA1 codifica uma fosfoproteína nuclear parte de um complexo reparador de quebras de fita dupla.⁸⁹ Ela é composta por 1863 resíduos, sendo que nos 100 resíduos N-terminais encontram-se 20% das mutações mais relevantes para estudo em termos clínicos.

Figura 6 - Heterodímero formado entre os domínios BRCA1 e BARD RING. Estrutura obtida por ressonância magnética nuclear (PDB ID 1JM7)

Fonte: Elaborada pelo autor

Em populações judias Ashkenazi há prevalência de três mutações, duas no gene BRCA1, 185delAG e 5382insC, e uma no gene BRCA2, 6174delT. A mutação c.68_69del (185delAG), ainda que apresente maior incidência em populações Ashkenazi, ocorre em taxas comparáveis em populações não-Ashkenazi⁹⁰ e é encontrada com frequência significativa em pacientes com câncer de outras populações.⁹¹

Com o avanço das técnicas de sequenciamento, outras mutações relacionadas a predisposição de doenças vem sendo identificadas. Entretanto, testes genéticos ainda são de custo elevado, geralmente não são cobertos por planos de saúde e os resultados levam cerca de 8 dias a um mês para serem concluídos dependendo do laboratório.⁹²

3 OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho de mestrado foi desenvolver dois sistemas eletroquímicos para propósitos ambientais e medicinais. Para isso, AuNRs, Tyr e sequências de oligonucleotídeos foram estudados e utilizados para reduzir as interferências e para garantir a seletividade do biossensor. Primeiramente, o nanomaterial foi caracterizado bem como o eletrodo modificado pelo nanomaterial. Em seguida, o biossensor enzimático e o de DNA foram testados contra analitos específicos a fim de determinar e caracterizar os biossensores e determinar sua capacidade de detectar cada analito.

4 BIOSSENSOR DE TERCEIRA GERAÇÃO EM ELETRODO IMPRESSO DE CARBONO MODIFICADO COM NANOBASTÕES DE OURO E TIROSINASE

4.1 Objetivos específicos

Desenvolver e construir um biossensor para detecção de catecol e dopamina, utilizando tirosinase (Tyr) e nanobastões de ouro (AuNRs). A Tyr foi imobilizada via *crosslinking* sobre os AuNRs ligados a eletrodos de carbono impressos (SPCE) descartáveis.

4.2 MATERIAIS E MÉTODOS

4.2.1 Materiais

A enzima tirosinase extraída do cogumelo *Agaricus bisporus* (EC 1.14.18.1, 1000 U mg⁻¹), os sais KH₂PO₄ e Na₂HPO₄ para as soluções de tampão fosfato, os analitos fenólicos DA (dopamina) e CAT (catecol) foram obtidos da Sigma-Aldrich, bem como os reagentes dicloridrato de cistamina 98% e glutaraldeído 25%, empregados na imobilização da enzima. Os AuNRs foram estabilizados no dendrímero poli(amido amina) (PAMAM) geração 4 adquirido da Dendritech®, Inc. Midland. Utilizados na síntese do AuNRs, os reagentes ácido tetracloaurico (HAuCl₄), borohidreto de sódio (NaBH₄), nitrato de prata (AgNO₃) e brometo de hexadeciltrimetilamônio (CTAB) também foram adquiridos da Sigma-Aldrich.

Os eletrodos de carbono impressos DRP-110 (4 mm diâmetro) foram obtidos da DropSens®(Oviedo, Espanha).⁹³ O eletrodo de trabalho e contra-eletrodo são feitos de carbono enquanto o eletrodo de pseudo-referência é feito de tinta de prata, como pode ser visto na Figura 7.

Figura 7 - Eletrodo de carbono impresso

Fonte: DROPSSENS®⁹³

Os reagentes testados como interferentes ácido ascórbico (AA) e ácido úrico (AU), assim como os para a solução de plasma sanguíneo artificial CaCl_2 , NaCl , NaHCO_3 , KCl , $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ e Na_2SO_4 foram obtidos da Sigma-Aldrich.

4.2.2 Síntese de nanobastões de ouro

A síntese dos AuNRs foi realizada pelo método mediado por nucleação assistido por CTAB em meio aquoso.⁹⁴ Para sintetizar os núcleos, 300,0 μl de $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 0,01 mol L^{-1} foram adicionados a 7,5 ml de uma solução de CTAB 0,1 mol L^{-1} sob agitação. Em seguida, um volume 600,0 μl de NaBH_4 0,01 mol L^{-1} resfriado em gelo foi adicionado e o sistema foi mantido sob forte agitação por cerca de 10 minutos. A solução final foi então armazenada a 25°C e usada após 2 horas.

Para o crescimento dos AuNRs, 3,0 ml de $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 0,01 mol L^{-1} foram adicionados a 47,0 ml de CTAB 0,01 mol L^{-1} sob agitação. Depois, 300,0 μl de AgNO_3 0,01 mol L^{-1} e 480,0 μl de 0,1 mol L^{-1} ácido ascórbico também foram adicionados. Por fim, 100,0 μl da solução de nucleação foi adicionada mantendo a agitação branda e a temperatura ambiente. Finalizada a síntese, as suspensões foram deixadas em repouso por 24 horas a temperatura ambiente e protegida da luz. As suspensões foram então centrifugadas a 4000 rpm por 2 minutos para remover o

excesso de CTAB. O sobrenadante foi centrifugado por 5 minutos a 8000 g em uma centrífuga Spinlab SL-5GR, as partículas foram ressuspensas em água. Este último procedimento foi repetido mais uma vez.

4.2.3 Preparação do biossensor Tyr-AuNRs-PAMAM/SPCE

Nanomateriais de ouro são especialmente adequados para aplicação em biossensores devido a sua biocompatibilidade aliada a amplificação do sinal. Os eletrodos de carbono impresso (do inglês, *screen-printed carbon electrode*, SPCE) foram escolhidos, sendo composto por um eletrodo de trabalho e um contra-eletrodo, ambos de carbono e um pseudo-eletrodo de referência.

Uma solução de AuNRs e PAMAM geração 4 foi preparada na proporção 10:1 (AuNRs:PAMAM), um volume de 8 μl foi gotejado sobre o eletrodo de trabalho e deixado secar por aproximadamente 2 horas a 25°C. No eletrodo modificado pelo filme de AuNRs-PAMAM foi gotejada uma solução de cistamina (CYS) 10 mmol L^{-1} e deixada por 2 horas e, em seguida, foi lavado várias vezes com tampão fosfato pH 7,0 (0,1 mol L^{-1}). O excesso de tampão foi removido e GA 2,5% foi gotejado no eletrodo, deixou-se a solução secar por 1 hora e o eletrodo foi novamente lavado com tampão fosfato. A enzima foi então imobilizada gotejando no eletrodo uma solução contendo 900,0 μl de tampão fosfato 0,1 mol L^{-1} (pH 7,0), 100,0 μl de glicerol e 1kU Tyr. Passadas 2 horas, Tyr-AuNRs-PAMAM/SPCE foi lavado repetidamente com tampão fosfato e já estava pronto para uso. Todos os experimentos foram realizados à temperatura ambiente em uma célula eletroquímica de 10 ml. A Figura 8 mostra uma representação esquemática da preparação do biossensor.

Figura 8 - Esquema da preparação do biossensor Tyr-AuNRs-PAMAM/SPCE

Fonte: Elaborada pelo autor

4.2.4 Morfologia

Os AuNRs e o filme AuNRs/PAMAM foram analisados sobre um substrato de silício em microscópio eletrônico de varredura (MEV) de alta resolução, utilizando um equipamento modelo FEG XL30 da Phillips®. Também foram estudadas as camadas do biossensor usando microscopia de força atômica (do inglês atomic force microscopy, AFM) em um microscópio modelo Park NX10, Park Systems.

4.2.5 Medidas espectrofotométricas

Medidas de espectroscopia de absorção UV-Visível (UV-Vis) foram realizadas em um espectrômetro UV-Visível HITACHI modelo U-2900. Tanto os nanobastões

de ouro quanto a solução de AuNRs com PAMAM na proporção 10:1 foram analisadas por UV-Vis.

4.2.6 Medidas de espalhamento dinâmico de luz (DLS)

O espalhamento de luz dinâmico foi usado para estudar o efeito do pH nos AuNRs medindo o potencial zeta (potencial ζ) em um equipamento Zetasizer[®] Nano ZS90 (Malvern, Worcestershire, UK).

4.2.6 Medidas eletroanalíticas

As medidas eletroquímicas foram todas realizadas em um potenciostato/galvanostato Autolab PGSTAT 12 Eco Chemie, gerenciado pelo Software GPES, versão 2.9. Os eletrodos de carbono impresso DRP-110 foram adquirido na Dropsens[®] como já descrito da seção 4.2.1.

Todos os experimentos foram realizados à temperatura ambiente e as medidas de pH foram realizadas em um pHmetro de bancada HANNA Instruments[®], modelo pH 21.

4.2.7 Célula Eletroquímica

Parte dos experimentos que exigiam adição contínua de analito a um volume inicial de eletrólito de suporte foram executados em uma célula eletroquímica, sempre com o volume inicial de 10,0 ml. Nos demais experimentos foram utilizados 30 μ l da solução interesse sobre o eletrodo e trabalho.

4.2.8 Amostras

Os testes em amostras reais foram realizados com amostras de três rios e com água da torneira. Os rios foram: Rio São Lourenço no município de Itaiópolis/SC (26°19'49.4"S 49°55'38.9"O); represa do Rio Monjolinho, São Carlos/SP (21°59'10.7"S 47°52'53.0"O) e o Rio Piracicaba, Piracicaba/SP (22°43'16.5"S 47°39'19.9"W). O biossensor também foi testado em plasma sanguíneo artificial pH 7,4, preparado como descrito na literatura.⁹⁵

4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.3.1 Caracterização AuNRs e AuNRs-PAMAM

A espectroscopia de UV-Vis pode ser adotada para caracterizar nanobastões de ouro dado que as propriedades óticas dos nanobastões podem ser aproximadas pela teoria de Mie-Gans.⁹⁶ Tal teoria diz que a absorção é dependente da razão diâmetro/comprimento do nanobastão. Os AuNRs absorvem em duas regiões e portanto, apresentam duas bandas de absorção de ressonância plasmônica, uma mais forte devido a oscilação longitudinal dos elétrons e outra, mais fraca, relativa a oscilação transversal dos elétrons. Esta última não depende da razão diâmetro/comprimento e a absorção geralmente acontece em torno de 520 nm (comprimento de onda, λ). A absorção relativa as oscilações longitudinais podem absorver em diversos comprimentos de onda, dependendo da razão já que os AuNRs variam no seu comprimento, o que influencia no comprimento de onda de absorção.⁹⁷

Na Figura 9 pode-se observar o espectro de absorção dos AuNRs com duas bandas definidas, uma aproximadamente em 545 nm e a outra em 622 nm. Os espectros dos AuNRs e da solução AuNRs/PAMAM comparados indicam que a solução é estável e que não houve agregação. Isto porque, os modos de vibração do espectro da solução AuNRs-PAMAM não sofreram alterações relevantes, ocorrendo apenas um pequeno deslocamento na absorbância. Se houvesse agregação, bandas adicionais em comprimentos de onda mais elevados seriam observadas, indicando a presença de partículas de tamanhos maiores, os agragados.

Figura 9 –Espectros no UV-Visível de AuNRs(-) e AuNRs/PAMAM (-)

Fonte: Elaborada pelo autor

O efeito do pH também foi estudado. Para isso, os AuNRs foram diluídos em água na proporção de 1:20. Na faixa de 2,0 a 12,0 e com incremento de 0,5, o pH foi alterado pela adição de NaOH 0,1 mol L⁻¹ e HCL 0,1 mol L⁻¹ (Figura 10). É comum tratar uma nanopartícula como tendo estabilidade coloidal para potenciais ζ maiores que +30 mV ou menores que -30 mV, estabilidade essa mantida por repulsão eletrostática.⁹⁸ Como esse potencial é uma medida da carga de superfície do material, é altamente dependente da força e valência dos íons em solução, sendo interessante fazer um estudo variando os valores de pH. Os valores de pH abaixo de 5,0 exibiram pouca alteração no valor do potencial ζ , que ficou em torno de + 40 mV. Em pHs mais altos, o potencial ζ reduziu até atingir - 40 mV no intervalo de pH 11,5-12,0.

Figura 10 - Estudo do efeito do pH no potencial ζ de AuNRs, AuNRs/PAMAM e PAMAM

Fonte: Elaborada pelo autor

Com a finalidade de analisar a morfologia do nanomaterial, imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV) foram obtidas dos AuNRs (Figura 11(a)) e AuNRs-PAMAM (Figura 11(b)). As amostras foram preparadas em substrato de silício previamente limpo. A Figura 11(b) mostra uma solução estável e monodispersa do filme AuNRs-PAMAM, condição fundamental ao bom funcionamento e eficiência do sensor.

Figura 11 - (a) Imagens de AuNRs obtidas por MEV (b) Imagens de AuNRs-PAMAM por MEV

(a)

continua

continuação

(b)

Fonte: Elaborada pelo autor

4.3.2 Caracterização do eletrodo AuNRs-PAMAM/SPCE

O eletrodo AuNRs-PAMAM/SPCE consiste em um eletrodo de carbono impresso modificado com nanobastões de ouro pelo método de *casting*. Após aplicar os AuNRs-PAMAM na superfície do eletrodo de trabalho, este era seco à temperatura ambiente por 2 horas e então era utilizado.

A elevada área superficial dos AuNRs deve aumentar a área eletroativa do eletrodo. Tal fato é confirmado estimando a área eletroativa do eletrodo de trabalho e do eletrodo de trabalho modificado de acordo com a equação de Randles-Sevcik,⁹⁹

$$I_p = 2,69 \times 10^5 A D^{1/2} n^{3/2} v^{1/2} C \quad (1)$$

onde A é a área eletroativa (cm^2), D o coeficiente de difusão que para o $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ em solução é $6,2 \times 10^{-6} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$, n o número de elétrons transferidos na reação redox, v a velocidade de varredura (V s^{-1}), e C a concentração de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ ($\text{mol} \cdot \text{cm}^{-3}$). Os valores de pico de corrente foram obtidos por voltametria cíclica com velocidades de varredura variando de 10 a 400 mV s^{-1} em KCl 0,1 mol L^{-1} em presença de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ 1 mmol L^{-1} (Figura 12 (a) e (b)).

Figura 12 - Voltamogramas cíclicos obtidos em KCl 0,1 mol L^{-1} na presença de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ 1,0 mmol L^{-1} para (a) SPCE e (b) AuNRs-PAMAM/SPCE

continua

continuação

Fonte: Elaborada pelo autor

Para o eletrodo AuNRs-PAMAM/SPCE a área eletroativa foi $0,74 \pm 0,04 \text{ cm}^2$ e para SPCE, $0,1465 \pm 0,006 \text{ cm}^2$. Portanto, verificou-se um aumento de 5 vezes da área eletroativa devido à modificação com o AuNRs-PAMAM. O aumento da área eletroativa leva a uma amplificação do sinal eletroquímico, como pode-se notar na Figura 13.

Figura 13 - Voltamogramas cíclicos para o eletrodo SPCE (—) e AuNR-PAMAM/SPCE (—) em KCl 0,1 mol L⁻¹ e [Fe(CN)₆]⁴⁻ 1 mmol L⁻¹, $\nu = 100 \text{ mV s}^{-1}$

Fonte: Elaborada pelo autor

Um aumento na reversibilidade também é constatado comparando a diferença entre os picos de redução e oxidação (ΔE). O eletrodo modificado apresentou um ΔE de 69 mV enquanto o não-modificado, 185 mV, uma diferença de 116 mV para uma velocidade de 100 mV s^{-1} .

4.3.3 Caracterização do biossensor Tyr-AuNR-PAMAM/SPCE

Voltamogramas cíclicos (CVs) foram obtidos para o biossensor Tyr-AuNRs-PAMAM/SPCE e para AuNR-PAMAM/SPCE em tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ (pH 7,0) com velocidade de varredura 100 mV s^{-1} (Figura 15). Neste, o aparecimento de dois picos pode ser observado para o biossensor devido a presença de Tyr. São eles: um pico catódico no potencial 0,024 V e um pico anódico em 0,050 V. Ambos estão relacionados ao par redox Cu(II)/Cu(I) no centro ativo da enzima cujo potencial formal produzido é de 37 mV e o valor de ΔE é de 74 mV.

O mecanismo representado abaixo (Figura 14) mostra as três principais formas que o sítio ativo da Tyr pode assumir – met, oxy e deoxy – bem como as reações que ocorrem nesse sítio levando a conversão dos compostos fenólicos.¹⁰⁰

Figura 14 – Representação do mecanismo da Tyr

Fonte: Sotomayor, Tanaka *et al.*¹⁰¹

Figura 15 - Voltamogramas cíclicos para (a) AuNR-PAMAM/SPCE (—) e Tyr-AuNR-PAMAM/SPCE (—) em tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ (pH 7,0); $\nu = 100 \text{ mV s}^{-1}$ (b) para Tyr-AuNR-PAMAM/SPCE (—) em tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹

Fonte: Elaborada pelo autor

Foi estudada influência da velocidade de varredura nos CVs em tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ (pH 7,0). O aumento de v levou ao deslocamento do pico de oxidação para valores mais altos e do pico de redução para valores mais baixos, ou seja, em valores absolutos houve, aumento da corrente em ambos casos. Este comportamento indica uma reação controlada pela camada redox da Tyr imobilizada no eletrodo. Por isso, a reação deve ser tratada pelas equações de Laviron¹⁰²

$$E_{p_c} = E^0 + \frac{2,3 RT}{\alpha n F} \left[\log \frac{\alpha n F}{RT k_s} + \log v \right] \quad (2)$$

$$E_{p_a} = E^0 - \frac{2,3 RT}{(1-\alpha) n F} \left[\log \frac{(1-\alpha) n F}{RT k_s} + \log v \right] \quad (3)$$

$$\Delta E_p = \frac{2,3 RT}{\alpha(1-\alpha) n F} \left[\alpha \log(1-\alpha) + (1-\alpha) \log \alpha - \log \frac{RT k_s}{n F} + \log v \right] \quad (4)$$

sendo E_{p_a} e E_{p_c} são os potenciais correspondentes ao pico anódico e ao pico catódico, com $\Delta E_p = E_{p_a} - E_{p_c}$ é o coeficiente de transferência, a velocidade de varredura (V s⁻¹) e k_s , a constante de transferência heterogênea de elétrons (s⁻¹).

A partir da Equação 2, o coeficiente de transferência de carga (α) foi estimado em 0,327. A constante de transferência heterogênea de elétrons (k_s) foi calculada baseada na Equação 4 e no gráfico $\Delta E_p(V)$ vs. $\log v$ (V s⁻¹) (Figura 16 (c)) e seu valor encontrado foi 0,045 s⁻¹. Os valores estão em concordância com a literatura para a transferência direta de elétrons entre Tyr e eletrodo de prata¹⁰³ e para eletrodo de diamante dopado com boro.¹⁹

Figura 16 - (a) Voltamogramas cíclicos do biossensor Tyr-AuNRs-PAMAM/SPCE em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ a pH 7,0 com ν variando de 10 a 400 mV s^{-1} (b) Potenciais de pico catódico e anódico $E_{pc}(V)$ vs. $\log \nu (V \text{ s}^{-1})$ e (c) $\Delta E_p(V)$ vs. $\log \nu (V \text{ s}^{-1})$

continua

continuação

(c)

Fonte: elaborada pelo autor

Ainda, imagens de microscopia de força atômica (AFM) foram adquiridas para a caracterização do biossensor. As Figuras 17 (a) e a (c) são do eletrodo impresso sem modificação, as Figuras 17 (b) e a (d) são do biossensor, ou seja, Tyr-AuNRs-PAMAM/SPCE. Comparando as figuras 17 (a) e (c) nota-se uma redução na rugosidade da superfície que ocorre devido ao recobrimento da superfície de carbono com as camadas do biossensor (AuNR-PAMAM, CYS, GA e Tyr). As Figuras 17 (b) e (d) deixam isso evidente ao apresentar um aumento na altura do eletrodo em decorrência da sobreposição de camadas.

Figura 17 - Imagens de AFM observando a (a) fase do SPCE (b) fase do Tyr-AuNRs-PAMAM/SPCE (c) altura do SPCE e (d) altura do Tyr-AuNRs-PAMAM/SPCE

Fonte: Elaborada pelo autor

4.3.4 Determinação de compostos fenólicos

A Tyr é capaz de converter compostos fenólicos para suas o-quinonas correspondentes e com isso surge a possibilidade de detectar estes compostos por redução eletroquímica.¹⁰⁴

Utilizando a técnica de voltametria de varredura linear ($v = 50 \text{ mV s}^{-1}$), pode-se realizar uma análise comparativa do biossensor em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,0) (-) e, logo após, em solução de CAT $50,0 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ (-), na qual se destaca o aumento de corrente na presença do composto, como pode ser verificado na Figura 18. O aumento na corrente do pico de redução é observado e indica a atividade catalítica da enzima na reação, evidenciando a relação entre aumento na corrente e a presença do composto fenólico.

Figura 18 – Picos de redução de Tyr-AuNRs-PAMAM/SPCE em tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ (pH 7,0) (—) e em solução de CAT 50,0 μmol L⁻¹; obtidos por voltametria de varredura linear; $\nu = 50 \text{ mV s}^{-1}$.

Fonte: Elaborada pelo autor

4.3.4 Efeito do pH

O pH pode alterar o comportamento de um biossensor enzimático visto que as enzimas apresentam um intervalo de pH ótimo no qual apresentam máxima atividade.¹⁰⁵ Para investigar o comportamento eletroquímico em diferentes pHs foram obtidos voltamogramas lineares para os pHs 5,0, 6,0, 7,0 e 8,0 em tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹. Na Figura 18 observa-se que o valor de corrente é mais elevado e o pico de redução é mais definido em pH 7,0, para o CAT, o que é coerente já que o intervalo ótimo da enzima é 6-7.¹⁰⁶

Figura 19 – (a) Efeito do pH na resposta do biossensor ao catecol $50 \mu\text{mol L}^{-1}$ em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ para os valores de pH 5,0, 6,0, 7,0 e 8,0. (b) Gráfico I_{pc} vs pH.

Fonte: Elaborada pelo autor

4.3.5 Curva Analítica

A relação entre a corrente catódica e as concentrações de CAT e DA foram estudadas por amperometria aplicando-se um potencial de -0,4 V, previamente otimizado, para soluções de CAT e DA feitas em tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ (pH 7,0). Para os dois analitos houve acréscimo na corrente catódica conforme eram feitas adições sucessivas de CAT ou DA sob agitação constante. A regressão linear pode ser extraída entre as concentrações 2,8 a 30,3 μmol L⁻¹ para o CAT, cuja equação é $I_{pc} (\mu A) = 7,388 + 0,268 [CAT] (\mu mol L^{-1})$ com coeficiente de correlação de 0,997 e limite de detecção de 1 μmol L⁻¹ (Figura 20). Para a DA, o intervalo de concentrações da regressão linear foi de 27,8 a 448,7 μmol L⁻¹, resultando a equação $I_{pc} (\mu A) = 8,021 + 0,011 [DA] (\mu mol L^{-1})$, com coeficiente de correlação 0,994 (Figura 21). Os limites de detecção foram calculados por

$$LD = 3 \times \frac{SD}{m} \quad (5)$$

em que LD é o limite de detecção, SD é o desvio padrão do branco e m é a inclinação da curva analítica.

Figura 20 – (a) Curva analítica do Tyr-AuNR-PAMAM/SPCE para CAT com concentrações de 2,8 a 30,3 $\mu\text{mol L}^{-1}$ em tampão fosfato 0,1 mol L^{-1} (pH 7,0), potencial aplicado=-0,4V (b) Molécula de catecol

(a)

(b)

Fonte: Elaborada pelo autor

Figura 21 – (a) Curva analítica do Tyr-AuNR-PAMAM/SPCE para DA com concentrações de 27,8 a 448,7 $\mu\text{mol L}^{-1}$ em tampão fosfato 0,1 mol L^{-1} (pH 7,0); potencial aplicado = -0,4V (b) Molécula de dopamina

(a)

(b)

Fonte: Elaborada pelo autor

A repetibilidade e reprodutibilidade do biossensor descartável foram testadas para CAT $80 \mu\text{mol L}^{-1}$ ($n=4$) e DA ($n=4$). A repetibilidade foi avaliada realizando 4 medidas sucessivamente usando um único biossensor para cada analito. O desvio padrão relativo (RSD) calculado para o CAT foi de 2,0% e para a DA 1,9%. A reprodutibilidade também foi avaliada. As medidas foram feitas em 4 diferentes biossensores para cada analito (uma medida cada). Valores de RSD foram 2,6% para o CAT e 5,6% para a DA.

4.3.6 Estudo de interferência e análise de amostra

A interferência causada por espécies eletroativas presentes em amostras biológicas e ambientais foi investigada, utilizando a técnica de amperometria, para verificar a seletividade do Tyr-AuNRs-PAMAM/SPCE. Este estudo foi conduzido em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,0) contendo $80 \mu\text{mol L}^{-1}$ de analito juntamente com cada interferente testada na concentração de $800 \mu\text{mol L}^{-1}$. Os interferentes testados para amostras biológicas foram ácido ascórbico (AA) e ácido úrico (AU), pois ambas moléculas podem interferir na determinação eletroquímica da DA já que os potenciais dessas moléculas são próximos ao potencial do analito de interesse. Todavia, o biossensor apresentou baixa interferência em relação a esses reagentes, sendo RSD para AA 1,0% e para AU, 0,9%. Para amostras ambientais os interferentes analisados foram KCl, K_2CO_3 e Na_2CO_3 , os resultados estão descritos na Tabela 1.

Tabela 1 – Valores de desvio padrão relativo para os interferentes KCl, K_2CO_3 e Na_2CO_3 para amostra ambiental

Interferente	RSD (%)
KCl	0,5
K_2CO_3	1,5
Na_2CO_3	9,7

Fonte: elaborada pelo autor

Os valores mais elevados de RSD para os compostos com íons carbonato ocorrem porque o íon CO_3^{2-} provoca alterações no pH da solução. Quando há um

aumento na quantidade de íons CO_3^{2-} em solução há um aumento do pH, a enzima, por sua vez e a atividade da enzima é sensível a essas variações.

Amostras de água natural foram coletadas de três rios, rio Monjolinho (São Carlos/SP), rio Piracicaba (Piracicaba/SP) e rio São Lourenço (Itaiópolis/SC) e também, de água de torneira para análise do CAT. As concentrações de interesse proporcionaram ótimos resultados de valores de recuperação para todas as amostras, atestando que o biossensor é adequado para detecção de compostos fenólicos, sendo que valores de recuperação mais discrepantes entre as amostras indicam uma variação de pH mais significativa, o que pode ser visto comparando os resultados da água de torneira, que apresenta pH em torno de 7,0, as amostras de água de rio com pHs mais variados. Para a DA, o biossensor foi testado em plasma artificial, também apresentando bons valores de recuperação. Os resultados são apresentados na Tabela 2 e Tabela 3.

Tabela 2 - Determinação de compostos fenólicos em plasma sanguíneo artificial.

Amostra	Adicionado ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Biossensor ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Recuperação (%)
Plasma sanguíneo artificial	122,9	110,8	90,2
	162,6	144,1	88,6
	201,6	210,5	104,4
	240,0	243,7	101,5
	291,0	276,9	95,2

Fonte: Elaborada pelo autor

Tabela 3 - Determinação de compostos fenólicos em amostras reais de água

Amostra	Adicionado ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Biossensor ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Recuperação (%)
Rio Monjolinho	12,29	10,31	84,0
	16,26	14,36	88,0

Rio Piracicaba	8,24	8,69	105,0
	12,29	14,36	116
Rio São Lourenço	2,78	3,02	108,0
	5,52	5,65	102,0
	8,24	8,29	100,0
	12,29	11,93	97,0
	16,26	15,78	97,0
	2,78	2,82	101,0
Água da torneira	5,52	5,45	99,0
	8,24	8,29	100,0
	12,29	12,33	100,0
	16,26	16,18	99,0

Fonte: Elaborada pelo autor

Algumas características analíticas do biossensor foram comparadas com outros biossensores de Tyr reportados da literatura (Tabela 4). Observa-se que o intervalo linear e limite de detecção são similares comparados a outros sensores eletroquímicos propostos para detectar compostos fenólicos. Além disso, podemos destacar que o Tyr-AuNRs-PAMAM/SPCE apresenta boa performance na determinação de CAT e DA utilizando amperometria.

Tabela 4 - Comparação entre biossensores de Tyr reportados na literatura.

Biossensor	CAT		DA		Referência
	Intervalo linear ($\mu\text{mol.L}^{-1}$)	Limite de detecção ($\mu\text{mol.L}^{-1}$)	Intervalo linear ($\mu\text{mol.L}^{-1}$)	Limite de detecção ($\mu\text{mol.L}^{-1}$)	
Tyr-graphite-epoxy	Até 200	0,04	X	X	107
PCS(Tyr)-HRP-SPCEs	0,12 - 43	0,01	X	X	8
Tyr-Fe ₃ O ₄ NPs-chitosan/GCE	0,085 - 70	25	X	X	108
Tyr-SWNTs/Ppy	X	X	5 - 50	5	109
MWNT/Nafion/Tyr-GCE	1 - 23	0,22	5 - 23	0,52	110
PEDOT-Tyr/Au	X	X	10 - 300	4,18	111
Tyr-AuNRs/PAMAM-SPCE	2,8 - 30,3	1	27,8 - 448,7	10	Este trabalho

PEDOT - Poli (3,4-etilenodioxitiofeno)

PCS - poly(carbamoylsulfonate)

Dados obtidos em ^{8; 107-111}

Fonte: Elaborada pelo autor

4.4 CONCLUSÕES

Neste trabalho foi proposta uma nova arquitetura de biossensor de tirosinase para compostos fenólicos. Eletrodos impressos de carbono foram modificados com AuNRs e aumentaram consideravelmente a performance eletroquímica do eletrodo. Além disso, foi observada a transferência direta de elétrons entre a enzima e a superfície do eletrodo, consequência da eletroquímica direta do par redox

Cu(I)/Cu(II) presente no centro eletroativo da Tyr. A Tyr também conferiu excelente seletividade ao CAT e a DA, confirmada pelas medidas eletroquímicas. Por fim, o biossensor apresentou ótima performance em amostras reais, que aliada ao seu preparo simples e caráter descartável mostra qualidades essenciais para aplicação.

5 SENSOR DE DNA PARA MUTAÇÃO GENÉTICA RELATIVA PREDISPOSIÇÃO AO CÂNCER DE MAMA

5.1 Objetivos específicos

Desenvolver um sensor de DNA (genossensor) utilizando eletrodo de ouro e técnica de impedância eletroquímica para a detecção de mutação 68_69del relacionada à predisposição ao câncer de mama.

5.2 MATERIAIS E MÉTODOS

5.2.1 Materiais

Para o desenvolvimento do genossensor, os seguintes oligonucleotídeos foram adquiridos da Life Technologies (Tabela 5).

Tabela 5 - Sequências de DNA utilizadas no desenvolvimento do genossensor para a mutação c.68_69del (185delAG)

Descrição	Oligonucleotídeo	Comprimento (número de monômeros)
Sequência de captura (HS-ssDNA)	5' HS -(CH ₂) ₆ -TGCAGAAAATCTTAGTGTCCCATCT 3'	25-mer
Sequência alvo (tarDNA)	3' ACGTCTTTTAGAATCACAGGGTAGA 5'	25-mer
Sequência não-complementar (ncsDNA)	3' ACGTCTTTTAGAATCT C ACAGGGTAGA 5'	27-mer

Fonte: Elaborada pelo autor

A sequência de captura foi modificada para conter um composto tiol na extremidade 5', pois o enxofre possui forte afinidade com o ouro e metais nobres. Todos os oligonucleotídeos foram purificados por cromatografia líquida de alta performance (HPLC) e recebidos na forma liofilizada.

Cada sequência foi diluída em tampão Tris-EDTA (TE) (pH 8,0) para armazenamento e preparo de alíquotas de DNA nas concentrações pertinentes a cada experimento. Tris(hidroximetil)aminometano hidrocloreto (Tris-HCl) e ácido etilenodiamino tetraacético (EDTA, Ethylene diamine tetraacetic acid) foram obtidos da Sigma-Aldrich assim como 2-mercaptoetanol (2-ME).

Eletrodos de ouro cilíndricos de 2 mm de diâmetro parcialmente revestidos com Teflon® foram escolhidos para o preparo do genossensor, representado na Figura 21. O método de limpeza dos eletrodos exigiu o uso de H_2SO_4 e H_2O_2 . Na caracterização eletroquímica, $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{-3/4}$ 5 mmol L^{-1} foi preparado em tampão fosfato 0,1 mol L^{-1} (pH 7,0), composto pelos sais de fosfato KH_2PO_4 e Na_2HPO_4 . Todos os reagentes foram adquiridos da Sigma-Aldrich.

Figura 22 - Representação eletrodo cilíndrico de ouro

Fonte: Elaborada pelo autor

5.2.2 Medidas eletroanalíticas

As medidas eletroquímicas foram realizadas em um potenciostato/galvanostato Autolab PGSTAT 12 Eco Chemie. A configuração utilizada foi um sistema de três eletrodos com eletrodo de referência Ag/AgCl (KCl 3,0 mol L⁻¹), eletrodo auxiliar de platina e eletrodo de trabalho de barra de ouro com 2 mm de diâmetro CH instruments, CHI 101.

Todos os experimentos foram realizados à temperatura ambiente e as medidas de pH foram realizadas em um pHmetro de bancada HANNA Instruments®, modelo pH 21.

5.2.3 Célula Eletroquímica

Os experimentos foram realizados em uma célula eletroquímica, confeccionada em vidro Pyrex, com o volume de 15 mL da solução de [Fe(CN)₆]^{-3/-4} 5,0 mmol L⁻¹ preparada em tampão fosfato.

5.2.4 Espectroscopia de Impedância eletroquímica (EIS)

Impedância eletroquímica pode ser determinada aplicando um potencial de corrente alternada (AC) a uma célula eletroquímica e medindo o valor de corrente. Por exemplo, se um potencial senoidal é aplicado, a resposta é uma corrente AC de sinal senoidal que será analisada por série de Fourier. Tanto a reatância, a componente imaginária quanto a resistência, real e imaginária, são utilizadas combinadas nessa técnica. Tipicamente, um diagrama de Nyquist ou um diagrama de Bode representam os dados de EIS para uma célula eletroquímica. Apesar de cada ponto do diagrama de Nyquist representar a impedância em uma dada frequência, ele não mostra diretamente qual o valor dessa frequência. O diagrama de Nyquist (Figura 23), entretanto, apresenta diversas vantagens, incluindo seu formato, que permite visualizar os efeitos da resistência ôhmica e comparar experimentos distintos, uma vez que o formato se mantém em um padrão único.

O diagrama de Nyquist para o circuito equivalente de Randles (Figura 24) pode ser dividido em 3 regiões: região de altas frequências, região de frequências intermediárias e região de baixas frequências. A região de altas frequências está

relacionada à resistência da solução (R_s). A região intermediária corresponde a resistência à transferência de elétrons (R_p) dada pelo diâmetro do semi-círculo. As frequências baixas, por sua vez, estão associadas a uma resposta capacitiva da dupla camada (C_d) e a difusão de espécies eletroativas, dada pela impedância Z_W que é a medida relativa a dificuldade do transporte de massa por difusão.¹¹²⁻¹¹³

Figura 23 - Diagrama de Nyquist para espectro de impedância faradaica.

Fonte: elaborada pelo autor

Figura 24 - Circuito equivalente

Fonte: elaborada pelo autor

5.2.5 Ressuspensão, preparo e armazenamento de alíquotas de DNA

Os olinucleotídeos foram recebidos na forma liofilizada e assim fez-se necessário ressuspendê-los em solução aquosa. Primeiramente, os frascos contendo as sequências liofilizadas foram centrifugados a 1000 rpm por 5 minutos. Em seguida, os oligonucleotídeos foram ressuspensos em tampão TE (10,0 mmol L⁻¹ Tris; 0,1 mmol L⁻¹ EDTA; pH 8,0) para que o pH fosse mantido e a degradação do DNA evitada. Multiplicando-se o número de nanomols presentes no tubo por 10, esse valor equivale ao volume de tampão a ser adicionado para uma solução estoque de 100,0 µmol L⁻¹. Parte dessa solução estoque foi utilizada no preparo de alíquotas de 1,0 µmol L⁻¹ para uso, evitando descongelar repetidamente a solução estoque.

5.2.6 Limpeza dos eletrodos de ouro

A limpeza da superfície do eletrodo é fundamental para a confiabilidade dos experimentos e adsorção das moléculas. Dois métodos de limpeza são aplicados consecutivamente de acordo com os experimentos reportados na literatura.¹¹⁴ O primeiro método emprega H₂SO₄ e H₂O₂ na proporção 3:1, solução conhecida como solução “piranha”. O eletrodo é imerso na solução, em seguida é enxaguado com água Milli-Q. O segundo método consiste em uma limpeza eletroquímica. Usando uma solução de H₂SO₄ 0,1 mol L⁻¹ aplicou-se um potencial cíclico de 0 a 1800 mV s⁻¹ em duas velocidades de varredura, 300 mV s⁻¹ (25 ciclos) e 100 mV s⁻¹ (25 ciclos). O potencial deve ser aplicado até que o sinal estabilize. O procedimento foi padronizado em 25 ciclos para cada velocidade pois o sinal de resposta já se apresenta estável ao final dos 50 ciclos, certificando que o eletrodo está limpo e pronto para uso.

5.2.7 Preparação do sensor de DNA

As etapas do preparo do sensor de DNA são (a) imobilização da sequência de captura (HS-ssDNA), (b) organização da monocamada HS-ssDNA+2-ME e (c) interação do HS-ssDNA com oligonucleotídeos livres, como representado na Figura 25.

A primeira etapa da construção do sensor é dependente da ligação entre o enxofre do grupo sulfidril (SH) no tiol e o ouro do eletrodo que ocorre pela ligação do enxofre ao ouro já que a molécula de DNA funcionalizada tende a difundir da solução aquosa para a superfície limpa de ouro.¹¹⁵ O procedimento consistiu em imergir a superfície do eletrodo em 30,0 μL de solução de HS-ssDNA 100,0 nmol L^{-1} por 1 hora, enxaguar o eletrodo com tampão fosfato 0,1 mol L^{-1} (pH 7,0) para remover as moléculas não adsorvidas, e secar com com fluxo brando de nitrogênio (N_2).

Na etapa seguinte, o eletrodo foi imerso em excesso de 2-ME 1,0 mmol L^{-1} por 1 hora e novamente enxaguado com tampão fosfato 0,1 mol L^{-1} (pH 7,0) e seco com com fluxo brando de gás nitrogênio (N_2). O 2-ME rearranja a disposição das moléculas de DNA removendo as que não tenham adsorvido especificamente na superfície do eletrodo e alinha as cadeias carbônicas devido à formação de interações de Van de Waals entre as cadeias.^{116; 117}

A interação do HS-ssDNA com oligonucleotídeos livres é o último passo da montagem do genossensor. O eletrodo já modificado com a monocamada de HS-ssDNA+2-ME é imerso em um volume de 30,0 μL de tarDNA ou em 30,0 μL de sequência não-complementar, ambos por 12 horas, com concentrações diversas.

Figura 25 - Representação esquemática da montagem do genossensor

Fonte: Elaborada pelo autor

5.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.3.1 Caracterização do genossensor

A hibridização de duas fitas de DNA é baseada no reconhecimento de pares de base e ligação por interações de hidrogênio (paridade de bases Watson-Crick), duas interações entre adenina e timina e três entre citosina e guanina. A detecção eletroquímica do evento pode envolver o monitoramento de variações de resistência na superfície do eletrodo ou de respostas de corrente.¹¹⁸ Os sensores de DNA podem conter um marcador associado, por exemplo, um marcador fosforescente, enzimático ou nano-particulado. Entretanto, associar um marcador a uma biomolécula pode alterar suas propriedades de ligação, além do uso de marcadores tender a elevar os custos de desenvolvimento do sensor. Em vista disso, sensores livres de marcadores (do inglês, *label-free*) tem atraído grande interesse no estudo de genossensores.

Utilizando-se espectroscopia de impedância eletroquímica como técnica de leitura das variações de propriedades eletroquímicas na interface do eletrodo, um genossensor para a mutação c.68_69del (185delAG) no gene BRCA1 relacionada à predisposição ao câncer de mama foi proposto. O estudo consistiu na detecção da deleção de duas bases uma A e uma G, ou T e C para a fita complementar. Diagramas de Nyquist foram obtidos para estudar o genossensor.

Para verificar se houve imobilização de HS-ssDNA na superfície do eletrodo analisou-se a variação na resistência de transferência de carga (R_p) entre o eletrodo de ouro limpo e o imerso em solução de HS-ssDNA, sendo R_p representada pelo diâmetro do semicírculo. No eletrodo de ouro limpo não se observa resistência. Após a imobilização de HS-ssDNA, há aumento da resistência, sendo o valor de R_p igual a 434 Ω . Na figura 26 é possível observar essa variação em decorrência da redução da transferência de elétrons.

Figura 26 - Diagramas de Nyquist para eletrodo de ouro e HS-ssDNA 100 nmol L⁻¹ obtidos em solução de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ 5,0 mmol L⁻¹ preparada em tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ (pH 7,0)

Fonte: Elaborada pelo autor

Em seguida é feita a análise do comportamento do eletrodo após imersão em solução de 2-ME 1,0 mmol L⁻¹ (Figura 27). Como esperado, ocorreu um aumento considerável na R_p (3932 ohm), pois há formação de uma camada mista recobrindo a superfície do eletrodo após a absorção do 2-ME e, portanto, um aumento da resistência com consequente redução da transferência de elétrons.

Figura 27 - Diagramas de Nyquist para eletrodo de ouro, HS-ssDNA 100 nmol L⁻¹ e HS-ssDNA+2-ME obtidos em solução de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ 5,0 mmol L⁻¹ preparada em tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ (pH 7,0)

Fonte: Elaborada pelo autor

Como forma de certificar se a hibridização entre as fitas complementares ocorre, realizou-se a montagem idêntica a descrita na seção 5.2.7 eliminando a adsorção do 2-ME, com tempo de hibridização de 2 horas e concentração de tarDNA de 200,0 nmol L⁻¹. A Figura 28 evidencia a formação da dupla fita, e que a variação de R_p , de 410 Ω para HS-ssDNA para 498 Ω para dsDNA, não é consequência de adsorção não-específica na monocamada HS-ssDNA+2-ME.

Figura 28 - Diagramas de Nyquist para HS-ssDNA e dsDNA (a) obtidos em solução de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ 5,0 mmol L⁻¹ preparada em tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ (pH 7,0)

Fonte: Elaborada pelo autor

5.2.6 Otimização da hibridização

O estudo da otimização do genossensor focou em duas variáveis: o tempo de hibridização, e a influência do 2-ME na imobilização do HS-ssDNA. A hibridização entre fitas complementares acontece de maneira rápida, entretanto, o tempo de hibridização afeta a seletividade do sensor, principalmente em genossensores sem marcadores ou qualquer tipo de amplificação de sinal.

A preparação do genossensor ocorreu como descrito na seção 5.2.5, com tempos de hibridização de 2, 4, 6, 8 e 12 horas (Figura 29) e concentração de tarDNA de 200,0 nmol L⁻¹. O incremento do valor de R_p com o aumento do tempo de hibridização é visível e tem tendência linear. Ainda que mais horas de hibridização (>12 horas) possam contribuir com o aumento do sinal analítico, o eletrodo atinge uma saturação dependente do número de ssDNA imobilizadas. Sendo assim, como

o maior valor de R_p obtido foi 12 horas escolheu-se esse tempo de hibridização para estudos posteriores.

Figura 29 – (a) Diagramas de Nyquist para eletrodo de ouro, HS-ssDNA $100,0 \text{ nmol L}^{-1}$, HS-ssDNA+2-ME e dsDNA obtidos em solução de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ $5,0 \text{ mmol L}^{-1}$ preparada em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,0) (b) R_p vs. tempo

Fonte: Elaborada pelo autor

Em se tratando da influência do 2-ME na imobilização de HS-ssDNA, duas formas de montagem via ligação Au-S são reportadas na literatura. Em uma, o HS-ssDNA e o 2-ME estão na mesma solução e serão colocados em contato com o eletrodo ao mesmo tempo ((HS-ssDNA+2ME)). Na segunda forma, o HS-ssDNA e 2-ME são soluções distintas (HS-ssDNA+2-ME) e a solução contendo HS-ssDNA é colocada em contato com o eletrodo e em seguida, o 2-ME.¹¹⁹⁻¹²⁰ A Figura 30 compara a hibridização dos dois casos. No modo de preparado em que HS-ssDNA e 2-ME são empregados separadamente, o R_p exibe valores maiores. Esse fato relaciona-se a existência de mais moléculas de DNA adsorvidas no eletrodo, pois não há competição pelos sítios do ouro. Portanto, de acordo com o experimento com soluções distintas de HS-ssDNA e 2-ME, esse formato foi selecionado para estudos posteriores.

Figura 30 - Diagramas de Nyquist para eletrodo de ouro, (HS-ssDNA+2-ME)+dsDNA e HS-ssDNA+2-ME+dsDNA obtidos em solução de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ 5,0 mmol L⁻¹ preparada em tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ (pH 7,0)

Fonte: Elaborada pelo autor

5.2.8 Seletividade de hibridização

Com objetivo de verificar a seletividade do sensor, realizou-se um ensaio de complementariedade com a sequência que não contém a mutação (ncsDNA). A diferença entre a sequência mutante e a não-mutante é a deleção de um par de bases AG ou o complementar TC, e o sensor deve ser capaz de detectar essa diferença. A concentração de $25,0 \text{ nmol L}^{-1}$ de ncsDNA foi testada, com tempo de hibridização de 12 horas (Figura 31).

Figura 31 – (a) Diagramas de Nyquist para HS-ssDNA ($100,0 \text{ nmol L}^{-1}$)+2-ME e HS-ssDNA ($100,0 \text{ nmol L}^{-1}$)+2-ME+ncsDNA ($25,0 \text{ nmol L}^{-1}$) obtidos em solução de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ $5,0 \text{ mmol L}^{-1}$ preparada em tampão fosfato $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,0) (b) gráfico de barras comparando R_p de HS-ssDNA ($100,0 \text{ nmol L}^{-1}$)+2-ME e HS-ssDNA ($100,0 \text{ nmol L}^{-1}$)+2-ME +ncsDNA (25 nmol L^{-1})

continua

continuação

Fonte: Elaborada pelo autor

Os valores de R_p praticamente não variam, os quais se mantêm dentro do erro do sistema - dado pelo desvio padrão - provando a especificidade do eletrodo proposto.

5.2.7 Detecção da hibridização

Por fim, o efeito da concentração de tarDNA foi estudada. HS-ssDNA+2-ME foi exposto a várias concentrações de tarDNA para determinar o comportamento analítico do genossensor (Figura 32). Observou-se que o diâmetro do diagrama de Nyquist, R_p , aumenta com o aumento dos níveis de tarDNA. Essa dependência mostrou-se linear na faixa de $1,0 \text{ nmol L}^{-1}$ a 200 nmol L^{-1} . Dessa forma, é possível obter a equação da regressão linear correspondente a essa faixa baseada em seis valores de concentração que são $1,0$, 10 , 50 , 100 , 150 e 200 nmol L^{-1} . A equação é $R_p (\text{k}\Omega \cdot \text{cm}^2) = 1082 + 8,145 [\text{tarDNA}] (\text{nmol L}^{-1})$ com coeficiente de correlação R^2

igual a 0,995 ($n=3$). O limite de detecção foi calculado pelo sinal do branco, nesse caso a configuração HS-ssDNA+2-ME do genossensor, utilizando a relação

$$LD = \frac{3 \times SD}{m} \quad (6)$$

onde SD é o desvio padrão do branco e m é a inclinação da curva analítica e o valor encontrado foi $0,14 \text{ nmol L}^{-1}$.

Figura 32 – (a) Diagramas de Nyquist para seis valores de concentração: 1,0, 10,0, 50,0, 100,0, 150,0 e 200 nmol L^{-1} da sequência tarDNA. (b) Curva analítica para HS-ssDNA+2-ME+dsDNA

continua

continuação

Fonte: elaborado pelo autor

O limite de detecção e intervalo linear de alguns genossensores estão descritos na Tabela 6 para serem comparados a este trabalho.

Tabela 6 - Comparação entre genossensores reportados na literatura.

Eletrodo de trabalho	Marcador	Estratégia	Limite de detecção (nmol L ⁻¹)	Sonda	Referência
Ouro	Enzima	Direta	10 ⁻²	[Fe ₆] ^{-3/-4}	121
Ouro	Enzima	Direta	10 ⁻⁶	Ru(NH ₃) ₆ Cl ₃	122

Ouro	—	Direta	10^{-1}	$[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{-3/-4}$	123
rGO-GCE	—	Direta	10^{-4}	$[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{-3/-4}$	124
ouro	—	Direta	10^{-1}	$[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{-3/-4}$	Este trabalho

*rGO - grafeno oxidado reduzido, GCE - eletrodo de carbono vítreo

** $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6\text{Cl}_3$ - Cloreto de hexaaminorutênio (III)

Dados obtidos em ^{121; 122; 123; 124}

Fonte: Elaborada pelo autor

5.4 CONCLUSÕES

Foi desenvolvido um sensor de DNA sobre eletrodo de ouro para mutação no gene BRCA 1 relacionada à predisposição ao câncer de mama, a c.68_69del, historicamente conhecida como 185delAG. Provando que é possível distinguir duas sequências de DNA cuja diferença consiste da deleção de um par de bases nitrogenadas. O eletrodo é de fácil preparação e o desempenho satisfatório o transforma em uma interessante ferramenta analítica para a análise em amostras clínicas, visando o aconselhamento gênico de homens e mulheres que possuem essa mutação.

6 CONCLUSÕES GERAIS

Neste trabalho mostra-se o potencial para o desenvolvimento e estudo de novos biossensores para a medicina e o meio ambiente, pois os resultados exibem a aplicabilidade de nanomateriais em biossensores enzimáticos em eletrodos impressos descartáveis, assim como a capacidade dos genossensores de detectar mutações com apenas dois nucleotídeos de diferença.

No biossensor enzimático, a modificação do eletrodo de carbono com AuNRs estabilizados em dendrímero favoreceu a transferência direta de elétrons entre a superfície do eletrodo e a enzima imobilizada via cistamina e glutaraldeído.

Testado contra dois analitos, CAT e DA, o biossensor mostrou-se eficiente para aplicação ambiental e medicinal. A faixa linear e limite de detecção foram 2,8 a 30,3 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e 1,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ para o CAT, e 27,8 a 448,7 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e 10,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ para a DA, obtidos por amperometria.

O biossensor também teve ótima performance em amostras reais e na presença de interferentes. Ainda, boas repetibilidade e reprodutibilidade foram adquiridas para esse biossensor.

O sensor de DNA de hibridização direta foi capaz de detectar a mutação relacionada a predisposição ao câncer de mama. Utilizando espectroscopia de impedância eletroquímica, o genossensor foi capaz de diferenciar uma diferença de apenas dois nucleotídeos equivalente a deleção da adenina e guanina ou complementar timina e citosina.

A imobilização do oligonucleotídeo em eletrodo de ouro por ligação Au-S mostrou-se efetiva. Além disso, o rearranjo e alinhamento das moléculas de DNA devido às interações de Van der Waals entre as cadeias de DNA e 2-ME foi eficiente e permitiu a hibridização da fita complementar com êxito.

O limite de detecção e faixa linear encontrados foram 1,0 a 200,0 nmol L^{-1} e 0,14 nmol L^{-1} . empregando $[\text{Fe}(\text{CN}_6)]^{-3/-4}$ como mediador.

7 PERSPECTIVAS

Para detecção de compostos fenólicos o biossensor enzimático pode ser testado com amostras reais de plasma sanguíneo. Também, pode ser realizado o estudo do biossensor frente a outras metodologias como impedância eletroquímica, impedância elétrica, microbalança de cristal de quartzo (QCM) ou transistor de efeito de campo (FET). Outro teste seria comparar a outras técnicas já usadas na detecção como cromatografia líquida de alta performance (HPLC) em coluna de fase reversa, analisando eficiência, praticidade e acurácia.

Os nanobastões de ouro podem ser sintetizados em diferentes razões diâmetro/comprimento. Assim, podem ser preparados filmes para modificarem o eletrodo com esses nanobastões, fazendo a comparação entre os resultados e verificando qual razão fornece o melhor resultado em termos do sinal do biossensor estimando, por exemplo, a área eletroativa de cada eletrodo modificado.

Quanto ao genossensor, deve-se testá-lo em amostras reais e se faz necessária a aprovação de comitê de ética em pesquisas envolvendo seres humanos bem como a triagem de pacientes portadores e não-portadores dessa mutação com e sem histórico de câncer de mama. As amostras podem ser tratadas por extração do DNA seguidas por métodos de amplificação de DNA como de reação em cadeia da polimerase (do inglês *polymerase chain reaction*, PCR) ou integrando dispositivos de microfluídica para PCR.

REFERÊNCIAS

- 1 SOPER, S. A.; BROWN, K.; ELLINGTON, A.; FRAZIER, B.; GARCIA-MANERO, G.; GAU, V.; GUTMAN, S. I.; HAYES, D. F.; KORTE, B.; LANDERS, J. L.; LARSON, D.; LIGLER, F.; MAJUMDAR, A.; MASCINI, M.; NOLTE, D. et al. Point-of-care biosensor systems for cancer diagnostics/prognostics. **Biosensors & Bioelectronics**, v. 21, n. 10, p. 1932-1942, 2006.
- 2 WANG, J. Electrochemical biosensors: Towards point-of-care cancer diagnostics. **Biosensors & Bioelectronics**, v. 21, n. 10, p. 1887-1892, 2006.
- 3 JANEGITZ, B. C.; CANCINO, J.; ZUCOLOTTI, V. Disposable Biosensors for Clinical Diagnosis. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v. 14, n. 1, p. 378-389, 2014.
- 4 DEO, R. P.; WANG, J.; BLOCK, I.; MULCHANDANI, A.; JOSHI, K. A.; TROJANOWICZ, M.; SCHOLZ, F.; CHEN, W.; LIN, Y. H. Determination of organophosphate pesticides at a carbon nanotube/organophosphorus hydrolase electrochemical biosensor. **Analytica Chimica Acta**, v. 530, n. 2, p. 185-189, 2005.
- 5 KIM, G. Y.; SHIM, J.; KANG, M. S.; MOON, S. H. Optimized coverage of gold nanoparticles at tyrosinase electrode for measurement of a pesticide in various water samples. **Journal of Hazardous Materials**, v. 156, n. 1-3, p. 141-147, 2008.
- 6 RAGHU, P.; REDDY, T. M.; REDDAIAH, K.; SWAMY, B. E. K.; SREEDHAR, M. Acetylcholinesterase based biosensor for monitoring of Malathion and Acephate in food samples: A voltammetric study. **Food Chemistry**, v. 142, p. 188-196, 2014. doi: 10.1016/j.foodchem.2013.07.047
- 7 LIU, Z. J.; LIU, B. H.; KONG, J. L.; DENG, J. Q. Probing trace phenols based on mediator-free alumina sol-gel derived tyrosinase biosensor. **Analytical Chemistry**, v. 72, n. 19, p. 4707-4712, 2000.
- 8 CHANG, S. C.; RAWSON, K.; MCNEIL, C. J. Disposable tyrosinase-peroxidase bi-enzyme sensor for amperometric detection of phenols. **Biosensors & Bioelectronics**, v. 17, n. 11-12, p. 1015-1023, 2002.
- 9 YAO, T.; HO, C. O. Analytical evaluation of catecholamine biosensors based on tyrosinase from mushroom and mushroom tissue. **Bunseki Kagaku**, v. 51, n. 6, p. 469-472, 2002.
- 10 LI, Y. F.; LIU, Z. M.; LIU, Y. L.; YANG, Y. H.; SHEN, G. L.; YU, R. Q. A mediator-free phenol biosensor based on immobilizing tyrosinase to ZnO nanoparticles. **Analytical Biochemistry**, v. 349, n. 1, p. 33-40, 2006.

- 11 PALCHETTI, I.; CAGNINI, A.; DELCARLO, M.; COPPI, C.; MASCINI, M.; TURNER, A. P. F. Determination of anticholinesterase pesticides in real samples using a disposable biosensor. **Analytica Chimica Acta**, v. 337, n. 3, p. 315-321, 1997.
- 12 HONEYCHURCH, K. C.; HART, J. P.; COWELL, D. C. Voltammetric behavior and trace determination of lead at a mercury-free screen-printed carbon electrode. **Electroanalysis**, v. 12, n. 3, p. 171-177, 2000.
- 13 ADAM, V.; ZEHNALÉK, J.; PETRLOVA, J.; POTESIL, D.; SURES, B.; TRNKOVA, L.; JELEN, F.; VITECEK, J.; KIZEK, R. Phytochelatin modified electrode surface as a sensitive heavy-metal ion biosensor. **Sensors**, v. 5, n. 1-2, p. 70-84, 2005.
- 14 IVNITSKI, D.; ABDEL-HAMID, I.; ATANASOV, P.; WILKINS, E. Biosensors for detection of pathogenic bacteria. **Biosensors & Bioelectronics**, v. 14, n. 7, p. 599-624, 1999.
- 15 HAO, R. Z.; SONG, H. B.; ZUO, G. M.; YANG, R. F.; WEI, H. P.; WANG, D. B.; CUI, Z. Q.; ZHANG, Z. P.; CHENG, Z. X.; ZHANG, X. E. DNA probe functionalized QCM biosensor based on gold nanoparticle amplification for *Bacillus anthracis* detection. **Biosensors & Bioelectronics**, v. 26, n. 8, p. 3398-3404, 2011.
- 16 CHAUBEY, A.; MALHOTRA, B. D. Mediated biosensors. **Biosensors & Bioelectronics**, v. 17, n. 6-7, p. 441-456, 2002.
- 17 WANG, J.; XU, D. K.; KAWDE, A. N.; POLSKY, R. Metal nanoparticle-based electrochemical stripping potentiometric detection of DNA hybridization. **Analytical Chemistry**, v. 73, n. 22, p. 5576-5581, 2001.
- 18 SHAN, C. S.; YANG, H. F.; HAN, D. X.; ZHANG, Q. X.; IVASKA, A.; NIU, L. Graphene/AuNPs/chitosan nanocomposites film for glucose biosensing. **Biosensors & Bioelectronics**, v. 25, n. 5, p. 1070-1074, 2010.
- 19 JANEGITZ, B. C.; MEDEIROS, R. A.; ROCHA, R. C.; FATIBELLO, O. Direct electrochemistry of tyrosinase and biosensing for phenol based on gold nanoparticles electrodeposited on a boron-doped diamond electrode. **Diamond and Related Materials**, v. 25, p. 128-133, 2012. doi:10.1016/j.diamond.2012.02.023.
- 20 WU, P.; SHAO, Q. A.; HU, Y. J.; JIN, J. A.; YIN, Y. J.; ZHANG, H.; CAI, C. X. Direct electrochemistry of glucose oxidase assembled on graphene and application to glucose detection. **Electrochimica Acta**, v. 55, n. 28, p. 8606-8614, 2010.
- 21 ZAN, X. L.; FANG, Z.; WU, J.; XIAO, F.; HUO, F. W.; DUAN, H. W. Freestanding graphene paper decorated with 2D-assembly of Au@Pt nanoparticles as flexible biosensors to monitor live cell secretion of nitric oxide. **Biosensors & Bioelectronics**, v. 49, p. 71-78, 2013. doi:10.1016/j.bios.2013.05.00.

- 22 JANEGITZ, B. C.; DOS SANTOS, F. A.; FARIA, R. C.; ZUCOLOTTI, V. Electrochemical determination of estradiol using a thin film containing reduced graphene oxide and dihexadecylphosphate. **Materials Science & Engineering C-Materials for Biological Applications**, v. 37, p. 14-19, 2014. doi: 10.1016/j.msec.2013.12.026.
- 23 WANG, J.; MUSAMEH, M. Enzyme-dispersed carbon-nanotube electrodes: a needle microsensor for monitoring glucose. **Analyst**, v. 128, n. 11, p. 1382-1385, 2003.
- 24 ZHANG, M. G.; SMITH, A.; GORSKI, W. Carbon nanotube-chitosan system for electrochemical sensing based on dehydrogenase enzymes. **Analytical Chemistry**, v. 76, n. 17, p. 5045-5050, 2004.
- 25 QIAN, L.; YANG, X. R. Composite film of carbon nanotubes and chitosan for preparation of amperometric hydrogen peroxide biosensor. **Talanta**, v. 68, n. 3, p. 721-727, 2006.
- 26 DUONG, H. D.; IL RHEE, J. Use of CdSe/ZnS core-shell quantum dots as energy transfer donors in sensing glucose. **Talanta**, v. 73, n. 5, p. 899-905, 2007.
- 27 JOKERST, J. V.; RAAMANATHAN, A.; CHRISTODOULIDES, N.; FLORIANO, P. N.; POLLARD, A. A.; SIMMONS, G. W.; WONG, J.; GAGE, C.; FURMAGA, W. B.; REDDING, S. W.; MCDEVITT, J. T. Nano-bio-chips for high performance multiplexed protein detection: Determinations of cancer biomarkers in serum and saliva using quantum dot bioconjugate labels. **Biosensors & Bioelectronics**, v. 24, n. 12, p. 3622-3629, 2009.
- 28 LI, J. J.; LI, X.; YANG, R.; QU, L. B.; HARRINGTON, P. D. A sensitive electrochemical chlorophenols sensor based on nanocomposite of ZnSe quantum dots and cetyltrimethylammonium bromide. **Analytica Chimica Acta**, v. 804, p. 76-83, 2013. doi: 10.1016/j.aca.2013.09.049.
- 29 THEVENOT, D. R.; TOTH, K.; DURST, R. A.; WILSON, G. S. Electrochemical biosensors: recommended definitions and classification. **Biosensors & Bioelectronics**, v. 16, n. 1-2, p. 121-131, 2001.
- 30 IUPAC. **Compendium of Chemical Terminology**. 2 1997. Disponível em: < <http://goldbook.iupac.org/B00663.html> > Acesso em: 14 abr. 2015.
- 31 GRIESHABER, D.; MACKENZIE, R.; VOEROES, J.; REIMHULT, E. Electrochemical biosensors - Sensor principles and architectures. **Sensors**, v. 8, n. 3, p. 1400-1458, 2008.
- 32 CLARK, L. C.; LYONS, C. ELECTRODE SYSTEMS FOR CONTINUOUS MONITORING IN CARDIOVASCULAR SURGERY. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 102, n. 1, p. 29-8, 1962.

- 33 WANG, J. Electrochemical glucose biosensors. **Chemical Reviews**, v. 108, n. 2, p. 814-825, 2008.
- 34 GOUGH, D. A.; LUCISANO, J. Y.; TSE, P. H. S. TWO-DIMENSIONAL ENZYME ELECTRODE SENSOR FOR GLUCOSE. **Analytical Chemistry**, v. 57, n. 12, p. 2351-2357, 1985.
- 35 WANG, J.; LU, F. Oxygen-rich oxidase enzyme electrodes for operation in oxygen-free solutions. **Journal of the American Chemical Society**, v. 120, n. 5, p. 1048-1050, 1998.
- 36 FREIRE, R. S.; PESSOA, C. A.; MELLO, L. D.; KUBOTA, L. T. Direct electron transfer: An approach for electrochemical biosensors with higher selectivity and sensitivity. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 14, n. 2, p. 230-243, 2003.
- 37 CAMPUZANO, S.; GALVEZ, R.; PEDERO, M.; DE VILLENA, F. J. M.; PINGARRON, J. M. Preparation, characterization and application of alkanethiol self-assembled monolayers modified with tetrathiafulvalene and glucose oxidase at a gold disk electrode. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 526, n. 1-2, p. 92-100, 2002.
- 38 ZHANG, S. X.; WANG, N.; YU, H. J.; NIU, Y. M.; SUN, C. Q. Covalent attachment of glucose oxidase to an Au electrode modified with gold nanoparticles for use as glucose biosensor. **Bioelectrochemistry**, v. 67, n. 1, p. 15-22, 2005.
- 39 TKAC, J.; WHITTAKER, J. W.; RUZGAS, T. The use of single walled carbon nanotubes dispersed in a chitosan matrix for preparation of a galactose biosensor. **Biosensors & Bioelectronics**, v. 22, n. 8, p. 1820-1824, 2007.
- 40 CAI, H.; CAO, X. N.; JIANG, Y.; HE, P. G.; FANG, Y. Z. Carbon nanotube-enhanced electrochemical DNA biosensor for DNA hybridization detection. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 375, n. 2, p. 287-293, 2003.
- 41 ANDREESCU, S.; BARTHELMEBS, L.; MARTY, J. L. Immobilization of acetylcholinesterase on screen-printed electrodes: comparative study between three immobilization methods and applications to the detection of organophosphorus insecticides. **Analytica Chimica Acta**, v. 464, n. 2, p. 171-180, 2002.
- 42 TROJANOWICZ, M.; GESCHKE, O.; KRAWCZYK, T. K. V.; CAMMANN, K. BIOSENSORS BASED ON OXIDASES IMMOBILIZED IN VARIOUS CONDUCTING POLYMERS. **Sensors and Actuators B-Chemical**, v. 28, n. 3, p. 191-199, 1995.
- 43 EKANAYAKE, E.; PREETHICHANDRA, D. M. G.; KANETO, K. Polypyrrole nanotube array sensor for enhanced adsorption of glucose oxidase in glucose biosensors. **Biosensors & Bioelectronics**, v. 23, n. 1, p. 107-113, 2007.
- 44 NANDURI, V.; SOROKULOVA, I. B.; SAMOYLOV, A. M.; SIMONIAN, A. L.; PETRENKO, V. A.; VODYANOY, V. Phage as a molecular recognition element in

biosensors immobilized by physical adsorption. **Biosensors & Bioelectronics**, v. 22, n. 6, p. 986-992, 2007.

45 GARCIA, C. A. B.; NETO, G. D.; KUBOTA, L. T. New fructose biosensors utilizing a polypyrrole film and D-fructose 5-dehydrogenase immobilized by different processes. **Analytica Chimica Acta**, v. 374, n. 2-3, p. 201-208, 1998.

46 MATEO, C.; PALOMO, J. M.; FERNANDEZ-LORENTE, G.; GUISAN, J. M.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, n. 6, p. 1451-1463, 2007.

47 JANEGITZ, B. C.; FIGUEIREDO, L. C. S.; MARCOLINO, L. H.; SOUZA, S. P. N.; PEREIRA, E. R.; FATIBELLO, O. Development of a carbon nanotubes paste electrode modified with crosslinked chitosan for cadmium(II) and mercury(II) determination. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 660, n. 1, p. 209-216, 2011.

48 JANEGITZ, B. C.; PAULIUKAITE, R.; GHICA, M. E.; BRETT, C. M. A.; FATIBELLO, O. Direct electron transfer of glucose oxidase at glassy carbon electrode modified with functionalized carbon nanotubes within a dihexadecylphosphate film. **Sensors and Actuators B-Chemical**, v. 158, n. 1, p. 411-417, 2011.

49 SASSOLAS, A.; BLUM, L. J.; LECA-BOUVIER, B. D. Immobilization strategies to develop enzymatic biosensors. **Biotechnology Advances**, v. 30, n. 3, p. 489-511, 2012.

50 LI, J.; CHIA, L. S.; GOH, N. K.; TAN, S. N. Silica sol-gel immobilized amperometric biosensor for the determination of phenolic compounds. **Analytica Chimica Acta**, v. 362, n. 2-3, p. 203-211, 1998.

51 COSNIER, S. Fabrication of amperometric biosensors by entrapment of enzymes in functionalized polypyrrole films. **Canadian Journal of Chemical Engineering**, v. 76, n. 6, p. 1000-1007, 1998.

52 NISTOR, C.; EMNEUS, J.; GORTON, L.; CIUCU, A. Improved stability and altered selectivity of tyrosinase based graphite electrodes for detection of phenolic compounds. **Analytica Chimica Acta**, v. 387, n. 3, p. 309-326, 1999.

53 LING, D. R.; WU, G. Q.; WANG, C.; WANG, F.; SONG, G. Q. The preparation and characterization of an immobilized L-glutamic decarboxylase and its application for determination of L-glutamic acids. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 27, n. 7, p. 516-521, 2000.

54 TANG, H.; CHEN, J. H.; YAO, S. Z.; NIE, L. H.; DENG, G. H.; KUANG, Y. F. Amperometric glucose biosensor based on adsorption of glucose oxidase at platinum nanoparticle-modified carbon nanotube electrode. **Analytical Biochemistry**, v. 331, n. 1, p. 89-97, 2004.

- 55 WILKINS, E.; ATANASOV, P. Glucose monitoring: State of the art and future possibilities. **Medical Engineering & Physics**, v. 18, n. 4, p. 273-288, 1996.
- 56 BAEUMNER, A. J. Biosensors for environmental pollutants and food contaminants. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 377, n. 3, p. 434-445, 2003.
- 57 VAN DYK, J. S.; PLETSCHE, B. Review on the use of enzymes for the detection of organochlorine, organophosphate and carbamate pesticides in the environment. **Chemosphere**, v. 82, n. 3, p. 291-307, 2011.
- 58 PINGARRON, J. M.; YANEZ-SEDENO, P.; GONZALEZ-CORTES, A. Gold nanoparticle-based electrochemical biosensors. **Electrochimica Acta**, v. 53, n. 19, p. 5848-5866, 2008.
- 59 DRUMMOND, T. G.; HILL, M. G.; BARTON, J. K. Electrochemical DNA sensors. **Nature Biotechnology**, v. 21, n. 10, p. 1192-1199, 2003.
- 60 OZKAN, D.; ERDEM, A.; KARA, P.; KERMAN, K.; MERIC, B.; HASSMANN, J.; OZSOZ, M. Allele-specific genotype detection of factor V Leiden mutation from polymerase chain reaction amplicons based on label-free electrochemical genosensor. **Analytical Chemistry**, v. 74, n. 23, p. 5931-5936, 2002.
- 61 RANGEL-LOPEZ, A.; MALDONADO-RODRIGUEZ, R.; SALCEDO-VARGAS, M.; ESPINOSA-LARA, J. M.; MENDEZ-TENORIO, A.; BEATTIE, K. L. Low density DNA microarray for detection of most frequent TP53 missense point mutations. **Bmc Biotechnology**, v. 5, p. 13, 2005.
- 62 FARABULLINI, F.; LUCARELLI, F.; PALCHETTI, I.; MARRAZZA, G.; MASCINI, M. Disposable electrochemical genosensor for the simultaneous analysis of different bacterial food contaminants. **Biosensors & Bioelectronics**, v. 22, n. 7, p. 1544-1549, 2007.
- 63 MIRANDA-CASTRO, R.; LOBO-CASTANON, M. J.; MIRANDA-ORDIERES, A. J.; TUNON-BLANCO, P. Comparative Study of HRP, a Peroxidase-Mimicking DNzyme, and ALP as Enzyme Labels in Developing Electrochemical Genosensors for Pathogenic Bacteria. **Electroanalysis**, v. 22, n. 12, p. 1297-1305, 2010.
- 64 SASSOLAS, A.; LECA-BOUVIER, B. D.; BLUM, L. J. DNA biosensors and microarrays. **Chemical Reviews**, v. 108, n. 1, p. 109-139, 2008.
- 65 LUO, X. L.; XU, J. J.; DU, Y.; CHEN, H. Y. A glucose biosensor based on chitosan-glucose oxidase-gold nanoparticles biocomposite formed by one-step electrodeposition. **Analytical Biochemistry**, v. 334, n. 2, p. 284-289, 2004.
- 66 LIU, Y.; WANG, M. K.; ZHAO, F.; XU, Z. A.; DONG, S. J. The direct electron transfer of glucose oxidase and glucose biosensor based on carbon nanotubes/chitosan matrix. **Biosensors & Bioelectronics**, v. 21, n. 6, p. 984-988, 2005.

- 67 SHAN, C. S.; YANG, H. F.; SONG, J. F.; HAN, D. X.; IVASKA, A.; NIU, L. Direct Electrochemistry of Glucose Oxidase and Biosensing for Glucose Based on Graphene. **Analytical Chemistry**, v. 81, n. 6, p. 2378-2382, 2009.
- 68 MURPHY, C. J.; SAN, T. K.; GOLE, A. M.; ORENDORFF, C. J.; GAO, J. X.; GOU, L.; HUNYADI, S. E.; LI, T. Anisotropic metal nanoparticles: Synthesis, assembly, and optical applications. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 109, n. 29, p. 13857-13870, 2005.
- 69 GOLE, A.; MURPHY, C. J. Seed-mediated synthesis of gold nanorods: Role of the size and nature of the seed. **Chemistry of Materials**, v. 16, n. 19, p. 3633-3640, 2004.
- 70 CHEN, C. D.; CHENG, S. F.; CHAU, L. K.; WANG, C. R. C. Sensing capability of the localized surface plasmon resonance of gold nanorods. **Biosensors & Bioelectronics**, v. 22, n. 6, p. 926-932, 2007.
- 71 ASIF, M. H.; ALI, S. M. U.; NUR, O.; WILLANDER, M.; BRANNMARK, C.; STRALFORS, P.; ENGLUND, U. H.; ELINDER, F.; DANIELSSON, B. Functionalised ZnO-nanorod-based selective electrochemical sensor for intracellular glucose. **Biosensors & Bioelectronics**, v. 25, n. 10, p. 2205-2211, 2010.
- 72 ARSLAN, H.; ARSLAN, F. Preparation of a Polypyrrole-Polyvinylsulphonate Composite Film Biosensor for Determination of Phenol Based on Entrapment of Polyphenol Oxidase. **Artificial Cells Blood Substitutes and Biotechnology**, v. 39, n. 5, p. 341-345, 2011.
- 73 MICHALOWICZ, J.; STUFKA-OLCZYK, J.; MILCZAREK, A.; MICHNIEWICZ, M. Analysis of annual fluctuations in the content of phenol, chlorophenols and their derivatives in chlorinated drinking waters. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 18, n. 7, p. 1174-1183, 2011.
- 74 BRASIL, Conselho Nacional de Meio Ambiente - CONAMA. Resolução RDC nº 397, 7 de abril de 2008. Altera o inciso II do § 4º e a Tabela X do § 5º, ambos do art. 34 da resolução do Conselho Nacional do Meio Ambiente - CONAMA nº 357, de 2005, que dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes. 2008. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 18 mar. 2005. n. 053, p. 58-63
- 75 BRASIL, Conselho Nacional de Meio Ambiente - CONAMA. Resolução RDC nº 357, de 17 de março de 2005. Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências. 2005. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 07 abr. 2008. Seção 1, n. 066, p. 68-69
- 76 ALEX, K. D.; PEHEK, E. A. Pharmacologic mechanisms of serotonergic regulation of dopamine neurotransmission. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 113, n. 2, p. 296-320, 2007.

- 77 SCHRAG, A. Psychiatric aspects of Parkinson's disease - An Update. **Journal of Neurology**, v. 251, n. 7, p. 795-804, 2004.
- 78 TRIARHOU, L. C. Dopamine and Parkinson's disease - Introduction. **Dopaminergic Neuron Transplantation in the Weaver Mouse Model of Parkinson's Disease**, v. 517, p. 1-14, 2002.
- 79 DUNLOP, B. W.; NEMEROFF, C. B. The role of dopamine in the pathophysiology of depression. **Archives of General Psychiatry**, v. 64, n. 3, p. 327-337, 2007.
- 80 SOLOMON, E. I.; SUNDARAM, U. M.; MACHONKIN, T. E. Multicopper oxidases and oxygenases. **Chemical Reviews**, v. 96, n. 7, p. 2563-2605, 1996.
- 81 MATOBA, Y.; KUMAGAI, T.; YAMAMOTO, A.; YOSHITSU, H.; SUGIYAMA, M. Crystallographic evidence that the dinuclear copper center of tyrosinase is flexible during catalysis. **Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 13, p. 8981-8990, 2006.
- 82 DUCKWORT, H. W.; COLEMAN, J. E. PHYSICO-CHEMICAL AND KINETIC PROPERTIES OF MUSHROOM TYROSINASE. **Journal of Biological Chemistry**, v. 245, n. 7, p. 1613-8, 1970.
- 83 LEHNINGER, A. L.; NELSON, K. Y. **Princípios de Bioquímica**. 4. São Paulo: 2006.
- 84 ALEXANDROV, L. B.; NIK-ZAINAL, S.; WEDGE, D. C.; APARICIO, S.; BEHJATI, S.; BIANKIN, A. V.; BIGNELL, G. R.; BOLLI, N.; BORG, A.; BORRESEN-DALE, A. L.; BOYAULT, S.; BURKHARDT, B.; BUTLER, A. P.; CALDAS, C.; DAVIES, H. R. et al. Signatures of mutational processes in human cancer. **Nature**, v. 500, n. 7463, p. 415-+, 2013.
- 85 OZSOZ, M.; ERDEM, A.; KERMAN, K.; OZKAN, D.; TUGRUL, B.; TOPCUOGLU, N.; EKREN, H.; TAYLAN, M. Electrochemical genosensor based on colloidal gold nanoparticles for the detection of Factor V Leiden mutation using disposable pencil graphite electrodes. **Analytical Chemistry**, v. 75, n. 9, p. 2181-2187, 2003.
- 86 JEMAL, A.; BRAY, F.; CENTER, M. M.; FERLAY, J.; WARD, E.; FORMAN, D. Global Cancer Statistics. **Ca-a Cancer Journal for Clinicians**, v. 61, n. 2, p. 69-90, 2011.
- 87 KELSEY, J. L.; GAMMON, M. D.; JOHN, E. M. REPRODUCTIVE FACTORS AND BREAST-CANCER. **Epidemiologic Reviews**, v. 15, n. 1, p. 36-47, 1993.
- 88 JEMAL, A.; CENTER, M. M.; DESANTIS, C.; WARD, E. M. Global Patterns of Cancer Incidence and Mortality Rates and Trends. **Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention**, v. 19, n. 8, p. 1893-1907, 2010.

- 89 BRCA1 breast cancer 1, early onset [Homo sapiens (human)]. . Bethesda (MD): National Library of Medicine (US), 13 jan. 2015 2009. Última atualização: 13 jan. 2015. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/672> >. Acesso em: 15 jan. 2015
- 90 BAR-SADE, R. B.; KRUGLIKOVA, A.; MODAN, B.; GAK, E.; HIRSH-YECHEZKEL, G.; THEODOR, L.; NOVIKOV, I.; GERSHONI-BARUCH, R.; RISEL, S.; PAPA, M. Z.; BEN-BARUCH, G.; FRIEDMAN, E. The 185delAG BRCA1 mutation originated before the dispersion of Jews in the Diaspora and is not limited to Ashkenazim. **Human Molecular Genetics**, v. 7, n. 5, p. 801-805, 1998.
- 91 PAPELARD, H.; DE BOCK, G. H.; VAN EIJK, R.; VLIELAND, T.; CORNELISSE, C. J.; DEVILEE, P.; TOLLENAAR, R. Prevalence of BRCA1 in a hospital-based population of Dutch breast cancer patients. **British Journal of Cancer**, v. 83, n. 6, p. 719-724, 2000.
- 92 BRCA1/2 Ashkenazi Founder Mutation Panel., Gaithersburg, MD. Disponível em: < <http://www.genedx.com/test-catalog/avaible-tests/brca12-ashkenazi-founder-mutation-panel/> >. Acesso em: 22 jan. 2015
- 93 DROPSSENS®. Disponível em: < http://www.dropsens.com/en/screen_printed_electrodes_pag.html >. Acesso em: 16 Jan. 2015
- 94 SAU, T. K.; MURPHY, C. J. Seeded high yield synthesis of short Au nanorods in aqueous solution. **Langmuir**, v. 20, n. 15, p. 6414-6420, 2004.
- 95 LIU, L.; QIU, C. L.; CHEN, Q.; ZHANG, S. M. Corrosion behavior of Zr-based bulk metallic glasses in different artificial body fluids. **Journal of Alloys and Compounds**, v. 425, n. 1-2, p. 268-273, 2006.
- 96 PEREZ-JUSTE, J.; PASTORIZA-SANTOS, I.; LIZ-MARZAN, L. M.; MULVANEY, P. Gold nanorods: Synthesis, characterization and applications. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 249, n. 17-18, p. 1870-1901, 2005.
- 97 EUSTIS, S.; EL-SAYED, M. A. Determination of the aspect ratio statistical distribution of gold nanorods in solution from a theoretical fit of the observed inhomogeneously broadened longitudinal plasmon resonance absorption spectrum. **Journal of Applied Physics**, v. 100, n. 4, p. 7, 2006.
- 98 CHO, E. J.; HOLBACK, H.; LIU, K. C.; ABOUELMAGD, S. A.; PARK, J.; YEO, Y. Nanoparticle Characterization: State of the Art, Challenges, and Emerging Technologies. **Molecular Pharmaceutics**, v. 10, n. 6, p. 2093-2110, 2013.
- 99 BARD, A. J.; FAULKNER, L. R. **Electrochemical Methods: Fundamentals and Applications**. New York John Wiley & Sons, Inc., 2001.
- 100 RAMSDEN, C. A.; RILEY, P. A. Tyrosinase: The four oxidation states of the active site and their relevance to enzymatic activation, oxidation and inactivation. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 22, n. 8, p. 2388-2395, 2014.

- 101 SOTOMAYOR, M. D.; TANAKA, A. A.; KUBOTA, L. T. Tris (2,2'-bipyridil) copper (II) chloride complex: a biomimetic tyrosinase catalyst in the amperometric sensor construction. **Electrochimica Acta**, v. 48, n. 7, p. 855-865, 2003.
- 102 LAVIRON, E. GENERAL EXPRESSION OF THE LINEAR POTENTIAL SWEEP VOLTAMMOGRAM IN THE CASE OF DIFFUSIONLESS ELECTROCHEMICAL SYSTEMS. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, v. 101, n. 1, p. 19-28, 1979.
- 103 YE, B. X.; ZHOU, X. Y. Direct electrochemical redox of tyrosinase at silver electrodes. **Talanta**, v. 44, n. 5, p. 831-836, 1997.
- 104 GUTES, A.; CESPEDES, F.; ALEGRET, S.; DEL VALLE, M. Determination of phenolic compounds by a polyphenol oxidase amperometric biosensor and artificial neural network analysis. **Biosensors & Bioelectronics**, v. 20, n. 8, p. 1668-1673, 2005.
- 105 LIU, S. Q.; JU, H. X. Reagentless glucose biosensor based on direct electron transfer of glucose oxidase immobilized on colloidal gold modified carbon paste electrode. **Biosensors & Bioelectronics**, v. 19, n. 3, p. 177-183, 2003.
- 106 HALAOULI, S.; ASTHER, M.; SIGOILLOT, J. C.; HAMDI, M.; LOMASCOLO, A. Fungal tyrosinases: new prospects in molecular characteristics, bioengineering and biotechnological applications. **Journal of Applied Microbiology**, v. 100, n. 2, p. 219-232, 2006.
- 107 ONNERFJORD, P.; EMNEUS, J.; MARKOVARGA, G.; GORTON, L.; ORTEGA, F.; DOMINGUEZ, E. TYROSINASE GRAPHITE-EPOXY BASED COMPOSITE ELECTRODES FOR DETECTION OF PHENOLS. **Biosensors & Bioelectronics**, v. 10, n. 6-7, p. 607-619, 1995.
- 108 TSAI, Y. C.; CHIU, C. C. Amperometric biosensors based on multiwalled carbon nanotube-Nafion-tyrosinase nanobiocomposites for the determination of phenolic compounds. **Sensors and Actuators B-Chemical**, v. 125, n. 1, p. 10-16, 2007.
- 109 WANG, S. F.; TAN, Y. M.; ZHAO, D. M.; LIU, G. D. Amperometric tyrosinase biosensor based on Fe(3)O(4) nanoparticles-chitosan nanocomposite. **Biosensors & Bioelectronics**, v. 23, n. 12, p. 1781-1787, 2008.
- 110 MIN, K.; YOO, Y. J. Amperometric detection of dopamine based on tyrosinase-SWNTs-Ppy composite electrode. **Talanta**, v. 80, n. 2, p. 1007-1011, 2009.
- 111 LUPU, S.; LETE, C.; BALAURE, P. C.; CAVAL, D. I.; MIHAILCIUC, C.; LAKARD, B.; HIHN, J. Y.; DEL CAMPO, F. J. Development of Amperometric Biosensors Based on Nanostructured Tyrosinase-Conducting Polymer Composite Electrodes. **Sensors**, v. 13, n. 5, p. 6759-6774, 2013.
- 112 BRETT, C. M. A.; BRETT, A. M. O. **Electrochemistry: Principles, Methods and Applications**. Oxford: Oxford University Press, 1993.

- 113 DE CARVALHO, L. A.; DE ANDRADE, A. R.; BUENO, P. R. Electrochemical impedance spectroscopy applied in the study of heterogeneous reactions at dimensionally stable anodes. **Quimica Nova**, v. 29, n. 4, p. 796-804, 2006.
- 114 FISCHER, L. M.; TENJE, M.; HEISKANEN, A. R.; MASUDA, N.; CASTILLO, J.; BENTHEN, A.; EMNEUS, J.; JAKOBSEN, M. H.; BOISEN, A. Gold cleaning methods for electrochemical detection applications. **Microelectronic Engineering**, v. 86, n. 4-6, p. 1282-1285, 2009.
- 115 LEVICKY, R.; HERNE, T. M.; TARLOV, M. J.; SATIJA, S. K. Using self-assembly to control the structure of DNA monolayers on gold: A neutron reflectivity study. **Journal of the American Chemical Society**, v. 120, n. 38, p. 9787-9792, 1998.
- 116 AKRAM, M.; STUART, M. C.; WONG, D. K. Y. Direct application strategy to immobilise a thioctic acid self-assembled monolayer on a gold electrode. **Analytica Chimica Acta**, v. 504, n. 2, p. 243-251, 2004.
- 117 HUANG, K. J.; LIU, Y. J.; WANG, H. B.; WANG, Y. Y. A sensitive electrochemical DNA biosensor based on silver nanoparticles-polydopamine@graphene composite. **Electrochimica Acta**, v. 118, p. 130-137, 2014. doi: 10.1016/j.electacta.2013.12.019.
- 118 WANG, J. Electrochemical nucleic acid biosensors. **Analytica Chimica Acta**, v. 469, n. 1, p. 63-71, 2002.
- 119 LUCARELLI, F.; MARRAZZA, G.; TURNER, A. P. F.; MASCINI, M. Carbon and gold electrodes as electrochemical transducers for DNA hybridisation sensors. **Biosensors & Bioelectronics**, v. 19, n. 6, p. 515-530, 2004.
- 120 TICHONIUK, M.; GWIAZDOWSKA, D.; LIGAJ, M.; FILIPIAK, M. Electrochemical detection of foodborne pathogen *Aeromonas hydrophila* by DNA hybridization biosensor. **Biosensors & Bioelectronics**, v. 26, n. 4, p. 1618-1623, 2010.
- 121 PATOLSKY, F.; LICHTENSTEIN, A.; WILLNER, I. Detection of single-base DNA mutations by enzyme-amplified electronic transduction. **Nature Biotechnology**, v. 19, n. 3, p. 253-257, 2001.
- 122 LONG, Y. T.; LI, C. Z.; SUTHERLAND, T. C.; KRAATZ, H. B.; LEE, J. S. Electrochemical detection of single-nucleotide mismatches: Application of M-DNA. **Analytical Chemistry**, v. 76, n. 14, p. 4059-4065, 2004.
- 123 LIU, G.; WAN, Y.; GAU, V.; ZHANG, J.; WANG, L. H.; SONG, S. P.; FAN, C. H. An enzyme-based E-DNA sensor for sequence-specific detection of femtomolar DNA targets. **Journal of the American Chemical Society**, v. 130, n. 21, p. 6820-6825, 2008.

124 WANG, Z. J.; ZHANG, J.; CHEN, P.; ZHOU, X. Z.; YANG, Y. L.; WU, S. X.; NIU, L.; HAN, Y.; WANG, L. H.; CHEN, P.; BOEY, F.; ZHANG, Q. C.; LIEDBERG, B.; ZHANG, H. Label-free, electrochemical detection of methicillin-resistant staphylococcus aureus DNA with reduced graphene oxide-modified electrodes. **Biosensors & Bioelectronics**, v. 26, n. 9, p. 3881-3886, 2011.