



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

RONALD RASTRE SALAS

DESENVOLVIMENTO DE BIOSSENSOR ELETROQUÍMICO DE BAIXO
CUSTO PARA IDENTIFICAÇÃO DA DEFICIÊNCIA DA GLICOSE 6-
FOSFATO DESIDROGENASE (G6PD)

MANAUS -AM

Abril/ 2022

RONALD RASTRE SALAS

**DESENVOLVIMENTO DE BIOSSENSOR ELETROQUÍMICO DE BAIXO
CUSTO PARA IDENTIFICAÇÃO DA DEFICIÊNCIA DA GLICOSE 6-
FOSFATO DESIDROGENASE (G6PD)**

Defesa de tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Química da Universidade Federal do Amazonas como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutorado em Química, com ênfase na linha de pesquisa em Química de Materiais e Interfaces.

Prof. Dr. WALTER RICARDO BRITO

Orientador

MANAUS -AM

Abril/ 2022

FICHA CATALOGRÁFICA

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

S161d Salas, Ronald Rastre
Desenvolvimento de biossensor eletroquímico de baixo custo para identificação da deficiência da glicose 6-fosfato desidrogenase (G6PD) / Ronald Rastre Salas . 2022
113 f.: il. color; 31 cm.

Orientador: Walter Ricardo Brito
Tese (Doutorado em Química) - Universidade Federal do Amazonas.

1. Biossensores. 2. G6P- Glicose 6-Fosfato. 3. G6PD- Glicose 6-Fosfato desidrogenase. 4. NADH- Dinucleótido de adenina e nicotinamida. 5. DHP- Dihexadecil fosfato. I. Brito, Walter Ricardo. II. Universidade Federal do Amazonas III. Título


FOLHA DE APROVAÇÃO

Desenvolvimento de biossensor eletroquímico de baixo custo para identificação da deficiência da Glicose 6-Fosfato Deshidrogenase (G6PD)

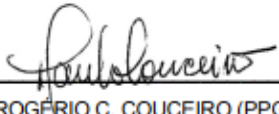
Ronald Rastre Salas

Tese de Doutorado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Química, do Instituto de Ciências Exatas da Universidade Federal do Amazonas como requisito parcial para a obtenção do Grau de Doutor (a) em Química.

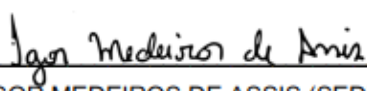
Aprovada em, 20 de abril de 2022.



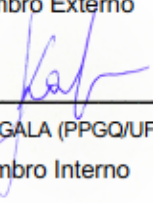
WALTER RICARDO BRITO (PPGQ/UFAM)
Presidente/Orientador



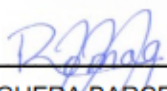
PAULO ROGÉRIO C. COUCEIRO (PPGQ/UFAM)
Membro Interno



IGOR MEDEIROS DE ASSIS (SEDUC/AM)
Membro Externo



KAREN SEGALA (PPGQ/UFAM)
Membro Interno



YONNY ROMAGUERA BARCELAY (DF/UFAM)
Membro Externo

Universidade Federal do Amazonas
Manaus, 20 de abril de 2022.

DEDICATORIA

Dedicado à minha mãe que sempre foi uma grande inspiração para lutar com todas as forças por aquilo em que acredito.

Dedicado à minha filha por tudo o amor que sente pelo seu pai

Dedicado à memória de meu pai que perdi durante a transição deste grande projeto de formação acadêmica.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha querida mãe **Hilda Iris**, exemplo de caráter, honestidade e resistência. De você recebi o dom mais precioso: a vida. Não sendo suficiente, preencheu de alegrias diversas, carinho, compreensão e principalmente de muito amor. Abriu a minha porta para o futuro fazendo ver que a única maneira de poder enfrenta-lo era com preparo, iluminou o meu caminho criando as condições. Foi mais que mãe, amiga e companheira nas minhas horas de tristeza nas quais meus objetivos pareciam distantes, inatingíveis e inelegíveis, suportando essa minha carga de estudo sobre suas costas ainda na distância. Simplesmente, obrigado

Agradeço a minha irmã, **Roxana**, que foi essencial para que pudesse estar aqui;

A meus irmãos, **Roger** e **Yuniel**, que mesmo na distância transmitiram palavras de incentivo e apoio;

A meu amor **Claudia Valeria** pelo apoio incondicional em todos os momentos;

Ao **Prof. Dr. Walter Ricardo Brito**, pela orientação precisa e pela confiança depositada durante cinco anos de convivência, sempre esteve disponível as minhas questões, sugerindo novos pontos de vista. Sua orientação significou não apenas estímulo intelectual ao trabalho de pesquisa, como apoio em diferentes momentos;

Aos membros da Banca que examinou este trabalho, **Prof. Dr. Paulo Coceiro**, **Prof. Dr. Karen Segala**, **Dr. Yonny Romaguera Barcelay** e **Dr. Igor Medeiro de Asis**, pelos comentários enriquecedores e o incentivo;

Ao Programa de Pós-graduação em Química, aos professores **Dr. Afonso Duarte Leão de Souza**, **Dr. Emerson da Costa Rios**, **Dr. Rita Saraiva Nunomura**, **Dr. Felipe Moura Araujo da Silva** e ao secretário **Bruno Amorim**;

Sou grato as instituições **UFAM**, **FAPEAM**, **CAPE** pelo apoio financeiro e aos locais **Central Analítica**, **IFAM**, **INPA** pelo apoio no desenvolvimento dos experimentos;

A meus amigos cubanos no brasil **Yurimiler, Lianet, Deyvi, José, Fidel, Fernádo, Adrian, Roland, Yetzan, Michel**, aos que lhe serei eternamente grato;

A meus amigos desde a distância que sempre se mantiveram motivando e incentivando, **Danielly, Marcos, Alicia, Amalia, Odanys, Raúl, Raudelis, Israel, Maikel, Frank, Geovanys e Yuniór**;

Durante esses anos de estudo tive a oportunidade de contar com o apoio e ajuda de muitos amigos. É impossível citar todos. **Luciana, Ariamna, Camila, Taisa, Oneide, José, Moisés, Jacqueline, João, Andrei, Robson, Dennis e Xavier**.

A tudo e todos. Obrigado

RESUMO

O tratamento de malária causado por *Plasmodium vivax*, um dos fármacos utilizados é a Primaquina uma droga efetiva no combate às formas parasitárias incubada no fígado. Porém, este fármaco pode induzir a hemólise em indivíduos com deficiência da Glicose-6-Fosfato Desidrogenase (G6PD), que afeta milhões de pessoas no mundo. A deficiência da G6PD é uma eritroenzimopatia causada pelo bloqueio da via enzimática do monofosfato hexose que leva ao acúmulo de peróxido de hidrogênio causando danos oxidativos ao eritrócito, é uma das mais frequentes enzimopatias conhecidas, variando desde um quadro clínico assintomático à anemia hemolítica crônica ou aguda, colecistite, icterícia e granulomatose crônica. O uso dos biossensores na detecção desta doença tem sido de grande aplicabilidade devido às vantagens que oferece. Tendo em conta essas vantagens que apresentam os biossensores, no presente projeto foram desenvolvidos cinco tipos de sensores eletroquímicos baseados na imobilização da enzima G6PD, tendo como finalidade a sua atividade enzimática. Para a execução dos trabalhos foram empregados como eletrodos de trabalho ouro e carbono, depositando sobre as suas superfícies a mistura de diferentes compósitos, Dihexadecil Fosfato (DHP), Óxido de grafeno (OG), Nanopartículas (NPsAu): DHP-OG, DHP-NPsAu, DHP-OG-NPsAu os quais foram caracterizados e estudados os efeitos que exercem sobre a imobilização da enzima. Os biossensores foram caracterizados usando técnicas como, voltametria cíclica (VC), voltametria de onda quadrada (SWV), espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE) e a topografia da superfície e sua estrutura usando técnicas como, microscopia eletrônica de varredura (MEV), espectroscopia de energia dispersiva (EDS), espectroscopia no infravermelho por transformada Fourier variante reflectância total atenuada (FTIR-ATR) e espectrofotometria no ultravioleta visível (UV-Vis) juntados à técnica de ângulo de contato para saber a molhabilidade. As curvas analíticas foram realizadas por voltametria de diferencial de pulso (DPV) e SWV com os parâmetros otimizados para cada técnica e avaliados em PBS 0,1 mol L⁻¹, pH= 7,6 com adições de C(NAD⁺) 3×10⁻⁴ mol L⁻¹ a diferentes volumes na célula eletrolítica. A linearidade mostrou-se desde 7,5×10⁻⁷ a 6,0×10⁻⁶ mol L⁻¹ com R² entre 98 e 99 %, os limites de detecção LD e LQ na ordem de 10⁻⁶ mol L⁻¹. Os biossensores mostraram ser estáveis por seis dias.

Palavras-chaves: Biossensores, G6P, DHP, D6PD, NAD⁺

ABSTRACT

For the treatment of malaria caused by *Plasmodium vivax*, one of the drugs used is Primaquina an effective drug in combating the parasitic forms incubated in the liver. However, this drug may induce hemolysis in individuals with Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase (G6PD) deficiency, which affects millions of people worldwide. G6PD deficiency is an erythroenzymopathy caused by blockage of the enzymatic pathway of the monophosphate hexoses. That leads to the accumulation of hydrogen peroxide causing oxidative damage to the erythrocyte, which is one of the most frequently known enzymopathies, ranging from an asymptomatic clinical picture to chronic or acute hemolytic anemia, cholecystitis, jaundice, and chronic granulomatosis. The use of biosensors (modified sensors with biological material closely linked to the surface of a transducer) for the detection of this disease has been of great applicability due to the advantages it offers, being able to highlight: sensitivity, rapid responses, and low cost. Considering these advantages and the need for detection devices, the present project was developed five types of electrochemical sensors based on polymeric composites for immobilization of the enzyme G6PD, to develop low-cost biosensors for the detection of enzymatic activity. For the execution of the work, gold and carbon were used as working electrodes, depositing on their surfaces a mixture of different composites, Dihexadecyl Phosphate (DHP), Graphene Oxide (OG), Nanoparticles (NPsAu): DHP-OG, DHP- NPsAu, DHP-OG-NPsAu which were characterized and studied the effects they exert on the immobilization of the enzyme. The biosensors were characterized using techniques such as cyclic voltammetry (VC), square wave voltammetry (SWV), electrochemical impedance spectroscopy (EIE), and the surface topography and its structure using techniques such as scanning electron microscopy (SEM), spectroscopy dispersive energy (EDS), infrared spectroscopy by Fourier transform variant attenuated total reflectance (FTIR-ATR) and ultraviolet-visible spectrophotometry (UV-Vis) combined with the contact angle technique to know the wettability. Analytical curves were performed by differential pulse voltammetry (DPV) and SWV with the parameters optimized for each technique and evaluated in PBS 0.1 mol L⁻¹, pH= 7.6 with additions of C(NAD⁺) 3× 10⁻⁴ mol L⁻¹ at different volumes in the electrolytic cell. Linearity ranged from 7.5×10⁻⁷ to 6.0×10⁻⁶ mol L⁻¹ with R² between 98 and 99 %, detection limits LOD and LOQ in the order of 10⁻⁶ mol L⁻¹. The biosensors were shown to be stable for six days.

Keywords: Biosensors; G6P, DHP, G6PD, NAD⁺.

LISTA DE ABREVIACÕES, SIGLAS E SÍMBOLOS

ATP: Adenosina trifosfato

DHP: Dihexadecil fosfato

DPV: Voltametria de pulso diferencial

ΔE_a : Variação de potencial anódico

ΔE_c : Variação de potencial catódico

EDS: Espectroscopia por energia dispersiva

EIE: Espectroscopia de impedância eletroquímica

EQM: Eletrodos quimicamente modificados

FTIR-ATR: Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier modo reflexão total atenuada.

G6PD: Glicose 6-fosfato desidrogenase

G6P: Glicose 6-fosfato

GSSG: Glutatião oxidado

GPx: Glutathione Peroxidase

GSR: Glutathione reductase

GSH: Glutatião reduzido

IUBMB: International Union of Biochemistry and Molecular Biology

$K_3Fe(CN)_6$: Ferricianeto de potássio

$K_4Fe(CN)_6$: Ferrocianeto de potássio

LD: Limite de detecção

LQ: Limite de quantificação

MET: Microscopia Eletrônica de Transmissão

MEV: Microscopia Eletrônica de Varredura

NADH: Dinucleótido de adenina e nicotinamida

NADPH: Dinucleótido de adenina e nicotinamida fosfato

NPsAu: Nanopartículas de ouro

OG: Óxido de grafeno

PBS: Tampão fosfato salino

SWV: Voltametria de onda quadrada

UV-vis: Espectrofotometria no ultravioleta visível

VC: Voltametria cíclica

LISTA DE FIGURAS

Figura 3.1. Estrutura da Glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD) ligada ao substrato e à coenzima NADP ⁺ nos sítios específicos	25
Figura 3.2. A- Local de ligação da G6P à G6PD; B e C- Sítio estrutural da coenzima NADP ⁺ e em verde as interações eletrostáticas, empilhamento hidrofóbico e ligações de hidrogênio; D- Sítios marcados de ligação dos substratos	26
Figura 3.3. Distribuição da deficiência da G6PD no mundo, conforme a prevalência encontrada em cada país.....	28
Figura 3.4. Estrutura química do NAD ⁺	33
Figura 3.5. Representação esquemática do par redox NAD ⁺ / NADH.....	33
Figura 3.6. Dobra de Rossmann na zona da lactato desidrogenase de <i>Cryptosporidium parvum</i> , com NAD ⁺ em vermelho, folhas beta em amarelo e hélices alfa em roxo	34
Figura 3.7. Espectro no UV-Visível da coenzima NAD ⁺ / NADH	35
Figura 3.8. Sensor eletroquímico, mostrando a organização dos seus componentes funcionais	36
Figura 3.9. Tipo de biossensores e transdutores.....	37
Figura 3.10. Principais tipos de imobilização. A- Adsorção, B-ligação covalente C- Entrecruzamento, D- Encapsulação e E- Retenção em membrana	40
Figura 3.11. Estrutura química do DHP	41
Figura 3.12. Representação esquemática do filme de DHP.	42
Figura 3.13. Representação dos prováveis grupos funcionais presentes na estrutura do óxido de grafeno	44
Figura 3.14. Imagens de TEM representativas de diversas nanoestruturas de ouro: A-esferas, B-cubos, C-estrelas, D-hastes e E-triângulos	46
Figura 3.15. Sistema de tres eletrodos	48
Figura 3.16. A- Perfil do potencial de excitação aplicado em um ciclo; B- potencial aplicado tipo escada; C- (a) voltamograma resultante mostrando as correntes e potenciais e (b) comparação dos voltamogramas reversível, quase-reversível e irreversível	49
Figura 3.17. Diferentes tipos de processos redox, que podem ser identificados e caracterizados em um estudo de voltametria cíclica	50

Figura 3.18. A- Forma de aplicação do potencial na voltametria de onda quadrada; B- Voltamogramas esquemáticos de onda quadrada onde 1) representa um processo redox de um sistema reversível e 2) de um sistema irreversível .	51
Figura 3.19. Gráfico de Nyquist com o vector de impedância .	53
Figura 3.20. Sinais de excitação para voltametria de pulso diferencial .	54
Figura 3.21. Imagem esquemática da coluna de MEV .	55
Figura 3.22. Ilustração esquemática do ângulo de contato entre uma gota e uma superfície ..	56
Figura 3.23. Classificação dos ângulos de contato numa superfície .	57
Figura 3.24. Funcionamentos dos métodos de absorção. A- interação da radiação com a amostra resultando na atenuação do feixe, B- absorção equivalente diferentes níveis de energia, C- o espectro de absorção resultante.....	59
Figura 4.1. Esquema das etapas de preparação dos biossensores.....	63
Figura 5.1. Representação gráfica i (μA) vs $v^{1/2}$ ($\text{V}^{1/2}/\text{s}^{1/2}$) para cada um dos eletrodos envolvidos ouro (A) e carbono (B).....	68
Figura 5.2. Representação gráfica i (μA) vs $v^{1/2}$ ($\text{V}^{1/2}/\text{s}^{1/2}$) para cada um dos eletrodos envolvidos. A, B, C- biossensores formados sobre substrato de ouro com a seguinte descrição: DHP-OG-G6PD; DHP-NPsAu-G6PD; DHP-OG-NPsAu-G6PD, respetivamente, e D, E, F- biossensores sobre substrato de carbono com a mesma descrição e ordem mencionada para os de ouro.....	69
Figura 5.3. Estudo de estabilidade da resposta eletroquímica dos eletrodos de ouro e carbono limpos em $5 \text{ mmol L}^{-1} [\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}/ \text{PBS } 0,1 \text{ mol L}^{-1}$, $\text{pH}= 7,6$ a $0,1 \text{ V s}^{-1}$. A- ouro e B- carbono variação das correntes de pico anódica e catódica, C e D- os valores dos potenciais correspondentes a cada pico de corrente durante cada ciclo respetivamente.	71
Figura 5.4. Estudo de estabilidade da resposta eletroquímica dos biossensores formados sobre substrato de ouro com a seguinte descrição: A e D- DHP-OG-G6PD; B e E- DHP-NPsAu-G6PD e C e F- DHP-OG-NPsAu-G6PD. D, E e F- correntes de pico e A, B e C- valores de potencial correspondentes a cada pico de corrente durante cada ciclo em $5 \text{ mmol L}^{-1} [\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-} / \text{PBS } 0,1 \text{ mol L}^{-1}$, $\text{pH}= 7,6$ a $0,1 \text{ V s}^{-1}$	72
Figura 5.5. Estudo de estabilidade da resposta eletroquímica dos biossensores formados sobre substrato de carbono com a seguinte descrição: A, D- DHP-OG-G6PD; B, E- DHP-NPsAu-G6PD e C e F- DHP-OG-NPsAu-G6PD. D, E e F- correntes de pico e A, B e C- valores de potencial correspondentes a cada pico de corrente durante cada ciclo em $5 \text{ mmol L}^{-1} [\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-} / \text{PBS } 0,1 \text{ mol L}^{-1}$, $\text{pH}= 7,6$ a $0,1 \text{ V s}^{-1}$	73

Figura 5.6. Caracterização eletroquímica mediante VC das etapas de formação dos componentes de cada biossensor formado sobre eletrodos de ouro (A) e carbono (B) em 5 mmol L ⁻¹ [Fe(CN) ₆] ^{4-/3-} /PBS 0,1 mol L ⁻¹ e pH= 7,6 a 0,1 V s ⁻¹	74
Figura 5.7. Caracterização eletroquímica mediante EIE das etapas de formação dos componentes de cada biossensor sobre eletrodos de ouro (A) e carbono (B) em 5 mmol L ⁻¹ de [Fe(CN) ₆] ^{4-/3-} /PBS 0,1 mol L ⁻¹ e pH= 7,6	75
Figura 5.8. Circuito de Randles modelo para a simulação e ajuste dos dados de EIE.	77
Figura 5.9. Caracterização eletroquímica por VC dos biossensores formados sobre eletrodos de ouro (A) e carbono (B) em 5 mmol L ⁻¹ de [Fe(CN) ₆] ^{4-/3-} /PBS 0,1 mol L ⁻¹ e pH= 7,6 a 0,1 V s ⁻¹	78
Figura 5.10. Caracterização eletroquímica por EIE dos biossensores formados sobre eletrodos de ouro (A) e carbono (B) em 5 mmol L ⁻¹ de [Fe(CN) ₆] ^{4-/3-} /PBS 0,1 mol L ⁻¹ e pH= 7,6.	79
Figura 5.11. Imagens de MEV da G6PD (A), OG (B), DHP (C), EDS (D), DHP-OG-NPsAu-G6PD (E-H).....	81
Figura 5.12. Ângulos de contato dos eletrodos de ouro, carbono e biossensores: A-Au, B-Au+DHP, C-Au-DHP, D- Au-DHP-OG-G6PD, E- Au-DHP-NPsAu-G6PD, F- Au-DHP-OG-NPsAu-G6PD, a mesma descrição para o eletrodo de carbono tendo em conta as letras subsequentes.	82
Figura 5.13. Espectros de FTIR-ATR para as amostras G6PD (azul), OG (vermelho) e DHP (preto).	84
Figura 5.14. Espectro de absorção no UV-Vis das Nanopartículas de ouro.	85
Figura 5.15. Medida da atividade enzimática (G6PD) mediante a redução do cofator NAD ⁺ /NADH.	86
Figura 5.16. DPV dos eletrodos de trabalho, biossensores e processo de detecção dos biossensores. A, B- sobre eletrodos de carbono e D, E, F- sobre eletrodos de ouro, em PBS 0,1 mol L ⁻¹ e pH= 7,6.	87
Figura 5.17. DPV dos processos de detecção dos biossensor relacionados com a Figura 5.19 em PBS 0,1 mol L ⁻¹ e pH= 7,6.....	88
Figura 5.18. Estudo da influência do pH a partir da respostas dos biossensores durante a detecção com a adição de 20 µL NAD ⁺ de 3×10 ⁻⁴ mol L ⁻¹ após 23 dias de armazenamento, em PBS 0,1 mol L ⁻¹ e pH= 7,6. A (EBC-DHP-NPsAu-G6PD), B (EBC-DHP-OG-G6PD), D (EBAu-DHP-NPsAu-G6PD), E (EBAu-DHP-OG-G6PD) e F (EBAu-DHP-OG-NPsAu-G6PD).....	89

Figura 5.19. Curvas analíticas a partir das respostas dos biossensores durante a detecção a diferentes concentrações de NAD^+ de 0,75 a 6 $\mu\text{mol L}^{-1}$ / PBS 0,1 mol L^{-1} e pH= 7,6. A- (EBC-DHP-NPsAu-G6PD), B- (EBC-DHP-OG-G6PD), D- (EBAu-DHP-NPsAu-G6PD), E- (EBAu-DHP-OG-G6PD) e F- (EBAu-DHP-OG-NPsAu-G6PD). 90

Figura 5.20. Estudo de estabilidade dos dispositivos depois de um período de armazenamento. Resposta à adição de 20 μL NAD^+ de 3×10^{-4} mol L^{-1} em PBS 0,1 mol L^{-1} , pH= 7,6. A-(EBC-DHP-NPsAu-G6PD), B (EBC-DHP-OG-G6PD), D (EBAu-DHP-NPsAu-G6PD), E (EBAu-DHP-OG-G6PD) e F (EBAu-DHP-OG-NPsAu-G6PD). 92

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1. Classificação internacional das enzimas	24
Tabela 3.2. Descrição das classes de variantes de G6PD	27
Tabela 3.3. Família de fármacos que podem induzir hemólise em indivíduos com deficiência de G6PD	29
Tabela 3.4. Proposta de alguns biossensores eletroquímicos da G6PD	32
Tabela 3.5. Propostas de eletrodos que usam DHP como modificador.....	43
Tabela 5.1. Resultados das áreas eletroativas determinadas pela equação de Randles-Sevcik	69
Tabela 5.2. Resultados das áreas eletroativas para os biossensores formados sobre o eletrodo de ouro, determinadas pela equação de Randles-Sevcik.	70

SUMARIO

1.	INTRODUÇÃO	19
2.	OBJETIVOS	21
2.1.	Objetivo Geral.....	21
2.2.	Objetivos Específicos.....	21
3.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	22
3.1.	Enzimas.....	22
3.1.1.	Classificação e nomenclatura das enzimas	23
3.1.2.	A enzima Glicose-6-Fosfato Desidrogenase.....	25
3.2.	Coenzima NADH.....	32
3.3.	Sensores Eletroquímicos	35
3.3.1.	Biossensores Enzimáticos	36
3.4.	Técnicas de Imobilização.....	38
3.5.	Eletrodos Quimicamente Modificados por Filmes Poliméricos	40
3.5.1.	Dihexadecil fosfato (DHP)	41
3.5.2.	Óxido de grafeno.....	43
3.5.3.	Nanopartículas metálicas	45
3.6.	Técnicas de Caracterização.....	47
3.6.1.	Técnicas eletroquímicas	47
3.6.2.	Técnicas de caracterização de superfícies.....	54
4.	MATERIAIS E MÉTODOS	61
4.1.	Parte Experimental.....	61
4.1.1.	Reagentes	61
4.1.2.	Equipamentos.....	61
4.2.	Preparação dos Eletrodos	62
4.2.1.	Limpeza de Eletrodos de Ouro	62

4.3.	Preparação dos Biossensores	62
4.3.1.	Imobilização de Biomoléculas	63
4.4.	Caracterização Eletroquímica	64
4.4.1.	Área Eletroativa	64
4.4.2.	Estabilidade dos Sistemas em Estudo	64
4.4.3.	Caracterização do Processo de Imobilização	65
4.5.	Caracterização Estrutural e Superficial.....	65
4.5.1.	Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	65
4.5.2.	Ângulo de Contato. Método da Gota Sésil.....	65
4.5.3.	Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier- FTIR	66
4.5.4.	Espectroscopia no UV-VIS	66
4.6.	Procedimento Eletroanalítico para Determinação da Atividade Enzimática	66
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	68
5.1.	Caracterização Eletroquímica	68
5.1.1.	Determinação da Área Eletroativa dos Eletrodos de Trabalho e Biossensores	68
5.1.2.	Estabilidade dos Sistemas em Estudo	70
5.1.3.	Caracterização do Processo de Imobilização	73
5.2.	Caracterização Morfológica e Estrutural dos Biossensores	80
5.2.1.	Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	80
5.2.2.	Ângulo de Contato	81
5.2.3.	Espectroscopia Infravermelha com Transformada Fourier- FTIR....	83
5.2.4.	Espectroscopia no UV-VIS das NPsAu	85
5.2.5.	Otimização dos Parâmetros Voltamétricos do Biossensor Enzimático	87
5.2.6.	Influência do pH do Eletrólito Suporte sobre a Atividade da G6PD	89

5.2.7. Construção da Curva Analítica para NAD ⁺	90
5.2.8. Estabilidade do Biossensor	91
6. CONCLUSÕES.....	93
7. PERSPECTIVAS FUTURAS.....	95
8. BIBLIOGRAFIA.....	96
9. ANEXO.....	112

1. INTRODUÇÃO

A malária considerada um problema de saúde pública em mais de 107 países é uma doença parasitária endêmica, que no ano 2020 afetou aproximadamente 241 milhões de pessoas em todo o mundo, causando aproximadamente 627 mil mortes, a maioria crianças (OMS, 2021). No Brasil, é uma doença comum na região amazônica, composta pelos estados da Região Norte, Maranhão e Mato Grosso. (VENTURA, 1999; FREVERT & NARDIN, 2005; OLIVEIRA-FERREIRA, 2010; MINISTÉRIO DA SAUDE, 2021). Em 2020, foram notificadas no território nacional 145.188 casos de malária, uma redução de 7,8% em relação a 2019, quando foram registrados 157.452 casos da doença (MINISTÉRIO DA SAUDE, 2021). Para o tratamento de malária por *Plasmodium vivax*, utiliza-se antimaláricos, drogas efetivas no combate às formas parasitárias que se instalam no fígado (BUCHACHART, 2001). Porém, podem induzir a hemólise em indivíduos com deficiência de G6PD (LIMA et al., 2001; REY, 2001). Para indivíduos que apresentam a deficiência de G6PD, a dose deve ser reduzida e administrada por um tempo maior (OMS, 2016).

A Glicose 6-Fosfato Desidrogenase (G6PD) possui localização citoplasmática responsável pela catálise da primeira etapa da via metabólica da hexose monofosfato, que atua no primeiro passo do ciclo das hexoses, participando da produção de NADPH. O NADPH é de grande importância para a manutenção da estrutura tridimensional das proteínas da membrana eritrocitária, atuando como doadora de hidrogênio em várias vias metabólicas (SOARES et al., 2013). Atua especialmente na manutenção da integridade dos eritrócitos, evitando a oxidação da hemoglobina e de outras proteínas celulares assim, o eritrócito maduro em seu metabolismo utiliza a glicose como principal fonte para gerar energia (ATP) e potencial redutor (NADPH), metabolizada por meio da via glicolítica e pela via das pentoses-fosfato (LUZZATO & METHA, 1995). A deficiência da G6PD é um sério problema de saúde no Amazonas, o que justifica priorizar iniciativas direcionadas ao controle e detecção desta doença hereditária devido à existência de uma estreita relação entre a resposta aos tratamentos contra a Malária e a presença desta doença. No ano 2013, a Secretaria de Vigilância em Saúde fez um chamamento público a comunidade científica através da PORTARIA Nº 21, de 2 de outubro do ano mencionado para submissão de projetos aplicados em vigilância em saúde, onde somente um deles tratava a detecção do déficit da G6PD sob autoria do Hospital Fundação de Medicina Tropical Doutor Heitor Vieira Dourado. Motivados pela escassa

geração de projetos e centrado no principal foco endêmico do estado do Amazonas, o objetivo é ampliar esse espectro de opções de detecção da doença.

Por outro lado, o uso dos biossensores e equipamentos para a detecção do déficit enzimático, tem facilitado a prontidão das análises, mas os encontrados no mercado são caros e impedem a massificação do teste para áreas isoladas dos grandes centros populacionais. Visando nestas regiões isoladas de maior incidência de Malária e visto como o tratamento em pacientes com malária e com déficit da G6PD se faz dispendioso, o presente projeto visa desenvolver biossensores de baixo custo para detecção da deficiência da G6PD que representa hoje no Amazonas e no mundo um importante problema de saúde pública.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Desenvolvimento de biossensor eletroquímico de baixo custo para identificação da deficiência da Glicose 6-Fosfato Desidrogenase (G6PD), baseado em compósitos poliméricos da enzima para determinar sua atividade enzimática.

2.2. Objetivos Específicos

- i. Caracterizar os eletrodos de trabalho usados na fabricação dos biossensores.
- ii. Preparar os eletrodos modificados
 - I. Otimizar quantidades para produção dos biossensores
 - II. Obter os eletrodos com os compósitos DHP-OG, DHP-NPsAu, DHP-OG-NPsAu nos diferentes substratos.
- iii. Desenvolver metodologia de imobilização da camada biologicamente ativa sobre os substratos.
- iv. Caracterizar os eletrodos modificados
 - I. Estruturalmente, mediante o uso de técnicas como: FTIR- ATR, UV-Vis, EDS.
 - II. Morfológica e superficialmente empregando técnicas como: MEV e Ângulo de contato.
 - III. Eletroquimicamente mediante o emprego de técnicas como: VC e EIE.
- v. Estudar resposta eletroquímica dos biossensores na reação catalítica.
- vi. Realizar curva analítica.
- vii. Determinar os limites de detecção (LD) e limites de quantificação (LQ).
- viii. Estudar a estabilidade dos biossensores depois de ser armazenados.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Enzimas

Parte da história da bioquímica refere-se à pesquisa em enzimas. Enzimas são moléculas (ou complexos moleculares) que aceleram uma reação química por meio da ligação ao(s) reagente(s) em posições e circunstâncias que aumentem a probabilidade e velocidade da reação por um fator de 10^5 até 10^{14} vezes mais do que uma reação não catalisada (DALLA-VECCHIA et al., 2004).

Até recentemente, admitia-se que todos os catalisadores biológicos (enzimas) fossem proteicos. Entretanto, há pouco mais de uma década, foram caracterizadas certas reações celulares que têm como catalisadores determinadas moléculas de RNA, as quais apresentam um comportamento semelhante ao das proteínas enzimáticas obedecendo também à cinética de Michaelis Menten. Seu emprego nas reações metabólicas, entretanto, está restrito a alguns casos especiais (MARZZOCO & TORRES, 1999). As enzimas desempenham um importante papel funcional em alimentos e medicamentos, assim como em sistemas biológicos.

O uso crescente desses catalisadores em processos industriais deve-se à alta sensibilidade e especificidade de suas reações químicas, bem como ao avanço das pesquisas em genética, somados à tecnologia de processos fermentativos, na área de produção de enzimas (MONTEIRO & SILVA, 2009). Segundo Vitolo e Roche (1998), a utilização de enzimas em escala industrial é de fundamental importância, devendo ser analisada, no entanto, a relação custo/benefício. A atividade catalítica de uma enzima proteica, deste ponto em diante denominado somente enzima, provém de uma estrutura terciária precisa, altamente ordenada, que se justapõe aos grupamentos específicos dos aminoácidos de tal modo a formar sítios estereoespecíficos de ligações com o substrato e cofatores. A atividade catalítica da enzima depende da integridade da sua conformação molecular nativa e geralmente se perde caso a enzima seja desnaturada ou dissociada em subunidades (quando possuir estrutura quaternária) (LEHNINGER et al., 1995).

A maioria das reações químicas se processa a uma velocidade maior com a elevação da temperatura. Esse aumento na temperatura proporciona uma maior energia cinética às moléculas de reagente, ocasionando um maior número de colisões por unidade de tempo, porém, no caso de reações enzimáticas o excesso de energia cinética pode causar desnaturação da enzima através do rompimento de sua estrutura terciária, e consequente perda de atividade catalítica (SEGEL, 1979). Segundo Hall (1996), na maioria dos casos, a solubilidade de uma enzima é aumentada com o aumento da temperatura desde que esta esteja situada na faixa de 0 a 40-50 °C, mas acima desse limite de temperatura a enzima poderá ser desnaturada modificando-se as ligações não covalentes envolvidos na estabilização das suas estruturas secundária e terciária, como por exemplo: ligação de hidrogênio, interações hidrofóbicas e eletrostáticas. Quando as estruturas secundária e terciária de uma proteína são desnaturadas, os grupos hidrofóbicos interagem entre si e reduzem a hidratação da molécula. Essas interações hidrofóbicas levam à agregação, seguida de coagulação e precipitação. Em baixas temperaturas pode também ocorrer em alguns casos, a desestabilização das proteínas. Isto ocorre quando o principal fator de estabilização da estrutura terciária de uma enzima ocorre por interações hidrofóbicas. Esta interação é mais fraca quando submetida a baixas temperaturas. Pode-se ainda observar que em alguns casos, baixas temperaturas provocam dissociação de subunidades de oligômeros proteicos e desestabilizam a proteína. A quantidade de calor necessária para desnaturar uma enzima varia de acordo com a molécula. Esse processo depende também do pH, força iônica do meio e presença de outros componentes como agentes tensoativos. Por exemplo, em valores de pH extremos, bem como em valores de pH próximos ao ponto isoelétrico, a quantidade de calor necessária para desnaturar uma enzima é diminuída. Portanto, como a estrutura nativa de uma enzima é importante para sua funcionalidade, é fundamental trabalhar em temperaturas nas quais a mesma apresente-se estável (HALL, 1996).

3.1.1. Classificação e nomenclatura das enzimas

A International Union of Biochemistry and Molecular Biology (IUBMB) definiu critérios para a classificação e denominação das enzimas.

- i. A cada enzima foi atribuído um “número EC” (de Enzyme Commission) que contém 4 números separados por pontos (EC W.X.Y.Z). Os números W, X e Y referem-se,

respetivamente, à classe, subclasse e sub-subclasse e o número Z é específico de cada enzima.

- ii. Até fevereiro/2020 estavam classificadas 6461 enzimas que podem ser consultadas em (ARTIMO et al., 2012).
- iii. Em geral uma mesma enzima tem vários nomes e a nomenclatura não é isenta de ambiguidade; a atribuição de um número E às enzimas é uma tentativa de resolver essa ambiguidade (MURRAY, 2013).

Foram definidas 6 classes, segundo mostrado na **Tabela 3.1**.

Tabela 3.1. Classificação internacional das enzimas (LEHNINGER et al., 2014)

No. classes	Nome das classes	Tipo de reação catalisada
1	Oxi-redútaes	Catalisam oxidações e reduções
2	Transféraes	Catalisam a transferência de porções, como grupos glucosilo, metilo ou fosforilo.
3	Hidrólases	Catalisam a divisão hidrolítica de C—C, C—O, C—N e outras ligações covalentes.
4	Líases	Catalisam a divisão de C—C, C—O, C—N e outras ligações covalentes mediante eliminação de átomo, deixando ligação dupla.
5	Isoméraes	Catalisam mudanças geométricas ou estruturais dentro de uma molécula.
6	Lígases	Catalisam a união de duas moléculas em reações acopladas à hidrólise do ATP.

- iv. A classificação é de tipo funcional: diferentes proteínas (com estrutura diferente), mas com a mesma atividade catalítica (como as isoenzimas) têm o mesmo nome e número E.

Apesar da clareza do sistema IUBMB, os nomes são longos e um tanto difícil de decorar, de modo que as enzimas ainda são geralmente referidas pelo nome tradicional, embora às vezes ambíguo. A designação IUBMB para hexoquinase ilustra tanto a clareza de seu sistema quanto suas complexidades: o nome que o IUBMB atribui à hexocinase é ATP: D-hexose-6-fosfotransferase EC 2.7.1.1, que identifica a hexoquinase como membro da classe

2 (transferases), subclasse 7 (transferência de um grupo fosforil), sub-subclasse 1 (álcool é o aceitador de fosforil) e "hexose-6" indica que o álcool fosforilado está no carbono seis de uma hexose; no entanto, ainda é chamado hexocinase (MURRAY, 2013).

3.1.2. A enzima Glicose-6-Fosfato Desidrogenase

A enzima glicose-6-fosfato desidrogenase (EC 1.1.1.49) **Figura 3.1**, primeira enzima da via das pentoses fosfato, catalisa a oxidação de glicose-6- fosfato utilizando NADP^+ gerando pentoses (**Equação 1**) para a síntese de nucleotídeos, assim como NADPH para utilização em biossínteses redutivas e proteção contra estresse oxidativo (ROWLAND et al., 1994; COSGROVE et al., 1998; OZER et al., 2001).

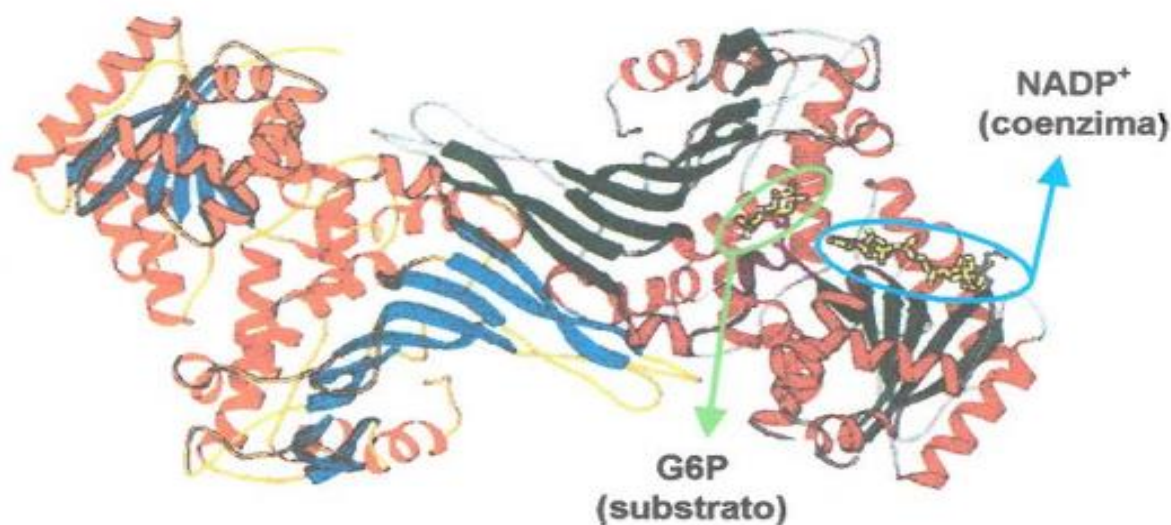


Figura 3.1. Estrutura da Glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD) ligada ao substrato e à coenzima NADP^+ nos sítios específicos (VOUGHT et al., 2000).

Estudos sobre o mecanismo da atividade catalítica da G6PD **Figura 3.2**, mostraram que o aminoácido HIS 240 age como base subtraindo o próton da hidroxila C1 da G-6-P, enquanto o aminoácido ASP-177 estabiliza a carga positiva formada no estado de transição de HIS-240 para que a transferência do próton H1 ao anel piridínico do NADP^+ ocorra (COSGROVE et al., 1998).

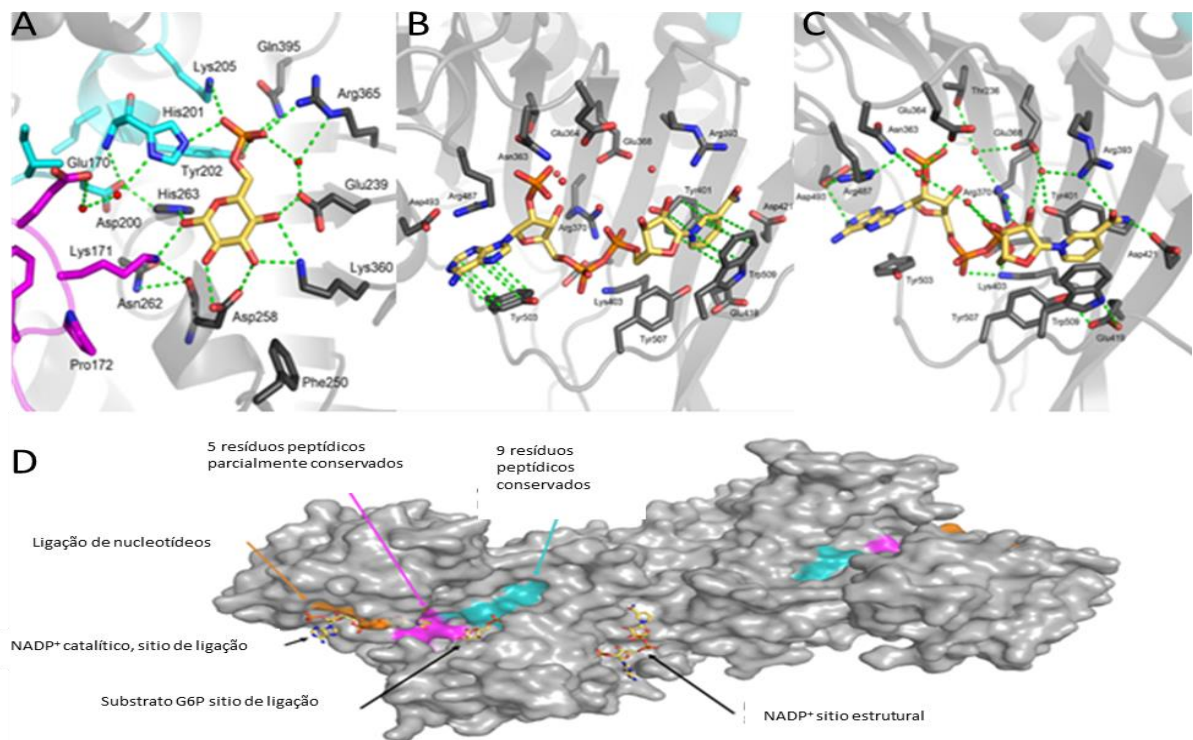


Figura 3.2. A- Local de ligação da G6P à G6PD; B e C- Sítio estrutural da coenzima NADP⁺ e em verde as interações eletrostáticas, empilhamento hidrofóbico e ligações de hidrogênio; D- Sítios marcados de ligação dos substratos (KOTAKA et al., 2005; WANG et al., 2008).

Esta enzima hidrofílica é muito antiga na evolução é amplamente encontrada na natureza, estando presente em todos os organismos vivos desde leveduras e protozoários até plantas e animais. Na maioria das espécies, a G6PD apresenta uma subunidade com massa molar de 50 - 60 kDa, correspondendo a aproximadamente 500 resíduos de aminoácidos. Esta enzima normalmente aparece na forma de dímeros ou tetrâmeros (ROWLAND et al., 1994), sendo que as G6PDs provenientes de *Leuconostoc mesenteroides* e *Saccharomyces cerevisiae* são dímeros (COHEN & ROSEMEYER, 1969; ZAITZEVA et al., 1997), enquanto que a humana constitui em um equilíbrio dímero - tetrâmero (ROWLAND et al., 1994). O pH ótimo de atividade da enzima G6PD é aproximadamente 7,8 e o ponto isoelétrico é 4,6 (ISHAQUE et al., 1974; OLIVE & LEVY, 1975; ROWLAND et al., 1994).

3.1.2.1. Deficiência da G6PD

A deficiência enzimática de G6PD corresponde a uma das enzimopatias mais frequentes em humanos, 400 milhões de pessoas afetadas no mundo (**Figura 3.3**) tendo como

resultando mais de 400 mutações genéticas diferentes (PEREIRA et al., 2019; SALLES et al., 2021). Todas as raças são afetadas por diferentes variantes de G6PD (**Tabela 3.2**) com a maior prevalência observada em africanos, asiáticos e no mediterrâneo. A variante asiática e mediterrânea gera uma forma de deficiência mais severa que a encontrada entre os africanos, pois a atividade da G6PD é reduzida desde a formação das hemácias, levando a níveis insuficientes para a proteção contra oxidação em 5 a 10 dias. Desta forma, durante as crises hemolíticas tanto as hemácias mais novas quanto as mais velhas são afetadas, levando a um quadro mais grave (LUZZATO & METHA, 1995).

Tabela 3.2. Descrição das classes de variantes de G6PD (WAGNER & HILL, 2015).

Classe	Nível de deficiência	Atividade enzimática	Prevalência
I	Severa	Anemia hemolítica crônica não esferocítica na presença de função normal dos eritrócitos	Não é comum; ocorre entre populações.
II	Severa	Menos de 10% do normal	Varia; mais comum em populações asiáticas e mediterrâneas.
III	Moderada	10 a 60% do normal	10% dos homens nos U. S. A
IV	Suave e nenhuma	60 a 150% do normal	Rara
V	Nenhuma	Mais do que 150% do normal	Rara

Em Hong Kong e no sul da China, por exemplo, 4 a 6% da população masculina são deficientes, na nigeriã, a prevalência de deficiência varia de 4 a 26%, com a população masculina tendo cerca de 20 a 26% (LOHR & WALLER, 1974; ODUOLA & OGUNYEMI, 2006). Apesar de ser geralmente assintomática, a deficiência de G6PD pode levar à anemia hemolítica aguda após exposição a estresse oxidativos, ou devido a certas infecções como hepatite (CHIM et al., 2001; KRZELJ et al., 2001), consumo de drogas e favas (LOHR; WALLER, 1974). Desta forma, diversos estudos médicos e bioquímicos envolvendo esta enzima têm sido realizados (ISHIBASHI et al., 1999; AU et al., 2000; ALTIKAT et al., 2001; COBAN et al., 2002).

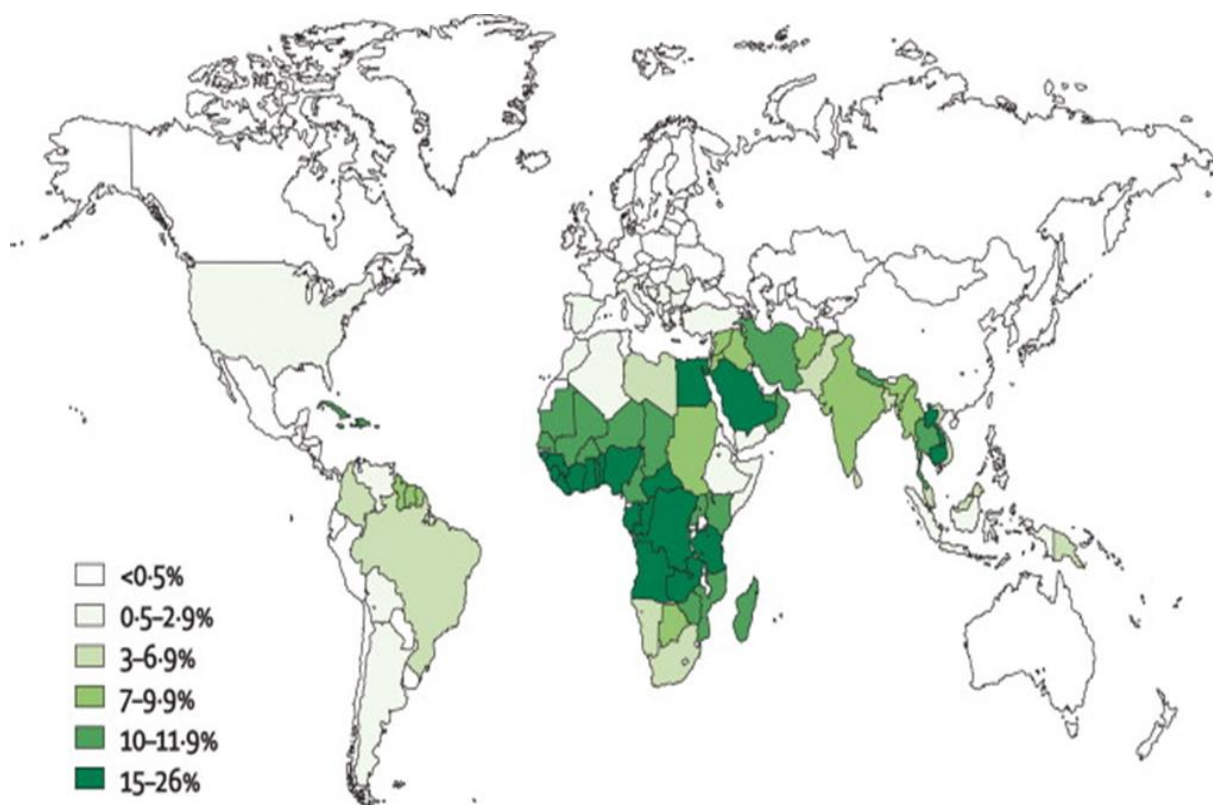


Figura 3.3. Distribuição da deficiência da G6PD no mundo, conforme a prevalência encontrada em cada país. Adaptado de Brás (2017).

A deficiência de G6PD é uma eritroenzimopatia causada pelo bloqueio da via enzimática do monofosfato hexose que leva ao acúmulo de peróxido de hidrogênio causando danos oxidativos ao eritrócito. Foi descrito pela primeira vez em 1956 ao investigar-se a reação incomum que ocorreu em pessoas negras após a administração da Primaquina, para o tratamento da malária (CARSON et al., 1956). A importância do G6PD é evidente pela sua presença em cada tipo de célula de todos os organismos contemporâneos, portanto sua principal função que é a geração do NADPH. O NADPH se torna indispensável para a manutenção dos grupamentos sulfidrilas e para a conversão do Glutatião oxidado (GSSG) em Glutatião reduzido (GSH) em presença da enzima Glutathione redutase (GSR) segundo mostrado na (**Equação 3**), condição essencial para a proteção da célula contra os danos oxidativos. A eliminação de H_2O_2 da célula por meio GSH (**Equação 2**) em presença da enzima Glutathione Peroxidase (GPx) requer a presença de NADPH que no eritrócito maduro é produzido exclusivamente pela G6PD. Durante o estresse oxidativo desencadeado por drogas ou agentes químicos ambientais, a presença da coenzima é vital para eliminação de radicais livres ativos e hidroperoxidases (BEUTLER, 1994). A ausência completa de G6PD é

incompatível com a vida, o que é demonstrado pela ausência de mutações envolvendo a abolição completa da função enzimática (VULLIAMY, 1992).



Na **Tabela 3.3** se mostram um resumo das drogas que podem induzir a estresse oxidativo.

Tabela 3.3. Família de fármacos que podem induzir hemólise em indivíduos com deficiência de G6PD (FRANK, 2005).

Antimaláricos	Sulfonamidas	Nitrofuronas	Analgésicos	Outros
Primaquina	Sulfamilamina	Furadantina	Ácido Acetilsalicílico	Dimercaprol
Pamaquina	Acetilsulfanilamida	Furoxona	Acetanilida	Azul de Metileno
Penaquina	Sulfacetamida	Altafur	Fenacetin	Naftaleno
Plasmoquina	Sulfametoxipiradizina	Furacin	Piramido	Ácido aminosalicílico
Atebrina	Azulfidina	Nitrofurantoina	Antipirina	Vitamina K
Quinina	Gantrisinina	Nitrofurazona	Acetofenitidina	Cloranfenicol

O risco de herança genético para cada mutação ocorre da seguinte maneira: cada filho (do sexo masculino) de uma mãe portadora de uma mutação no gene G6PD possui uma chance de 50% de ser afetado e cada filho (sexo feminino) possui uma chance de 50% de ser portadora. As filhas de um pai afetado serão portadoras, mas os filhos não serão afetados, pois um pai afetado não contribui com um cromossomo X para seus filhos.

3.1.2.2. Diagnóstico

Um grande número de métodos bioquímicos qualitativos e quantitativos, além da análise molecular, estão disponíveis para o diagnóstico da deficiência de G6PD; dentro das avaliações qualitativas, os métodos utilizados são a determinação da atividade G6PD no papel

filtro utilizando técnicas fluorescentes, e o método indofenol-diclorofenol (DPIP). Na medição da mancha de papel do filtro, o NADPH gerado na reação por pessoas não deficientes de G6PD é detectado visualmente à luz UV, enquanto no método DPIP a presença de G6PD por descoloração de marcadores é detectada em um momento específico (BEUTLER et al., 1962; BERNSTEIN, 1962; BETKE et al., 1967). Quantificação enzimática envolve medição espectrofotométrica de NADP para redução de NADPH na presença de G6P e hemolisado (BEUTLER & YOSHIDA, 1988). A detecção da deficiência de G6PD durante estados de hemólise aguda pode causar dificuldades, pois os reticulócitos são muito ricos na enzima. Com o desenvolvimento das técnicas de biologia molecular, foram utilizadas diferentes metodologias que permitiram conhecer as causas moleculares que levam à deficiência de G6PD, dentro delas estão: o alelo PCR específica, a análise do polimorfismo conformal de cadeia única (SSCP), identificação de polimorfos de restrição de comprimento variável (RLFP) e microarranjos (XU et al., 1995; DU et al., 1999; DAL BORGIO et al., 2000; MAFFI et al., 2002; BANG-CE et al., 2004). Esta medição não deve ser realizada após eventos que possam levar a falsos negativos tais como: transfusões de eritrócitos, pela presença de eritrócitos exógenos funcionais; e episódio hemóptico agudo, porque os eritrócitos antigos foram hemolisados e apenas novos eritrócitos funcionais permanecem.

3.1.2.3. Aplicações da G6PD

O mercado da enzima G6PD movimentou 7 milhões de dólares no mercado mundial de kits, no ano de 1995, e foi a quarta enzima mais comercializada para esse fim (GODFREY & WEST, 1996). Usando a G6PD é possível determinar glicose na presença de outros sacarídeos, como a frutose (CHATEL et al., 1996), além disso, a G6PD pode ser empregada para a determinação de glicose em sistema de reator em fluxo contínuo, pois o NADPH formado pela reação enzimática pode ser facilmente detectado espectrofotometricamente ou fluorometricamente (FREY et al., 1999; MORI et al., 1999). Essa enzima pode detectar baixíssimos níveis de estreptavidina e biotina por ensaios de bioluminescência em reações de hibridização de DNA, sem perda da atividade enzimática. A G6PD também apresenta grande interesse como reagente analítico, sendo utilizada em vários ensaios quantitativos incluindo a determinação de atividade de creatina-quinase para diagnóstico de doenças cardíacas e de músculo esquelético, medidas de concentração de hexoses, e marcador de enzima imunoensaios (LOJUOICE et al., 2001).

Como biossensor (**Tabela 3.4**), a G6PD pode monitorar rapidamente a concentração de glicose-6-fosfato no sangue com menor custo e consumo de tempo do que os métodos cromatográficos e espectroscópicos. Esse monitoramento é importante porque ele pode refletir diretamente a atividade relativa da G6PD na via metabólica e tem sido utilizado para o controle de G6PD em eritrócitos humanos e em células de fígado de ratos (BASSI et al., 1999). Existem equipamentos baseados no princípio de biossensores usados já na avaliação da atividade enzimática da G6PD exemplo: careSTART™ G6PD biosensor, point-of-care (POC) colorimetric biosensor, SD Biosensor (ROK), SD Biosensor STANDARD™ G6PD analyser entre outros. O uso desta enzima tem sido muito expandido porem menos que outras devido a sua purificação industrial, que tem sido feita através de processos de múltiplas etapas, os quais envolvem técnicas de custo elevado como cromatografia de afinidade e cromatografia de troca iônica (CHAMPLUVIER & KULA, 1992; CHANG at al., 1995; CHANG & CHASE, 1996;). Portanto, o custo desta enzima como reagente analítico é alto, o que torna o trabalho de pesquisa na busca de alternativas que abaratem os produtos obtidos como resultado do trabalho investigativo.

Tabela 3.4. Proposta de alguns biossensores eletroquímicos da G6PD

Analito	Enzima	Camada modificada	Mediador/ coenzima	10 ⁻⁵ faixa de deteccção	Referência
Fosfato	PA ⁺ PGM ⁺ G6PDH	Os (1,10-fenantrolina-5,6-diona) ₂ Cl ₂	NAD ⁺ , Mg ²⁺ , AMP, 1,6-difosfato	0,6–80 M	Parellada e colaboradores (1998)
Fosfato	PA ⁺ PGM ⁺ G6PDH	Os (1,10-fenantrolina-5,6-diona) ₂ Cl ₂	NAD ⁺ , Mg ²⁺ , AMP, 1,6-difosfato	0,6–200 M	Fernández e colaboradores (1998)
G6P	G6PD	Tretacianoquinodimetano (TCNQ)	Mg ²⁺ , NADP ⁺ , PEI	5,0-80 M	Bassi e colaboradores (1999)
G6P	G6PD	Poli-3,4-Dihidroxibenzaldeído	NADP ⁺	5,0-800 M	(Tzang e colaboradores (2001)
G6P	G6PD	Polipirrol, quitosana	NADP ⁺	800 mM	(Sahin e colaboradores (2019)
G6P	G6PD	Polipirrol	NADP ⁺	200 mM	Selmihan e colaboradores (2019)

3.2. Coenzima NADH

Nicotinamida adenina dinucleotídeo (NAD⁺) é uma coenzima encontrada em todas as células vivas, tem a fórmula molecular C₂₁H₂₇N₇O₁₄P₂, sua massa molar é de 663.425 g mol⁻¹ e seu ponto de fusão é 160° C. O composto é um dinucleotídeo, pois consiste em dois nucleotídeos unidos por um par de grupos fosfato de ponte. Os nucleotídeos consistem em anéis de ribose, um com adenina presa ao primeiro átomo de carbono (posição 1') e o outro com nicotinamida nesta posição **Figura 3.4**. O grupo nicotinamida pode ser conectado em duas orientações a este átomo de carbono anomérico; por causa dessas duas estruturas possíveis, o composto existe como dois diastereoisômeros e é β-nicotinamida diastereoisômero de NAD⁺ encontrado nos organismos. Estes nucleotídeos são unidos por uma ligação de dois grupos fosfato através dos carbonos 5 de cada molécula da ribose.

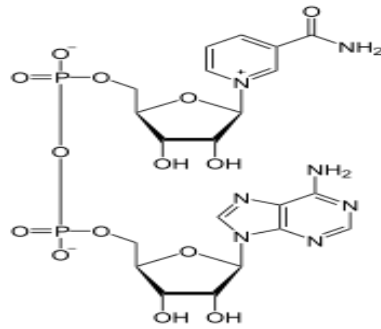


Figura 3.4. Estrutura química do NAD⁺

No metabolismo o composto aceita ou doa elétrons em reações redox. Essas reações envolvem a remoção de dois átomos de hidrogênio do reagente (R), na forma de um íon hidreto (H⁻), e um próton (H⁺) (GHANEM et al., 2009; SALEH et al., 2011; YOU & JEON, 2011). O próton é lançado em solução, enquanto RH₂ oxida e NAD⁺ é reduzido a NADH transferindo o hidreto para o anel da nicotinamida (**Equação 4**).



O ponto médio potencial do par redox NAD⁺/ NADH é de -0,32 volts, o que faz do NADH um forte agente redutor. A reação é facilmente reversível, quando o NADH reduz outra molécula é reoxidada a NAD⁺ (UNDEN & BONGAERTS, 1997). Isso significa que a coenzima pode fazer ciclos continuamente entre as duas formas NAD⁺ e NADH sem ser consumida, como mostrado na **Figura 3.5** (POLLAK et al., 2007).

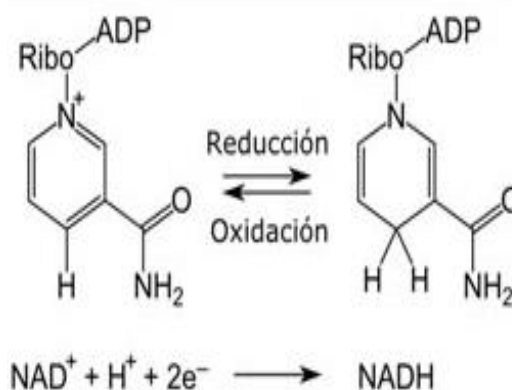


Figura 3.5. Representação esquemática do par redox NAD⁺/ NADH

Entenda-se que a principal função do NAD^+ no metabolismo é a transferência de elétrons de uma reação redox para outra. Este tipo de reação é catalisado por um grande grupo de enzimas chamadas oxidoredutases. Os nomes corretos para essas enzimas contêm os nomes de seus substratos: por exemplo, NADH-ubiquinona oxidoredutase catalisa a oxidação de NADH pela coenzima Q. No entanto, essas enzimas também são conhecidas como desidrogenases ou redutase. Quando ligado ao local ativo de uma oxidoredutase, o anel de nicotinamida da coenzima é colocado para que possa aceitar um hidreto do outro substrato (GARRIDO et al., 2009).

Quando ligados a uma proteína, NAD^+ e NADH são frequentemente mantidos numa estrutura conhecida como a dobra Rossmann. Esta dobra contém três ou mais linhas betas paralelas ligadas por duas hélices alfa na ordem beta-alfa-alfa-beta-beta. Isso forma uma lâmina beta ladeada por uma camada de hélices alfa em cada lado como mostra a **Figura 3.6**. Como cada dobra Rossmann liga um nucleotídeo, os domínios de ligação para o NAD^+ são dois pares de dobras Rossmann, com cada dobra ligando um nucleotídeo dentro do cofator. No entanto, essa dobra não é universal entre as enzimas dependentes de NAD^+ , pois recentemente foi descoberto que uma classe de enzimas bacterianas envolvidas no metabolismo de aminoácidos está ligada à coenzima, mas não têm essa forma de vinco (HANUKOGLU, 2015).

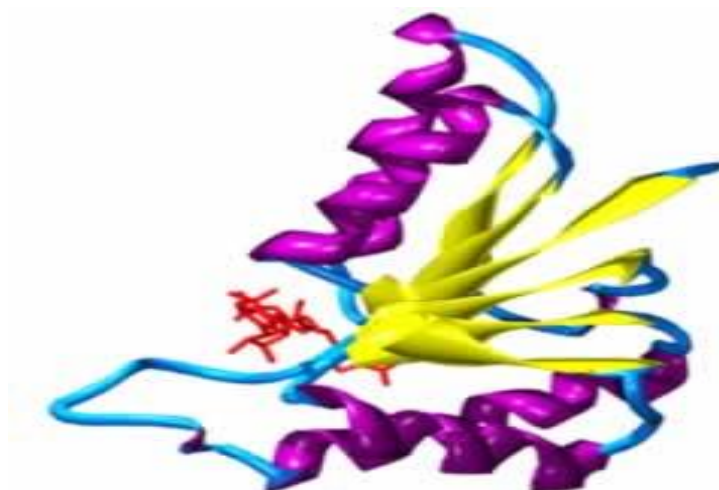


Figura 3.6. Dobra de Rossmann na zona da lactato desidrogenase de *Cryptosporidium parvum*, com NAD^+ em vermelho, folhas beta em amarelo e hélices alfa em roxo (HANUKOGLU, 2015).

Na aparência, todas as formas dessa coenzima são pós-amorfos brancos, higroscópicos e muito solúveis em água (WINDHOLZ, 1983). Os sólidos são estáveis se mantidos secos e no escuro e as soluções NAD^+ são incolores e estáveis por cerca de uma semana a 4°C e pH neutro, mas rapidamente se dividem em ácidos ou álcalis. Quando degradado, formam produtos que são inibidores da enzima (BIELLMANN et al., 1979). Tanto o NAD^+ quanto o NADH absorvem fortemente na região do ultravioleta devido à base de adenina, o pico de absorção NAD^+ está em 259 nm e o NADH 339 nm conforme mostrado na **Figura 3.7**, diferença no espectro que permite ser notaria a conversão de um para outro e ser medida por um espectrofotômetro (DAWSON, 1985; SANTHIAGO, 2010).

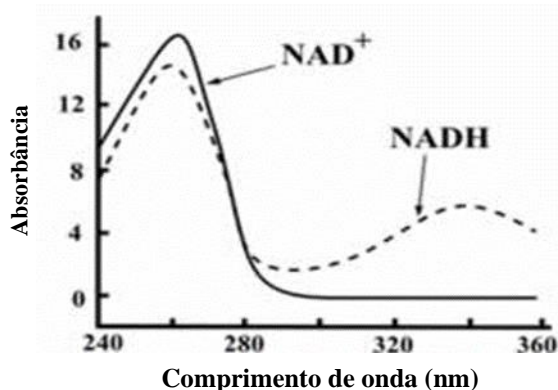


Figura 3.7. Espectro no UV-Visível da coenzima NAD^+/NADH (SANTHIAGO, 2010)

3.3. Sensores Eletroquímicos

O desenvolvimento de um sensor eletroquímico de baixo custo pode contribuir para o desenvolvimento de um dispositivo portátil para uso em regiões isoladas do país, assim diminuindo o impacto logístico no resultado dos exames. A opção por um dispositivo eletroquímico se deu por técnicas eletroanalíticas que permitirem a detecção de baixas concentrações de um analito com um mínimo de manipulação da amostra. O uso dos dispositivos eletroquímicos tem gerado bastante interesse e é devido as suas características singulares: alta seletividade, baixo custo de construção, potencial miniaturização e construção de equipamentos simples e portáteis.

Dispositivos eletroquímicos analíticos permitem a coleta de dados e obtenção de informações com manipulação mínima do sistema estudado. Uma resposta biológica é um

sinal mensurável para detecção do analito-alvo como mostrado na **Figura 3.8**. De forma geral, o sensor eletroquímico funciona a partir da especificidade e alta sensibilidade do analito-alvo com a camada receptora (WANG, 2006).

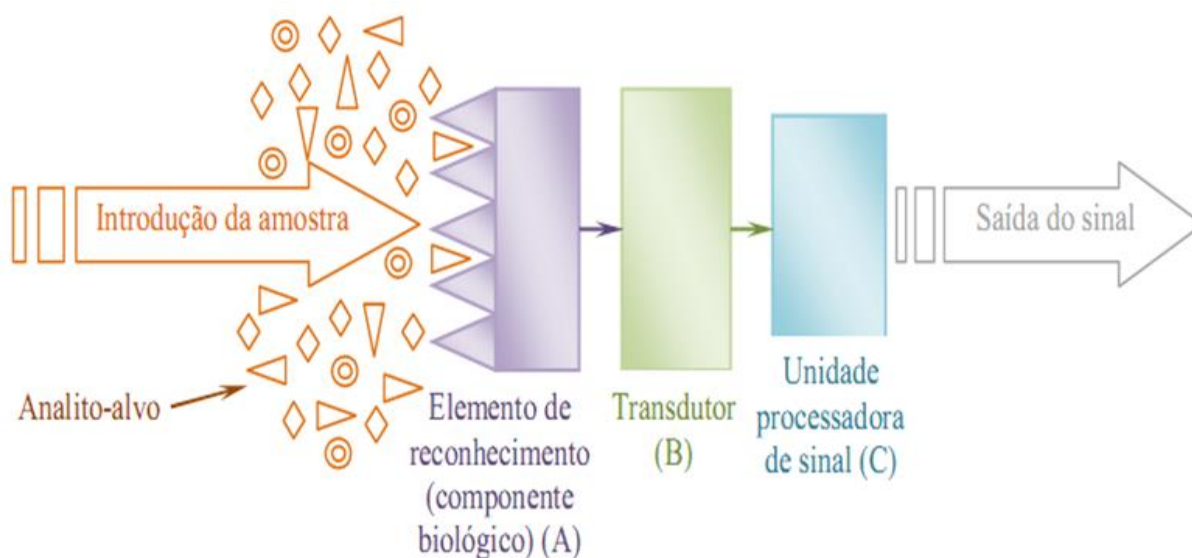


Figura 3.8. Sensor eletroquímico, mostrando a organização dos seus componentes funcionais (CALIL & QUEIROZ, 2011).

A parte fundamental do sensor é o elemento de reconhecimento, usualmente posicionada na extremidade do dispositivo, onde ocorre a interação do analito com o componente biológico ou membrana, produzindo um sinal elétrico. Essa camada receptora pode ser uma enzima, anticorpo, ácido nucléico, polímero entre outros (PATHAK et al., 2007; CHAMBER, 2008). A escolha da camada receptora deve seguir requisitos básicos, como disponibilidade de um sítio reativo que possa reagir/interagir com o analito, estabilidade nas condições de medição e possibilidade de modificação/imobilização sobre suporte por método químico sem afetar o seu desempenho (SALGADO, 2001).

3.3.1. Biossensores Enzimáticos

O termo “biossensor” começou aparecer na literatura científica no início de 1970, mas anteriormente já era comercializado e conhecido seu conceito básico. Um biossensor é um dispositivo analítico composto de um elemento de reconhecimento biológico, denominado biorreceptor, que em contato íntimo a um transdutor, irá converter a concentração de um determinado analito em uma resposta mensurável (FREIRE et al., 2003). Na **Figura 3.9** são

apresentados os principais componentes de um biossensor. Estes podem ser classificados de acordo com o método de detecção em transdutores ópticos, elétricos, eletroquímicos e térmicos, entre outros (VO-DINH & CULLU, 2000).

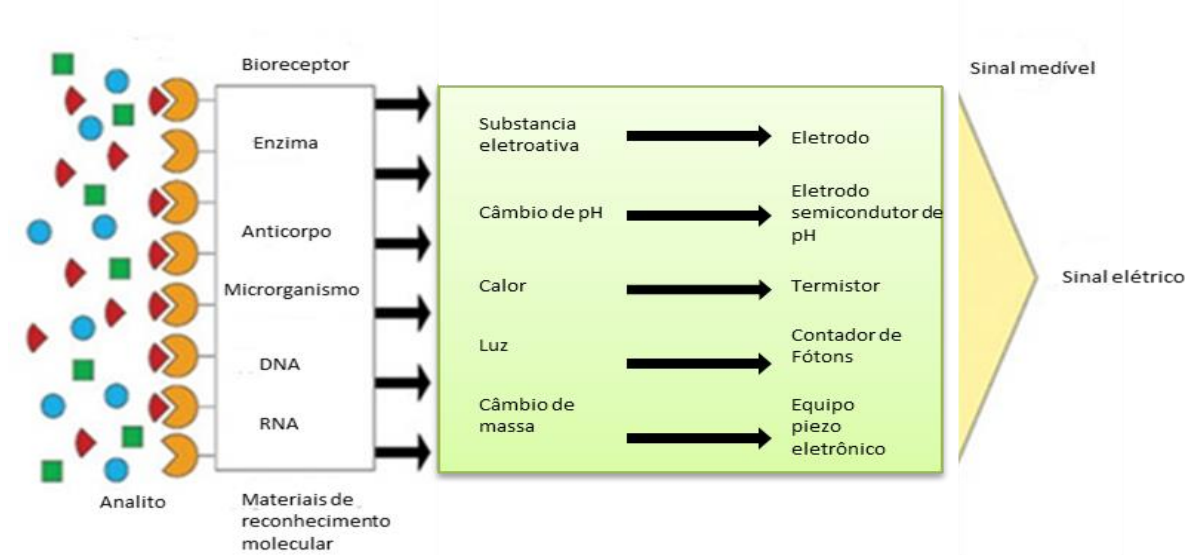


Figura 3.9. Tipo de biossensores e transdutores.

Os biossensores também são classificados quanto ao tipo de bioreceptor em: enzimáticos, imunossensores, genossensores etc (VO-DINH & CULLU, 2000). Em um biossensor, é desejável que a sua porção sensível seja pequena, permitindo assim análises em frações reduzidas de amostras. Isso requer uma atividade seletiva máxima ou específica, para determinados compostos e com mínima interferência possível, para que o sinal possa ser identificável com facilidade (VILLAVERDE, 2003; ZUCOLOTTO et al., 2007). Biossensores eletroquímicos são os mais comuns para o uso em análises clínicas. Esses podem ser amperométricos, potenciométricos, condumétricos ou impedanciométricos. Dentre esses os amperométricos são a classe mais difundida, mais numerosa e com maior sucesso comercial em dispositivos eletrônicos biomoleculares. A importância desses dispositivos deve-se ao fato de terem sido os primeiros nesse novo campo de biotecnologia analítica (DZYADEVYCH et al., 2008).

Muitas são as enzimas empregadas em diferentes trabalhos como elementos de reconhecimento, assim, só no Brasil existem inúmeros de trabalhos relacionados com eletroquímica nos quais são usadas. Por só citar algum dos tantos exemplos: a enzima peroxidase, extraída de vegetais, foi utilizada na determinação de glicerídeos em amostras de

biodiesel, no desenvolvimento de um biossensor potenciométrico (MOINO & VALENTE, 2012), e a enzima tirosinase polifenoxidase, extraída do extrato bruto do fruto do abacate, na fabricação de biossensores amperométricos para a detecção de catecol (PAGLIAI, 2009), outra enzima utilizada como elemento de reconhecimento em sensores bioeletrônicos são as lipases. Zibetti (2008) utilizou duas enzimas lipases, Lecitase Ultra e Lipozyme TL 100L, para avaliar condições de reação de hidrólise enzimática de um substrato oleoso (ZIBETTI, 2008), todos esses trabalhos potenciaram o campo de uso dos biossensores.

3.4. Técnicas de Imobilização

O processo de imobilização enzimática é de fundamental importância para o bom desempenho dos biossensores. Uma grande quantidade de enzima ativa deve estar ligada à superfície do eletrodo (ROSATTO et al., 2001) fazendo com que as biomoléculas imobilizadas apresentem maior estabilidade e maior eficiência se comparadas às enzimas em solução. Além disso, deve-se buscar um aumento no tempo de vida dos biossensores, controlando a temperatura e a variação de pH sem que ocorra uma perda considerável da atividade catalítica (KRAJEWSKA, 2009).

Vários métodos de imobilização de biomoléculas têm sido usados para o desenvolvimento de um biossensor como ilustra a **Figura 3.10**. As técnicas mais comumente usadas para imobilização e desenvolvimento de sensores específicos são: imobilização física (adsorção física e encapsulamento) ou imobilização química (ligação cruzada e ligação covalente), (LEI et al., 2006).

Encapsulamento: É um sistema semelhante à armadilha, mas com moléculas enzimáticas em uma solução restrita no espaço por uma membrana semipermeável a pequenos substratos e produtos.

Adsorção: Por meio deste método de imobilização a enzima se liga a um suporte, funcionalizado ou não, mediante o uso de interações de íons, forças de Van de Waals e/ou por ligações de hidrogênio. Os principais fatores que influenciam a adsorção são:

a) O pH do meio, uma vez que controla o número e a natureza das cargas presentes na superfície da proteína e a superfície;

b) A força iônica, que quando aumentada produz um efeito de blindagem entre a superfície e a enzima que ou facilita sua dessorção ou dificulta sua adsorção;

c) A rugosidade da superfície e o tipo e tamanho de seus poros, que devem ser aproximadamente o dobro do tamanho do eixo principal da enzima.

O método de adsorção é caracterizado pelo seu baixo custo e preparação simples, mas a ligação entre o suporte e a enzima é fraca, levando a articulações instáveis e ineficazes.

Ligação covalente: A ligação covalente de uma enzima a um suporte é talvez o método mais industrialmente interessante de imobilização. A metodologia de ligação covalente baseia-se na ativação de grupos químicos do suporte para reagir com grupos funcionais de proteínas. Dos 20 aminoácidos diferentes encontrados na estrutura das enzimas, os mais utilizados para a formação de ligações de apoio são principalmente lisina, cisteína, tirosina e histidina, e em menor grau metionina, triptofano, arginina e ácido aspártico e glutâmico. O resto dos aminoácidos devido a seu caráter hidrofóbico, não é exposto à parte externa da superfície da proteína, e não podem intervir na junção covalente.

Este método tem uma série de vantagens: os derivados são fáceis de manusear, a carga enzimática na carcaça permanece constante após a imobilização, os derivados podem ser usados em diferentes tipos de reatores (contínuos, embalados, cama fluidizada, tanque agitado etc.) e maior resistência à desativação pelo efeito de temperatura, solventes orgânicos ou pH, tendo estabilizado sua estrutura terciária. No entanto, a imobilização de links covalentes também tem uma série de desvantagens. É necessário conhecer a densidade de grupos ativos por unidade de superfície, uma vez que condiciona o número de articulações de suporte enzimático. Um grande número de articulações pode afetar a estrutura terciária da enzima, podendo perder parte de sua atividade e levar a derivados inativos.

A imobilização covalente não é aconselhável em enzimas muito sensíveis a alterações no pH, força iônica etc.

Entrecruzamento: Também chamada de cross-linking, é uma técnica que tem sido amplamente utilizada na estabilização de muitas enzimas (ALONSO et al., 2005; BETANCOR et al., 2005; LÓPEZ-GALLEGO et al., 2005). O método de cross-linking envolve o uso de reagentes bifuncionais que causam ligações intermoleculares entre diferentes

moléculas enzimáticas. O resultado da cross-linking são enzimas com ligações intermoleculares irreversíveis capazes de suportar condições extremas de pH e temperatura. Atualmente, o mais novo método de ligação cruzada é a cristalização de enzimas e sua subsequente ligação cruzada com glutaraldeído (CLECs). O aumento da estabilidade baseia-se na obtenção de uma rede cristalina, onde moléculas enzimáticas são cercadas exclusivamente por outras moléculas de proteínas. Desta forma, a enzima em si atua como um suporte, e sua estrutura terciária são estabilizados por ligações covalentes intermoleculares.

Geralmente, observa-se um aumento na estabilidade das enzimas após sua imobilização, que se deve principalmente à estabilização estrutural da enzima devido à existência de uniões de apoio. A estrutura terciária da enzima torna-se mais rígida e torna-se mais resistente à desativação térmica ou química. Assim, a agregação intermolecular é evitada mantendo as moléculas enzimáticas retidas em uma determinada região do espaço. Essas vantagens são obtidas apenas nesses métodos envolvendo ligações covalentes.

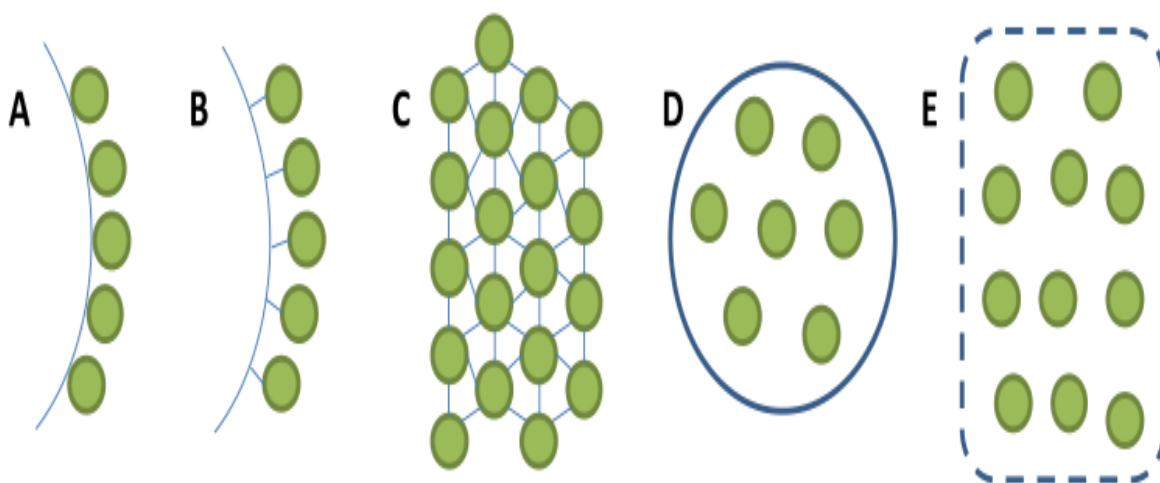


Figura 3.10. Principais tipos de imobilização. A- Adsorção, B-ligação covalente C- Entrecruzamento, D- Encapsulação e E- Retenção em membrana (GUILLÉN, 2012).

3.5. Eletrodos Quimicamente Modificados por Filmes Poliméricos

Várias são as pesquisas em todo o mundo que mostram a interdisciplinaridade na aplicação de polímeros. A condutividade eletrônica desses materiais orgânicos tem atraído muito interesse devido ao desenvolvimento de projetos aplicados na produção de células

solares, baterias, aparelhos eletrocromicos, sensores, aparelhos eletrônicos moleculares, biossensores e eletrodos quimicamente modificados (EQM). Murray e colaboradores (1975) introduziram o termo EQM para designar eletrodos com moléculas quimicamente ativas imobilizadas na sua superfície. O objetivo dessa modificação é pré-estabelecer e controlar a natureza físico-química da interface eletrodo-solução, como forma de alterar sua reatividade e seletividade, ampliando o desenvolvimento de eletrodos para vários fins e aplicações. Para o preparo de um EQM é necessário escolher adequadamente o material do eletrodo e o material a ser depositado, pois ambos devem apresentar características apropriadas para a análise em questão e serem compatíveis com a janela de potencial a ser utilizada. Dentre os materiais de eletrodo é possível citar o ouro, platina, carbono grafite, fibra de carbono, pasta de carbono, mercúrio e outros (ROSA, 2008).

3.5.1. Dihexadecilfosfato (DHP)

Dihexadecil fosfato (também conhecido como dihexadecil hidrogênio fosfato, ou DHP) é um tipo especial de molécula de surfactante hidrofóbico com um grupo fosfato carregado negativamente na cabeça polar ligado a duas longas cadeias de hidrocarbonetos (HU et al., 2010), como ilustrado na **Figura 3.11**. DHP apresenta a fórmula linear $[\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{15}\text{O}]_2\text{P}(\text{O})\text{OH}$ e uma massa molar de $546,85 \text{ g mol}^{-1}$. Este material pode ser disperso em solventes aquosos (WU, 2009) e orgânicos, como clorofórmio (ZHANG & RUSLING, 1997), usando banho ultrassônico. A dispersão resultante é estável e homogênea, exibindo um aspecto entre um gel e um cristal líquido (PENG et al., 2007; JANEGITZ et al., 2011; GARCIA et al., 2013).

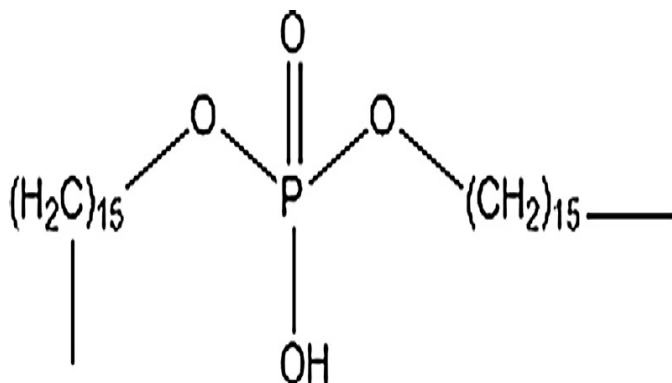


Figura 3.11. Estrutura química do DHP

Os filmes estáveis podem ser preparados por soluções de fundição de DHP em solventes adequados em superfícies ou diretamente nos eletrodos. Alguns sensores eletroquímicos e biossensores que utilizam DHP em muitos casos, após a evaporação do solvente, observamos a automontagem de múltiplos filmes bicamadas, semelhantes a pilhas de biomembranas formando um filme muito estável na superfície do eletrodo, provavelmente devido a ligações de hidrogênio, **Figura 3.12** (VICENTINI et al., 2013).

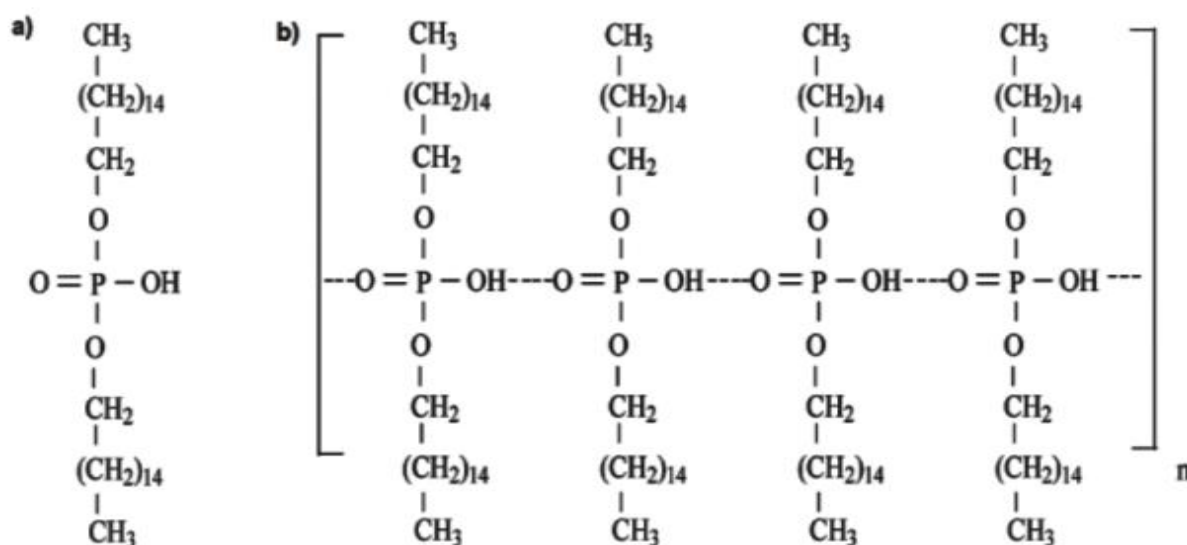


Figura 3.12. Representação esquemática do filme de DHP.

O DHP tem sido usado para imobilizar proteína redox nas superfícies de eletrodos (**Tabela 3.5**), para aumentar a reversibilidade da transferência de elétrons entre proteínas e superfícies metálicas (KASHANIAN et al., 2012; WU & HU, 2007). Além de serem usados em sensores, filmes DHP depositados sobre metais como cobre, ouro e carbono, podem ser usados como modelos para membranas bioquímicas. Além disso, o estudo de surfactantes adsorvidos em uma superfície metálica pode fornecer pontos diferentes em vários campos, como adesão, lubrificação, detergência e inibição de corrosão (FOUCAULT et al., 2003). Há grande interesse no uso de biomoldes em associação com nanomateriais. Rotas sintéticas biomiméticas oferecem a oportunidade de controlar tamanho, forma, estrutura cristalina, orientação e organização de nanomateriais. Biomoléculas como oligonucleotídeos, peptídeos e proteínas oferecem rica diversidade estrutural e funcional na síntese de nanopartículas.

Tabela 3.5. Propostas de eletrodos que usam DHP como modificador

Analito	Eletrodo	LD (mol L ⁻¹)	Referência
Estradiol	RGO–DHP/GC	7,7×10 ⁻⁸	Janegitz e colaboradores (2014)
Dopamine	NiONPs–MWCNTs–DHP/GC	5,0×10 ⁻⁸	Figueiredo-filho e colaboradores (2014)
Epinephrine		2,0×10 ⁻⁸	
Simvastatin	A-MWCNTs–DHP/TaE	1,0×10 ⁻¹¹	Fayazfar e colaboradores (2014)
Bezafibrate	MWCNTs–DHP/GCE	1.6×10 ⁻⁸	Ardila e colaboradores (2014)
Resveratrol	MWCNTs–DHP/GCE	4.4×10 ⁻⁸	Huang e colaboradores (2013)
Chrysophanol	ABNPs–DHP/GCE	2.0×10 ⁻⁹	Zhang e colaboradores (2013)
Ractopamine	MWCNT–DHP/GCE	5.9×10 ⁻⁸	Liu e colaboradores (2012)
Clenbuterol	ABNPs–DHP/GCE	3.2×10 ⁻⁸	Fan e colaboradores (2012)
Zirconium	AB–DHP/GCE	4.0×10 ⁻¹²	Deng e colaboradores (2011)
Glucose	GOx–CNTs–DHP/GCE	9.0×10 ⁻⁶	Janegitz e colaboradores (2011)
l-Cysteine		1.0×10 ⁻⁷	
Glutathione	AB–DHP/GCE	2.0×10 ⁻⁷	Lin e colaboradores (2010)

3.5.2. Óxido de grafeno

Óxido de grafeno (OG), que é quimicamente semelhante ao grafite oxidado, consiste em estruturas gráficas constituídas de uma camada de grafeno funcionalizada com grupos epóxi, hidroxila, carboxílicos e carbonila. É geralmente preparado pela oxidação de flocos de grafite, dando ao OG características de hidrofiliçidade, dispersibilidade e compatibilidade com diversas matrizes poliméricas (POTTS et al., 2011; EDWARDS & COLEMAN, 2013; NANDA et al., 2015). A **Figura 3.13** ilustra a provável composição da estrutura do óxido de grafeno.

Várias condições e reagentes para a oxidação do grafite são estudados, os quais podem ser amplamente classificados como à base de Clorato, métodos desenvolvidos por Brodie, Staudenmaier e Hofmann ou os métodos à base de permanganato, estudados por Hummers e Offeman, possuindo variações com pequenas modificações (WONG et al., 2014).

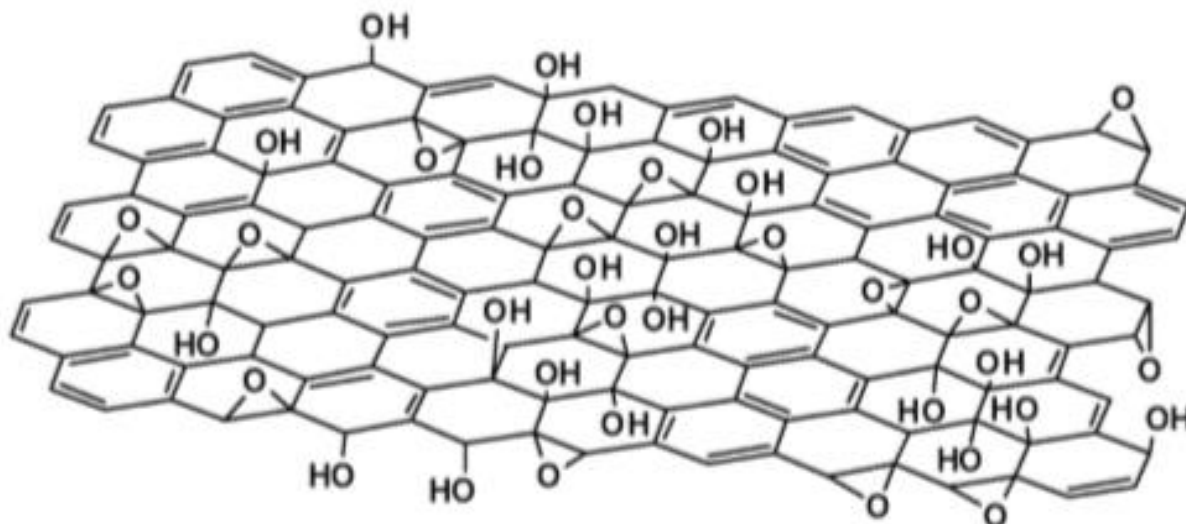


Figura 3.13. Representação dos prováveis grupos funcionais presentes na estrutura do óxido de grafeno (DREYER, 2010).

No entanto, a quantidade, tipo e localização dos grupos funcionais podem variar de acordo com as condições de obtenção, já que as propriedades do OG estão associadas com a natureza dos grupos funcionais e a morfologia do óxido obtido. Estas características dependem do grafite de partida e das condições de reação tais como: o tempo oxidação, a temperatura e dos agentes oxidantes, o que apresenta forte influência sobre a reatividade destes materiais (BOTAS, 2012; SHAMAILA et al., 2016). A introdução de grupos funcionais (tais como hidroxila e éxi) resulta no aumento do espaçamento interlamelar, bem como na alteração da hibridação dos átomos de carbono oxidados, de sp^2 (planar) para sp^3 (tetraédrica); os níveis de oxidação variam com base no método de preparação e do tipo de grafite precursor. Estes grupos intercalados são responsáveis pela quebra das ligações de Van der Waals e o efeito mais visível da oxidação é a mudança de cor de cinza para marrom (MCALLISTER et al., 2007; CISZEWSKI & MIANOWSKI, 2014; SHAH et al., 2015).

Materiais compósitos, que consistem em mais de um tipo de material, têm sido desenvolvidos com objetivo de resultar na combinação de propriedade químicas e físicas, criando áreas de aplicações, como a melhora do armazenamento de energia, produção de membranas para purificação de água, filmes finos, suporte para catalisadores e agentes de reforço em matrizes poliméricas. É possível visualizar que a utilização dos derivados químicos do OG continua em expansão e motiva estudos ainda mais profundos (CALLISTER, 2000; PARK & RUOFF, 2015). A produção de nanocompósitos poliméricos é a chave para modificar e melhorar as propriedades do polímero e é importante para a geração de novos materiais com alto desempenho e multifuncionalidades. A incorporação de cargas nanométricas em uma matriz polimérica combina a leveza, flexibilidade e transparência de polímeros com as propriedades das nanocargas e é amplamente utilizada nas indústrias automobilística, aeronáutica, aeroespacial e de embalagens (FIM et al., 2014).

Nanocompósitos poliméricos baseados em grafeno representam um dos desenvolvimentos tecnológicos mais promissores, pois melhoram consideravelmente a condutividade elétrica, estabilidade térmica, mecânica e as propriedades retardantes de chama quando comparados ao polímero puro. Todavia, para alcançar estas melhorias, a carga precisa ser dispersa homogeneamente na matriz (ZHU et al., 2010; POTTS et al., 2011).

3.5.3. Nanopartículas metálicas

As nanopartículas metálicas (NPM) caracterizam-se por apresentarem dimensões que variam entre os 1 e 100 nm e por manifestarem propriedades totalmente distintas dos materiais que lhe deram origem à escala macroscópica, devido essencialmente a efeitos de superfície (relação volume/área superficial) e de confinamento quântico (RODUNER, 2006; BUZEA et al., 2007;). Estes fatores afetam simultaneamente a reatividade química e as propriedades óticas, químicas e elétricas dos materiais (DANIEL & ASTRUC, 2004). As propriedades óticas em particular, fazem das NPM excelentes componentes em biossensores (óticos e eletroquímicos), em terapia fotodinâmica e para serem usadas como agentes de contraste em técnicas óticas de imagem (FARADAY, 1857; JANA et al., 2001; COLE et al., 2015; LUCKY et al., 2015). Devido às suas excepcionais propriedades, inércia à oxidação e facilidade de síntese e funcionalização das respectivas NMP, os metais mais utilizados são metais nobres como ouro e a prata.

A introdução destas NPsAu é bastante vantajosa para o desenvolvimento de biossensores em solução, já que são muito fáceis de preparar, a sua superfície é facilmente funcionalizável com ligandos interessantes do ponto de vista biológico e são biocompatíveis. Embora a forma esférica seja a mais estável termodinamicamente, existem outros tipos de coloides de ouro, nomeadamente de outras formas, que não a esférica. De entre as diversas nanoestruturas não esféricas relatadas na literatura, destacam-se os nanocubos, NP em forma de estrela, nanorods e nanotriângulos de ouro (**Figura 3.14**). Em conjunto com o elevado grau de biocompatibilidade do ouro, estas nanoestruturas apresentam um enorme potencial, sobretudo ao nível da sua utilização enquanto marcadores óticos para eventos de detecção, já que existem inúmeros estudos que comprovam que comparativamente às NP esféricas, apresentam uma maior sensibilidade, dado que se geram campos elétricos fortes nas suas extremidades (SOARES, 2016).

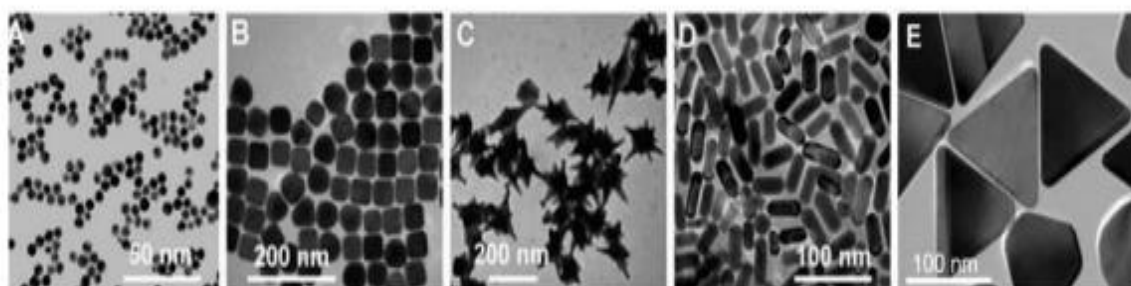


Figura 3.14. Imagens de TEM representativas de diversas nanoestruturas de ouro: A-esferas, B-cubos, C-estrelas, D-hastes e E-triângulos (SOARES, 2016).

Os eletrodos nanoestruturados oferecem uma grande área superficial podendo permitir imobilizar uma grande quantidade de enzima, y uma eficiente transdução do sinal (KATZ et al. 2004). Um eletrodo nanoestruturado no sentido estrito, não só se refere a um eletrodo que contenha nanoelementos condutores, como nanotubos de carbono ou nanopartículas de ouro, senão que haja um controle na nanoescada da organização estrutural e na composição química do eletrodo.

3.6. Técnicas de Caraterização

3.6.1. Técnicas eletroquímicas

Os métodos eletroanalíticos fazem uso de propriedades elétricas mensuráveis (corrente elétrica, diferenças de potencial, acúmulo interfaciais de carga, entre outros) a partir de fenômenos nos quais uma espécie redox interage física e/ou quimicamente com demais componentes do meio ou mesmo com interfaces. Tais interações observadas podem ser medidas (chamadas de sinais eletroanalíticos) e ser relacionadas com algum parâmetro químico intrínseco da espécie (WANG, 2006). Os métodos eletroanalíticos oferecem uma série de vantagens tais como (i) seletividade e especificidade das determinações, resultante da oxirredução das espécies analíticas de interesse em um potencial aplicado específico; (ii) seletividade decorrente dos processos de oxirredução do analito no eletrodo de trabalho feito com material específico (material de eletrodo); (iii) grande sensibilidade e baixos limites de detecção - resultante tanto das técnicas de pré-concentração quanto de modos de aquisição de sinal que proporcionam baixo sinal de fundo, entre outras (BRETT & BRETT, 1998).

3.6.1.1. Voltametria

A voltametria é uma técnica eletroanalítica que se baseia nos fenômenos que ocorrem na interface (entre a superfície do eletrodo de trabalho e a camada fina dissolução adjacente a essa superfície). Essa técnica é classificada como dinâmica, pois a cela eletroquímica é operada na presença de corrente elétrica ($i > 0$) que, por sua vez, é medida em função da aplicação controlada de um potencial (SKOOG et al., 2002). Assim, nessa técnica as informações sobre o analito são obtidas por meio da medição da magnitude da corrente elétrica que surge entre o eletrodo de trabalho e o eletrodo auxiliar, ao se aplicar uma diferença de potencial entre o eletrodo de trabalho e o eletrodo de referência.

Na voltametria o parâmetro ajustado é o potencial (E) e o parâmetro medido é a corrente resultante (i), ou seja, $i = f(E)$. O registro da corrente em função do potencial é denominado voltamograma e a magnitude da corrente obtida pela transferência de elétrons durante um processo de oxirredução (**Equação 5**), pode ser relacionada com a quantidade de analito presente na interface do eletrodo e conseqüentemente, na cela eletroquímica.

Obviamente existe a necessidade do analito ser capaz de sofrer a reação redox na janela de potencial estudada (PACHECO et al., 2013).

$$i = z \times F \frac{dn}{dt} \quad (5)$$

Onde:

- z é um número inteiro de sinal e magnitude da carga iônica da espécie eletroativa;
- F é a constante de Faraday ($96.484,6 \text{ C mol}^{-1}$);
- dn/dt é a taxa de variação de mols da espécie eletroativa.

3.6.1.2. Voltametria Cíclica

A voltametria cíclica é a técnica mais comumente usada para adquirir informações qualitativas sobre os processos eletroquímicos. As informações sobre o analito são obtidas a partir do registro de corrente em função do potencial aplicado durante a sua eletrólise, que ocorre em uma célula eletroquímica constituída pelo eletrodo de trabalho, contra-eletrodo e eletrodo de referência (**Figura 3.15**); (DANERO, 1974; SKOOG et al., 2002). A eficiência desta técnica resulta de sua característica de rapidamente fornecer informações sobre a termodinâmica de processos redox, da cinética de reações heterogêneas de transferência de elétrons e sobre reações químicas acopladas a processos absorptivos (WANG, 2006).

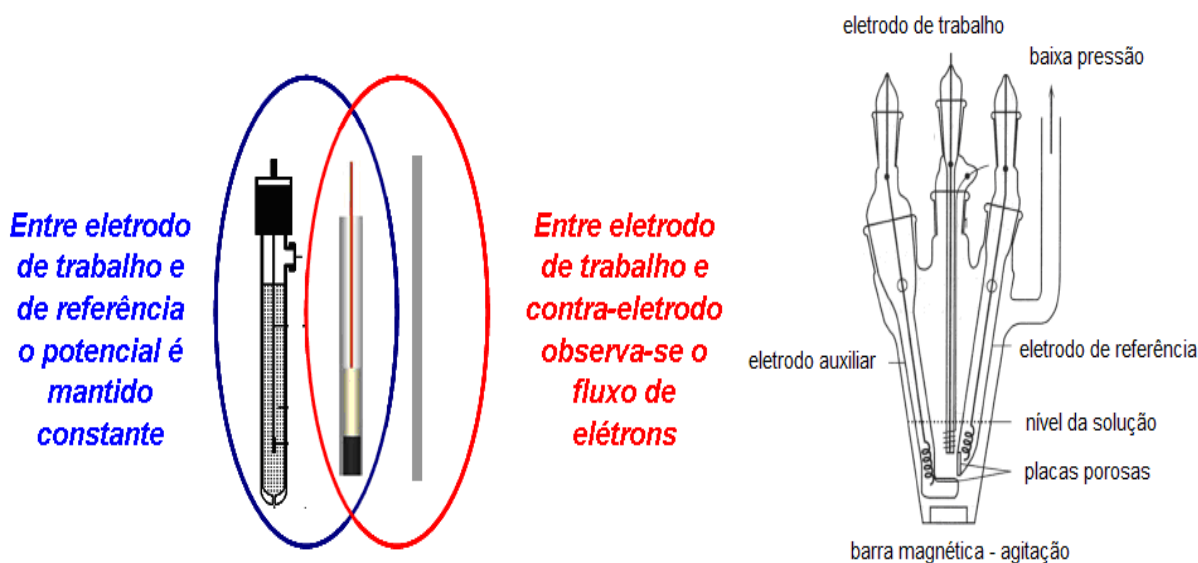


Figura 3.15. Sistema de três eletrodos (PACHECO et al., 2013).

A Voltametria Cíclica (VC) corresponde a uma técnica eletroanalítica que apresenta grande importância quando se deseja adquirir informações qualitativas no estudo de processos eletroquímicos. O funcionamento da técnica de VC consiste basicamente na aplicação de uma variação de potencial linear na forma de uma onda triangular (**Figura 3.16**) a um eletrodo de trabalho, ocasionando reações de oxidação e redução na presença de espécies eletroativas na solução ou presentes na superfície do eletrodo (BRETT & BRETT, 1996).

O potencial é aplicado entre dois valores a uma taxa fixa, no entanto quando o potencial atinge E_2 a varredura é invertida e o potencial é aplicado de volta para E_1 (**Figura 3.16 A**). A forma de aplicação do potencial na voltametria cíclica pode ser: A-linear, onde se alterna entre valores crescente e decrescentes de potencial frente à referência; B- escada (staircase), degraus de potenciais pequenos e tempos de duração pequenos onde a corrente é lida apenas no final deste intervalo (PACHECO et al., 2013). A velocidade de varredura de potencial é um fator crítico, desde que a duração de uma varredura deve proporcionar um tempo suficiente para permitir uma reação química significativa ocorra (GRIESHABER et al., 2008).

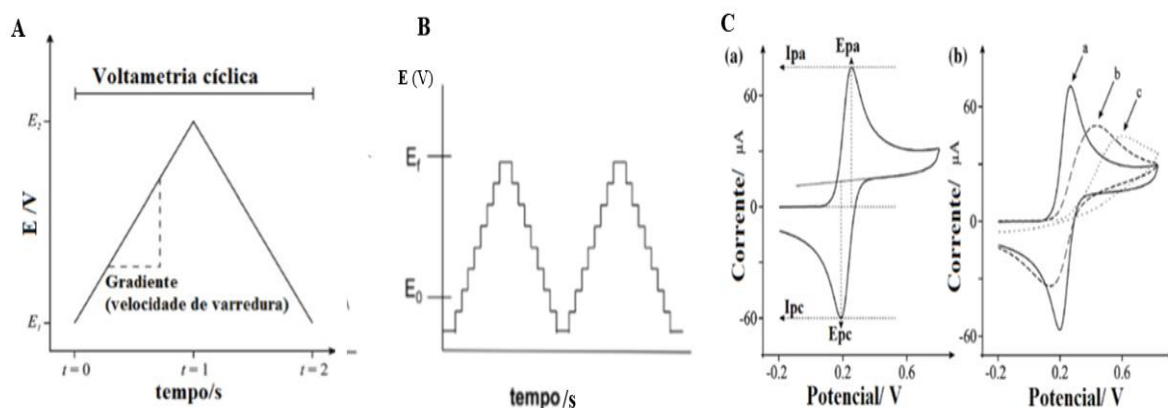


Figura 3.16. A- Perfil do potencial de excitação aplicado em um ciclo; B- potencial aplicado tipo escada; C- (a) voltamograma resultante mostrando as correntes e potenciais e (b) comparação dos voltamogramas reversível, quase-reversível e irreversível (PACHECO et al., 2013).

Os parâmetros de maior importância que podem ser obtidos a partir de um voltamograma cíclico são: potencial de pico anódico (E_p), potencial de pico catódico (E_{pc}), corrente de pico anódico (I_{pa}), corrente de pico catódico (I_{pc}) e a diferença entre o potencial de pico anódico e de pico catódico (ΔE_p).

Os resultados obtidos são representados em gráficos de corrente VS potencial aplicado, conhecidos como voltamogramas, **Figura 3.16 C**. O tipo de voltamograma gerado depende do tipo de mecanismo redox que o analito em questão sofre na superfície eletrodo. Portanto, a partir dos principais parâmetros extraídos de um voltamograma cíclico podem-se obter informações relacionadas à reversibilidade do sistema em estudo, bem como a elucidação de mecanismos de reações eletroquímicas, detecção da existência de reações acopladas a processos eletroquímicos, identificação de espécies presentes em solução (bem como de intermediários) e análise semiquantitativa das velocidades de reação (SKOOG et al., 2005). A seguir são descritos brevemente os diferentes tipos de sistemas que podem ser diagnosticados e caracterizados em um estudo voltamétrico ilustrados na **Figura 3.17**.

Reversível	Quase-reversível	Irreversível
Definição		
<ul style="list-style-type: none"> • A velocidade da reação de transferência de carga é elevada e a etapa de transferência de massa controla o processo. • Têm equilíbrio dinâmico na interface do eletrodo. • Segue a equação de Nernst. 	<ul style="list-style-type: none"> • A corrente é controlada pela transferência de massa e de carga. • A equação de Nernst é aproximadamente satisfeita. 	<ul style="list-style-type: none"> • A corrente é controlada somente pela transferência de carga, a qual é lenta. • Não segue a equação de Nernst.
Parâmetros		
$I_{pa}/I_{pc} = 1$ $I_p \propto v^{1/2}$ E_p é independente de v . $\Delta E_p = 59/n$ (mV)	$I_{pa}/I_{pc} = 1$; se $\alpha = 1$ $I_p \propto v$ E_p é dependente de v e se desloca negativamente com aumento de v . $\Delta E_p > 59/n$ (mV)	Ausência de pico reverso $I_p \propto v^{1/2}$ E_p depende de v . $ E_p - E_{p/2} = (48/n\alpha)^*$

* α coeficiente de transferência de carga e o $E_{p/2}$ o valor do potencial que é determinado à metade do valor da corrente de pico (I_p)

Figura 3.17. Diferentes tipos de processos redox, que podem ser identificados e caracterizados em um estudo de voltametria cíclica (SILVA, 2018).

3.6.1.3. Voltametria de Onda Quadrada (SWV)

A voltametria de onda quadrada (SWV), do inglês “Square Wave Voltammetry”, é uma das técnicas voltamétricas de pulso mais rápidas e sensíveis. Os limites de detecção podem ser comparados aos das técnicas cromatográficas e espectroscópicas. Além disso, a análise dos parâmetros característicos desta técnica também possibilita a avaliação cinética e mecanismo do processo eletródico em estudo. Neste tipo voltametria, uma onda quadrada simétrica de amplitude ΔE_p sobreposta a uma rampa de potencial na forma de escada (staircase) caracterizada pela amplitude ΔE_s , largura α e período τ é aplicada ao eletrodo de trabalho, como representado na **Figura 3.18**. A corrente é amostrada duas vezes, uma ao final do pulso direto, quando a direção do pulso é igual à direção da varredura, e outra ao final do pulso reverso (que ocorre no meio do degrau da onda staircase), onde a direção do pulso é contrária à direção da varredura. Assim como na voltametria de pulso diferencial, esta dupla amostragem da corrente garante uma minimização da contribuição da corrente capacitiva sobre a corrente total medida (PACHECO et al., 2013). Esta medida precede um tempo inicial (t_i) onde o eletrodo de trabalho é polarizado a um potencial onde a reação redox não ocorre (DE SOUZA et al., 2003).

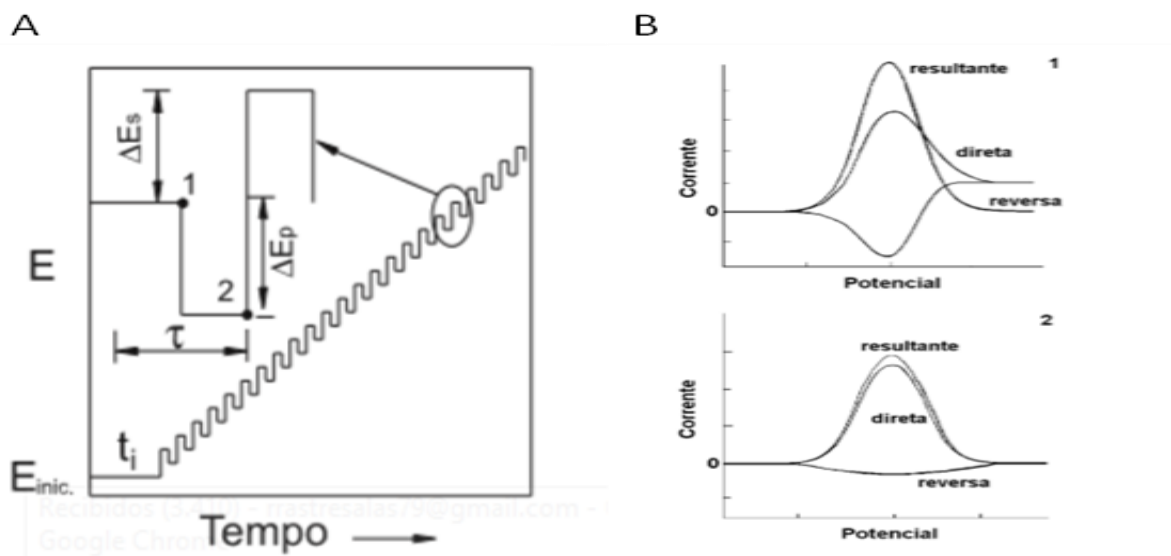


Figura 3.18. A- Forma de aplicação do potencial na voltametria de onda quadrada; B- Voltamogramas esquemáticos de onda quadrada onde 1) representa um processo redox de um sistema reversível e 2) de um sistema irreversível (PACHECO et al., 2013).

O voltamograma resultante consiste na diferença entre estas duas correntes versus a rampa de potencial aplicado e são geralmente simétricas e as variações na altura e na largura do pulso de potencial são sempre constantes, para um determinado intervalo de potenciais. Na **Figura 3.18 B** apresenta os voltamogramas teóricos associados a: (1) um sistema reversível e (2) um sistema irreversível, com a separação observada das correntes direta, inversa e resultante (conforme indicado na **Figura 3.18 B**).

3.6.1.4. Espectroscopia de Impedância Eletroquímica (EIE)

Na espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE), o sistema estudado (tipicamente em estado de equilíbrio) é excitado por um sinal de potencial de corrente alternada (AC) de pequena amplitude e caráter sinusoidal, em diferentes valores de frequências e a resposta de corrente é medida. Sendo que o sinal de excitação é pequeno para que o sistema esteja em estado de quase equilíbrio, as medições de EIE podem ser usadas para avaliar efetivamente as propriedades do sistema sem perturbá-lo (PYUN et al., 2012). A impedância é a medida da habilidade de um circuito de resistir ao fluxo de corrente elétrica, em condições de potencial de corrente alternada. A análise da resposta do sistema fornece a informação relacionada à interface sólido/líquida e a ocorrência de certas reações nesta região.

O cálculo da impedância complexa (Z) pode ser feito com a soma dos componentes real (Z_r) e imaginário (Z_i) da impedância do sistema como função da frequência (ω , frequência angular) (**Equação 5**).

$$Z(\omega) = \frac{E(t)}{I(t)} = \frac{E_0 \cos(\omega t)}{I_0 \cos(\omega t - \phi)} \quad (5)$$

$$Z(\omega) = Z_0(\cos\phi + j\sin\phi) \quad (6)$$

A impedância é expressa em termos da magnitude, Z_0 , e a mudança de fase ϕ ; e resulta na equação de um número complexo (**Equação 6**).

Na representação gráfica a parte real da Z , no eixo horizontal e a parte imaginária no eixo vertical resulta o gráfico Nyquist. Neste, o eixo vertical é negativo e cada ponto é a impedância a uma frequência determinada (ARYA et al., 2007). Na **Figura 3.19**, os dados

obtidos a baixas frequências estão na direita do gráfico, e altas frequências estão no lado esquerdo, e o vector da impedância com magnitude $|Z|$.

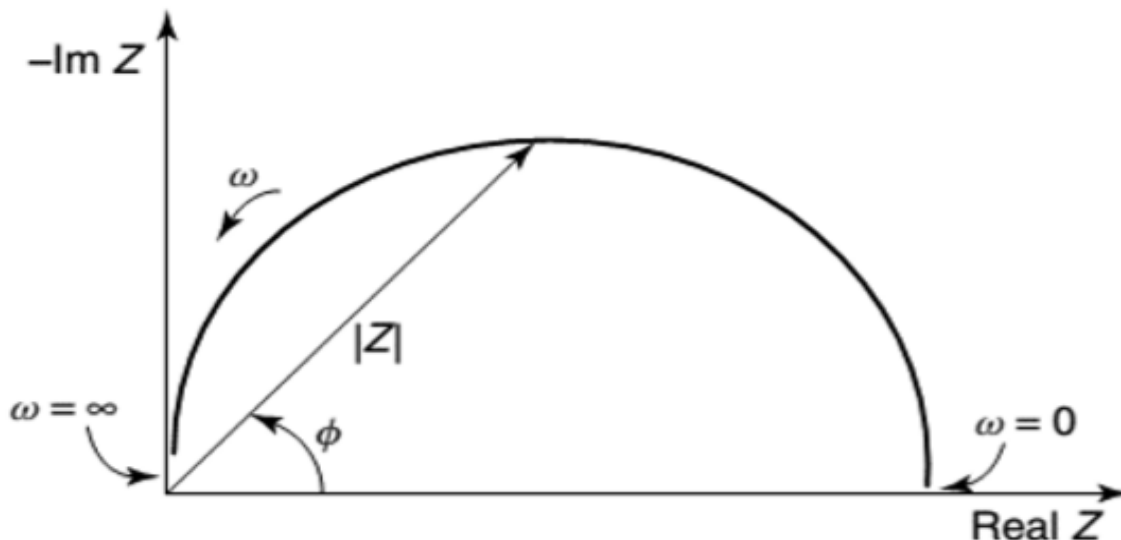


Figura 3.19. Gráfico de Nyquist com o vector de impedância (CARLOS, 2017).

A EIE é uma técnica eficaz para estudar eletrodos modificados, qualquer uma propriedade intrínseca do material ou processos específicos que possam influenciar a condutividade, resistividade ou propriedades capacitivas de um sistema eletroquímico. (GRIESHABER et al., 2008).

3.6.1.5. Voltametria de Pulso Diferencial (DPV)

Na voltametria de pulso diferencial, um pulso de amplitude fixa sobreposto a uma rampa de potencial crescente é aplicado ao eletrodo de trabalho. A **Figura 3.20** mostra essa combinação. A corrente é medida duas vezes, uma antes de aplicar o pulso (S1) e uma vez no final do pulso (S2). A corrente inicial é subtraída da segunda corrente e como resultado se gráfica a relação entre a diferença de corrente e o potencial aplicado dando lugar a um voltamograma com picos de corrente em forma de Gauss, cuja área do pico é proporcional à concentração do analito.

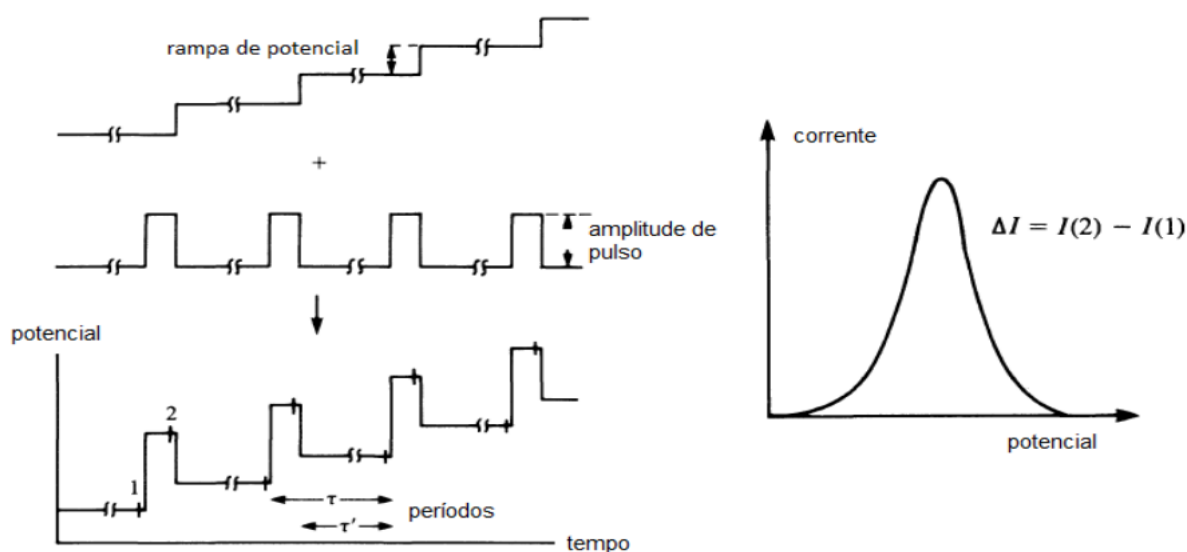


Figura 3.20. Sinais de excitação para voltametria de pulso diferencial (PACHECO et al., 2013).

O objetivo de fazer duas medições de corrente e lidar com a diferença entre elas é para corrigir a corrente capacitiva. Conforme o pulso é aplicado, a contribuição da corrente capacitiva e da corrente de Faraday aumenta, mas a corrente capacitiva diminui exponencialmente, enquanto a corrente de Faraday diminui linearmente. Escolher um tempo adequado para a segunda leitura da corrente total onde a corrente capacitiva seja baixa é importante porque minimiza a corrente de fundo ao ser subtraído do valor da primeira leitura de corrente. (WANG, 2006). Esta correção de correntes permite obter limites de detecção da ordem de $10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$.

3.6.2. Técnicas de caracterização de superfícies

3.6.2.1. Microscopias eletrônicas

A microscopia eletrônica é uma técnica de formação de imagens como resultados de um feixe de elétrons incidente sobre um material de investigar. Uma vez que o comprimento de onda de um elétron é muito menor que o comprimento de onda da luz visível, efeitos de difração ocorrem em dimensões físicas muito menores. Estruturas com tamanhos na escala nanométrica ou subnanométrica podem ser estudados de forma estrutural, morfológica e quimicamente mediante microscopia eletrônica de varredura (MEV) ou de transmissão (MET). As microscopias eletrônicas são ferramentas essenciais para a caracterização da

superfície de nanomateriais, como nanotubos de carbono ou substratos, permitindo ser observado o tamanho, forma, microestruturas, as camadas de recobrimento, mensurar a contaminação de superfícies e analisar falhas de materiais (SMITH & HASHEMI, 2012).

3.6.2.2. *Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)*

O Microscópio Eletrônico de Varredura é um instrumento muito versátil e usado rotineiramente para a análise microestrutural de materiais sólidos revelando a morfologia externa (textura), estrutura cristalina e a orientação dos materiais na amostra (DEDAVID et al., 2007). Apesar da complexidade dos mecanismos para a obtenção da imagem, o resultado é uma imagem de fácil interpretação.

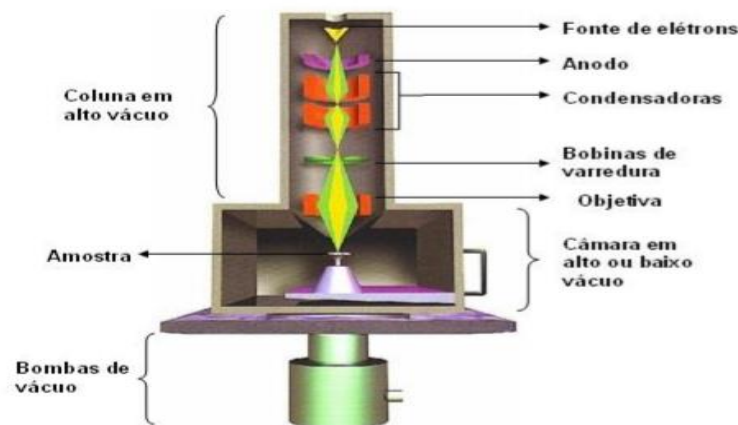


Figura 3.21. Imagem esquemática da coluna de MEV (SOARES, 2011).

Princípio de funcionamento desta técnica consiste em fazer incidir um feixe de elétrons sobre a superfície da amostra, ponto a ponto, e transmitir o sinal do detector a um computador (**Figura 3.21**). A maioria dos instrumentos usa como fonte de elétrons um filamento de tungstênio (W) que pode operar numa faixa de tensões de aceleração de 1 a 50 kV. O feixe de elétrons é acelerado e colimado até atingir a superfície da amostra, a profundidade da penetração dos elétrons depende da composição do material, desta forma, produzindo elétrons secundários e retroespalhados que são coletados por um detector e convertidos em um sinal de imagem. A imagem formada a partir do sinal captado na varredura eletrônica de uma superfície pode apresentar diferentes características, uma vez que a imagem resulta da amplificação de um sinal obtido de uma interação entre o feixe eletrônico e o material da amostra (DEDAVID et al., 2007).

3.6.2.3. Ângulo de Contato (Método da Gota Sessil)

A molhabilidade dos materiais é um assunto importante no desenvolvimento de tecnologias envolvendo as últimas camadas de átomos de uma superfície. A técnica mais comum para medir o ângulo de contato versa sobre a análise de uma superfície no que tange a sua molhabilidade a partir da teoria de Young-Laplace, em que é possível definir um material acerca de sua hidrofobicidade ou hidrofiliabilidade, quando o fluido em questão é a água. O comportamento da gota de um determinado líquido em relação à superfície irá depender de forças adesivas, responsáveis pelo espalhamento desta gota sobre a superfície, e de forças coesivas do líquido que respondem por contrair a gota de modo a mantê-la esférica, minimizando sua superfície (FERREIRA, 2013).

Pelo delineamento da parte mais superficial da gota é possível mensurar os ângulos relacionados à interação com a superfície do material em questão, e desta forma analisar seu comportamento frente ao fluido utilizado no estudo. No momento de análise do fluido sobre o material, nota-se uma interação entre os três estados físicos da matéria, em que o sólido é representado pelo material em si, enquanto o líquido corresponde à gota propriamente dita e o vapor à região atmosférica mais próxima da superfície da gota. Esta relação entre os estados físicos, bem como a disposição dos ângulos é mais bem observada na **Figura 3.22** a seguir:

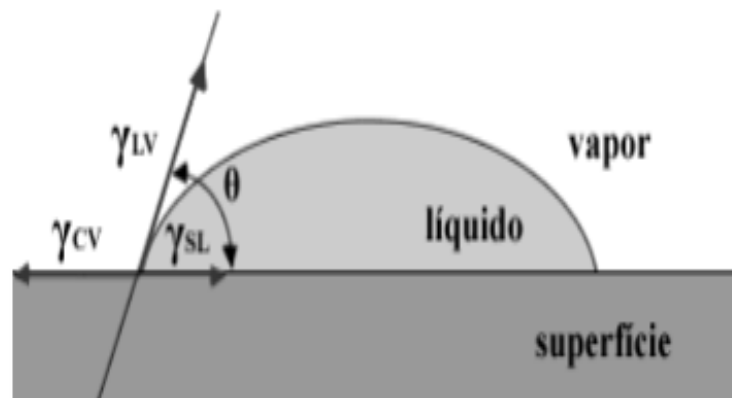


Figura 3.22. Ilustração esquemática do ângulo de contato entre uma gota e uma superfície (FERREIRA, 2013).

Considerando a Figura ilustrada anteriormente, onde o ângulo de contato representa a condição de contorno do líquido em questão, a **Equação 7** de Young-Laplace descreve:

$$\gamma_{LV} \cos \theta = \gamma_{SV} - \gamma_{SL} \quad (7)$$

Onde:

γ_{LV} representa a energia de interface entre o líquido e o vapor;

γ_{SL} entre o sólido e o líquido;

γ_{SV} entre o sólido e o vapor;

E o ângulo θ é obtido experimentalmente

A partir desta relação, obteve-se um valor para cosseno de um ângulo, e sabendo-se qual é este ângulo, pode-se afirmar se a o material em questão é hidrofílico ou hidrofóbico. Por exemplo, se o cosseno for positivo, sabe-se que se trata de θ (γ_{SL}), e então se conclui que pelo espalhamento parcial da gota que se trata de uma superfície hidrofílica. Enquanto para um valor de cosseno negativo, $\theta > 90^\circ$ ($\gamma_{SV} < \gamma_{SL}$), em que o líquido molha muito pouco ou não molha o sólido, neste caso, há uma superfície hidrofóbica. Observa-se ainda em outros materiais que há possibilidade de $\theta > 150^\circ$, onde neste caso, afirma-se que houve uma super-hidrofobicidade (FERREIRA, 2013). A **Figura 3.23** relaciona as medidas de ângulos de contato com as respectivas formas das gotas:



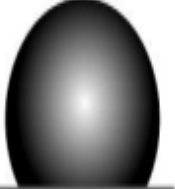
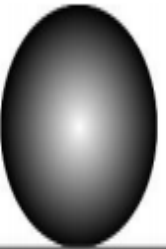
Ângulo de Contato	$\theta < 10^\circ$	$\theta < 90^\circ$	$\theta > 90^\circ$	$\theta > 150^\circ$
Forma da gota				
Comportamento	super-hidrofílico	hidrofílico	hidrofóbico	super-hidrofóbico

Figura 3.23. Classificação dos ângulos de contato numa superfície (SILVA, 2018).

3.6.2.4. Técnicas de absorção

3.6.2.4.1. Espectroscopia no Infravermelho

A Espectroscopia no infravermelho é um método de caracterização física para análise qualitativa e determinações quantitativas de traços de elementos. Isto é possível porque os átomos que formam as moléculas possuem frequências específicas de vibração, que variam de acordo com a estrutura, composição e o modo de vibração da amostra. Esta técnica produz espectros de absorção (e/ou transmissão) por meio da incidência de um feixe de luz na região do infravermelho sobre uma substância, determinando as frequências absorvidas por ela. Uma variedade de utilização encontra em laboratórios analíticos industriais e laboratórios de pesquisa de todos os tipos (LEITE & PRADO, 2012). Análise no infravermelho pode ser uma análise não destrutiva (a amostra pode normalmente ser recuperada para novo uso), e é útil para microamostras.

Dentre os instrumentos utilizados para a espectroscopia no infravermelho, a técnica de Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) é utilizada para obter o espectro infravermelho mais rapidamente, porque requer pouco preparo das amostras e é facilmente encontrado em laboratórios. Em vez de se coletar os dados variando-se a frequência da luz infravermelha monocromática, a luz infravermelha é guiada por meio de um interferômetro. Depois de passar pela amostra, obtém-se o interferograma, que é o sinal medido. Realizando-se uma transformada de Fourier no sinal, obtém-se um espectro idêntico ao da espectroscopia de infravermelho convencional. Uma das variantes FTIR é o modo de reflectância total atenuada (ATR) usada neste caso com espectros de varredura de 4000 a 600 cm^{-1} , tem como princípio o fato de um feixe de radiação passar de um meio mais denso (cristal de ATR) para um meio menos denso (amostra), ocorrendo reflexão. A técnica de FTIR-ATR é principalmente utilizada para a análise de superfície em polímeros (filmes ou pó) (SKOOG et al., 2010).

Vantagem desta técnica FTIR é que os espectrofotômetros são mais baratos do que os convencionais, já que é mais simples construir um interferômetro do que um monocromador. A medida de um único espectro é bem mais rápida nessa técnica, pois as

informações de todas as frequências são colhidas simultaneamente. Isso permite que sejam realizadas múltiplas leituras de uma mesma amostra, fazendo-se uma média, aumentando, assim, a sensibilidade da análise (DE SOUZA & POPPI, 2012).

3.6.2.4.2. Espectroscopia UV- Visível

As medidas baseadas na luz ou outras formas de radiação eletromagnética são amplamente empregadas em química analítica. As interações da radiação com a matéria são o objeto de estudo da ciência da espectroscopia. Os métodos espectroscópicos de análise são baseados na medida da quantidade de radiação produzida ou absorvida pelas moléculas ou pelas espécies atômicas de interesse (**Figura 3.24**). As moléculas sofrem três tipos diferentes de transições quantizadas quando excitadas pela radiação eletromagnética nas regiões do ultravioleta, visível, infravermelha e micro-ondas: transições eletrônicas, vibracionais e rotacionais.

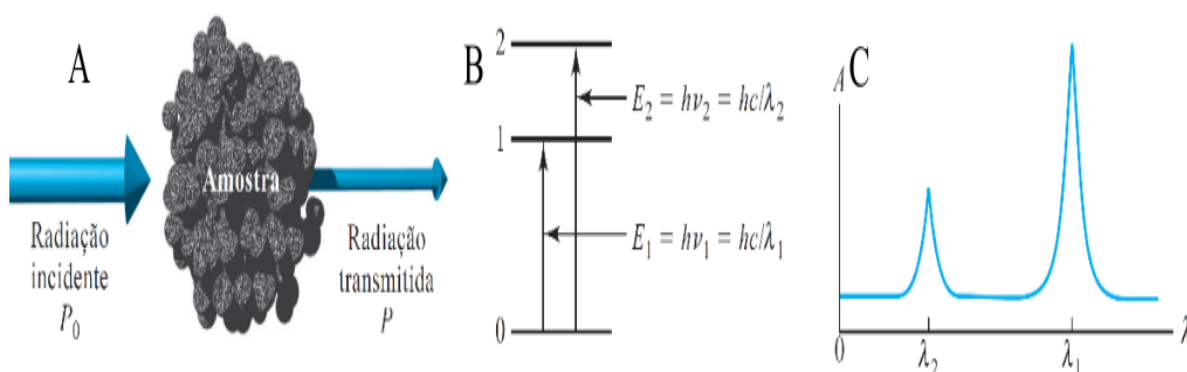


Figura 3.24. Funcionamentos dos métodos de absorção. A- interação da radiação com a amostra resultando na atenuação do feixe, B- absorção equivalente diferentes níveis de energia, C- o espectro de absorção resultante.

A espectroscopia no UV-Vis é uma técnica amplamente utilizada para caracterização. Está relacionada à absorção da radiação ultravioleta/visível (180 a 780nm) pelo material, levando a promoção de elétrons do estado fundamental ao estado excitado. A absorção molecular nas regiões do ultravioleta e visível consiste em bandas de absorção constituídas por linhas próximas entre si. O espectro é obtido pela irradiação da luz através da amostra (líquida e diluída) e o espectro de absorção se dá pela razão entre a intensidade da

radiação que passa pela amostra e pela referência (branco). As intensidades das bandas, relacionadas com a concentração do analito se expressa conforme a Lei de Beer-Lambert (SKOOG et al. 2002).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

Neste capítulo se apresentam as informações sobre os métodos aplicados para a construção e caracterização dos eletrodos enzimáticos, assim como sua aplicação em amostras sintéticas fazendo referência aos métodos de detecção, as condições experimentais, soluções e reagentes empregados para a obtenção dos resultados.

4.1. Parte Experimental

4.1.1. Reagentes

Óxido de grafeno 2 mg mL⁻¹ disperso em água, Glicose-6-fosfato desidrogenase, Glicose-6-fosfato 1 mL, NAD⁺ 100%, Fosfato de sódio monobásico e dibásico (NaH₂PO₄/Na₂HPO₄) foram obtidos da Sigma-Aldrich. O ácido sulfúrico 98%, Álcool isopropílico, KCl, Ferricianeto de potássio 99% / Ferrocianeto de potássio 99% e Dihexadecil Fosfato foram adquiridos da Neon, da Nuclear, da Synth, da Sigma, respectivamente. As NPsAu de 70 ppm usadas foram preparadas pelo grupo de pesquisa LABEL. Todos os reagentes utilizados nos experimentos são de alto grau de pureza analítica. As soluções foram preparadas com água Milli-Q.

4.1.2. Equipamentos

Para a execução das medidas eletroquímicas foi utilizada uma célula eletroquímica de vidro com tampa em Teflon® e 4 orifícios para posicionamento dos eletrodos e para adição de alíquotas da solução do analito. Foram usados eletrodos de trabalho de ouro (Au) e carbono vítreo (C) com diâmetro de 2,0 e 3,0 mm, respectivamente, fio de platina como eletrodo auxiliar e Ag/ AgCl/ KCl (saturada) como eletrodo de referência. Os estudos eletroquímicos foram realizados em potenciostatos/galvonostatos Autolab- Metrohm modelo PGSTAT204 acoplado a um computador usando o programa NOVA versão 2.1. Todas as pesagens foram realizadas em balança analítica OHAUS modelo AR2140BR com precisão de ± 0,01 mg. As medidas de pH foram realizadas em pHmetro modelo Five Easy F20 (Mettler-Toledo). Para agitação das soluções durante as medidas voltamétricas utilizou-se

agitador magnético modelo NII107 (Nova). A homogeneização das soluções foi realizada em banho ultrassom TS-218 (Dekel).

4.2. Preparação dos Eletrodos

4.2.1. Limpeza de Eletrodos de Ouro

Uma limpeza superficial inicial foi necessária nos eletrodos de trabalho para a remoção da camada de óxido depositado na superfície, devido à ação das condições ambientais de armazenamento. Os eletrodos foram mergulhados em álcool isopropílico durante 5 minutos, e posteriormente foi realizada uma limpeza mecânica mediante o uso de alumina 0,3 e 0,05 μm sobre superfície de feltro com o propósito de polir a superfície dos eletrodos seguido esse procedimento de uma lavagem ao término de cada etapa de polimento. Os eletrodos de trabalho foram colocados em meio hidroalcolico e levados no banho ultrassônico por 5 minutos para retirada de alumina da superfície do eletrodo. A limpeza eletroquímica foi feita mediante voltametria cíclica (VC) fazendo varreduras na faixa de potencial desde 0,0 até 1,5 V numa solução de ácido sulfúrico diluído ($0,5 \text{ mol L}^{-1}$) a uma velocidade de varredura de $0,1 \text{ V s}^{-1}$ até obter um perfil voltamétrico característico do eletrodo limpo (aproximadamente 30-50 ciclos). Para a reutilização dos eletrodos de trabalho, eles foram mergulhados em álcool isopropílico e agitados mecanicamente, para realizar arraste do resíduo que ficou na superfície depois da medição e logo iniciar a etapa de limpeza.

A comprovação do procedimento de limpeza dos eletrodos foi realizada mediante 3 ciclos de voltametria cíclica na presença de uma solução 5 mmol L^{-1} de $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6 / \text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ em $\text{KCl } 0,2 \text{ mol L}^{-1}$. O procedimento de limpeza continuará até que os perfis voltamétricos típicos da sonda Fe (III)/Fe (II) dos eletrodos envolvidos durante a comprovação da limpeza sejam superponíveis para o mesmo substrato.

4.3. Preparação dos Biossensores

Foram preparadas 3 variantes de compósitos para o estudo:

- I. DHP-OG-NpAu-G6PD: 1,0 mg de DHP foi adicionado a 1,0 mL de PBS de $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ e $\text{pH}=7,6$ e foi dispersado mediante ultrassom $15 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 2 horas. A $82,3 \mu\text{L}$ da

dispersão foi adicionado 11,8 μL de óxido de grafeno e nanopartícula de ouro seguido de agitação ultrassônica durante 10 minutos. A essa mistura foi adicionado 5,9 μL da enzima (G6PD) para formação do compósito com uma concentração final da enzima de 0.017 $\text{U } \mu\text{L}^{-1}$ (**Figura 4.1**).

- II. DHP-OG-G6PD: seguindo cada uma das etapas mencionadas anteriormente.
- III. DHP-NpAu-G6PD: seguindo cada uma das etapas mencionadas anteriormente.

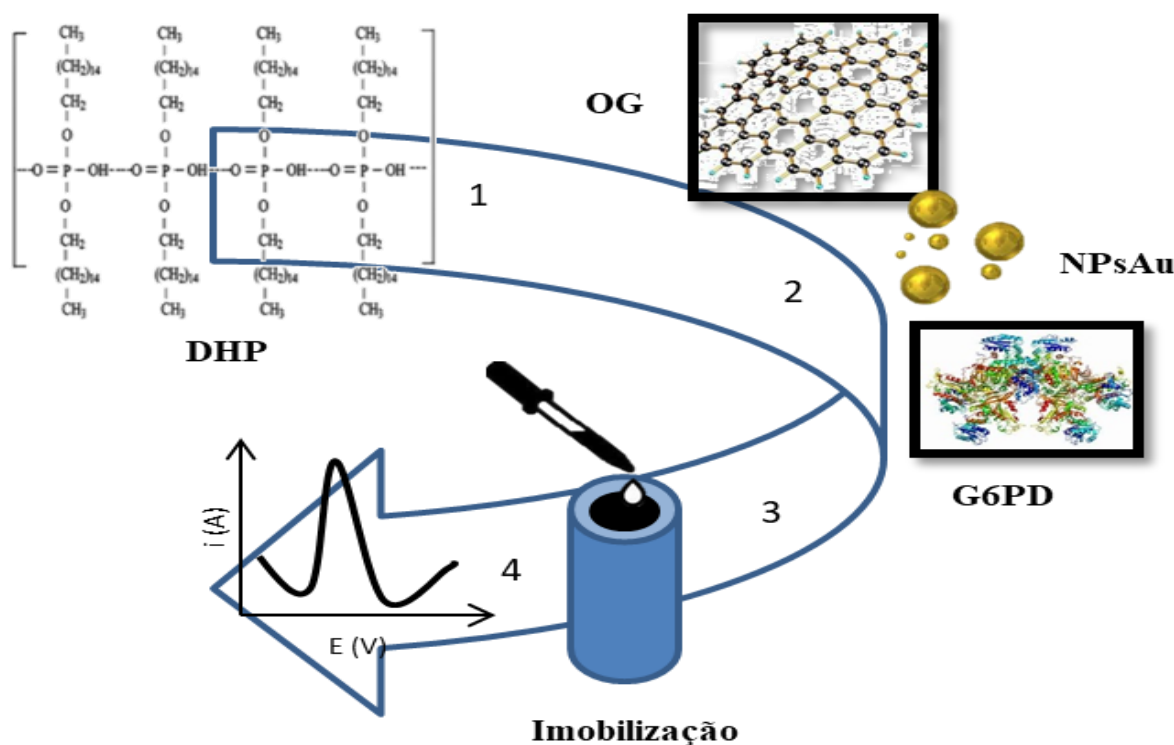


Figura 4.1. Esquema das etapas de preparação dos biossensores

4.3.1. Imobilização de Biomoléculas

Para a imobilização foi usado o método de revestimento com gota (Drop Coating) que consiste em gotejar 2 e 3 μL das soluções compósito descritas no item 4.3, sobre a superfície dos eletrodos limpos de ouro e carbono respectivamente como mostrado na **Figura 4.1**, onde a espessura do filme obtido é diretamente proporcional à concentração da solução ou suspensão de nanocompósitos. Os eletrodos modificados foram secados por 12 horas na geladeira a 4-8 $^{\circ}\text{C}$, com o propósito de diminuir o processo de lixiviação à solução eletrolítica. Os cinco tipos de biossensores fabricados foram nomeados conforme descrição no item anterior precedidos de EBAu e EBC, segundo o eletrodo de trabalho sobre o qual foi feita a modificação da superfície.

4.4. Caracterização Eletroquímica

Os eletrodos de trabalho de ouro e carbono, assim como as modificações sobre a sua superfície e os biossensores obtidos foram caracterizados por voltametria cíclica (VC) e impedância eletroquímica (EIE) usando uma configuração convencional de três eletrodos. Os trabalhos foram realizados usando uma solução de $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6 / \text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ de $5,0 \text{ mmol L}^{-1}$ em solução PBS $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ e $\text{pH}=7,6$ a $0,1 \text{ V s}^{-1}$.

4.4.1. Área Eletroativa

A dimensão da área eletroativa dos eletrodos de trabalho de carbono e ouro, incluindo cada um dos diferentes biossensores obtidos, foi estimada pela equação de Randles-Sevcik (**Equação 8**). Para a mesma usou-se a voltametria cíclica na janela de potencial $-0,4$ a $0,8 \text{ V}$ a diferentes velocidades de varredura ($0,01, 0,02, 0,03, 0,05, 0,1$) V s^{-1} , com 3 ciclos cada análise. Todas as medidas foram realizadas em solução de $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ $5 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ em KCl $0,5 \text{ mol L}^{-1}$.

$$I_p = \pm 2,69 \times 10^5 \times A \times D^{1/2} \times n^{3/2} \times C \times v^{1/2} \quad (8)$$

Em que, I_p é a corrente de pico (anódica o catódica), A é área eletroativa (cm^2), D é o coeficiente de difusão da molécula no eletrólito, n representa o número de elétrons envolvidos na reação redox, v é a velocidade de varredura (V s^{-1}) e C é a concentração de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ em solução (mol ml^{-1}).

4.4.2. Estabilidade dos Sistemas em Estudo

Com o propósito de conhecer a estabilidade do sistema em estudos eletrodos de trabalho, assim como dos biossensores construídos foram submetidos a 10 ciclos usando VC a $0,1 \text{ V s}^{-1}$ de velocidade de varredura em uma solução de 5 mmol L^{-1} $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$, em PBS $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ e $\text{pH}=7,6$.

4.4.3. Caracterização do Processo de Imobilização

O processo de imobilização da enzima sobre os eletrodos de ouro e carbono foi estudado através das técnicas VC e EIE, em cada uma das etapas de modificação da superfície dos eletrodos usadas para a caracterização dos biossensores finais. Os parâmetros de uso de cada técnica foram os seguintes: VC em diferentes velocidades de varredura de potencial (0,01, 0,05 e 0,1) V s⁻¹ a 3 ciclos; EIE frequência de (100000 a 0,1) Hz, Amplitude de 0,01 V e lendo 10 pontos por década. Todas as medidas foram feitas numa solução de 5 mmol L⁻¹ [Fe(CN)₆]^{4-/3-}, em PBS 0,1 mol L⁻¹ e pH=7,6.

4.5. Caracterização Estrutural e Superficial

4.5.1. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Com o objetivo de saber como são distribuídos sobre a superfície dos eletrodos os compósitos estudados foi realizada a caracterização morfológica no Laboratório Temático de Microscopia Ótica e Eletrônica do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia pelo microscópio eletrônico de varredura da TESCAN, modelo VEGA3A. Os filmes de nanocompósitos poliméricos e as amostras dos componentes que os formam foram depositados sobre suporte stubs e deixados secar para posteriormente fazer as análises.

4.5.2. Ângulo de Contato. Método da Gota Sésil

Com a finalidade de conhecer o comportamento hidrofóbico ou hidrofílico da superfície dos eletrodos de trabalho, assim como dos biossensores formados, uma gota de 1µL de água deionizada foi colocada sobre os filmes poliméricos e as medidas de ângulo de contato foram realizadas à temperatura de 24,0 ± 1,4 °C e umidade relativa de 58 ± 3. Com o uso de um microscópio digital (LITE) foi filmado o comportamento da gota e com o software Drop Analysis-LB-ADSA implementado no processador de imagem ImageJ (SCHNEIDER et al., 2012), foi possível medir o ângulo de contato. As medições foram feitas em triplicata e o tempo de permanência estudado da gota foi de 2 minutos.

4.5.3. Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier- FTIR

Com o objetivo de identificar os principais grupos químicos nos compósitos estudados, as amostras foram medidas no equipamento marca- Agilent, modelo- Cary 630 FTIR, com dispositivo de ATR (Reflectância Total Atenuada) 128 scans, resolução 8 cm^{-1} , faixa de varredura: $4000\text{ a }650\text{ cm}^{-1}$ do ICE/IFAM, realizando varreduras nas seguintes dispersões líquidas: DHP, OG e G6PD.

4.5.4. Espectroscopia no UV-VIS

As medidas no UV-VIS foram realizadas em duas amostras contendo: (i) 2 mL de NPsAu na faixa 400-700 nm, com o objetivo de visualizar a banda plasmon das nanopartículas; (ii) 1951 μL de solução PBS $0,1\text{ mol L}^{-1}$ e $\text{pH}=7,6$, 20 μL de G6P ($0,2\text{ mol L}^{-1}$), 15 μL de NAD^+ ($3\times 10^{-4}\text{ mol L}^{-1}$), 10 μL de Mg^{2+} ($0,5\text{ mol L}^{-1}$) e 4 μL de G6PD para determinação da atividade enzimática. Foi utilizado para a análise um espectrofotômetro UV-VIS modelo Evolution 220 (Thermo FisherScientific®) pertencente ao LAEQ da Central Analítica-CAM/UFAM.

4.5.4.1. Determinação da Atividade de Glicose-6-Fosfato Desidrogenase

Como comprovação do funcionamento da enzima foi determinada de maneira alternativa a atividade da G6PD. A enzima foi seguida determinando-se a absorbância de formação da molécula NADH como resultado da redução do cofator NAD^+ em diferentes tempos de reação a 340 nm. Uma unidade de atividade enzimática por mililitro (U mL^{-1}) é definida como a quantidade de enzima que causa o aumento de 0,001 unidades de absorbância por minuto. O aumento de absorbância foi acompanhado por 60 minutos, logo após adição da amostra.

4.6. Procedimento Eletroanalítico para Determinação da Atividade Enzimática

A atividade enzimática foi determinada mediante o uso das técnicas DPV e SWV. A otimização dos parâmetros das técnicas foi derivado de um estudo detalhado dos voltamogramas obtidos para cada modificação, tendo como resultados: DPV (tempo de

modulação 0,02 s, amplitude 25 mV, $\Delta E = 5$ mV e tempo 0,5 s) e SWV (frequência 25 Hz, amplitude 20 mV e $\Delta E = 5$ mV) em tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ e pH= 7,6 na presença de solução NAD⁺ (3×10^{-4} mol L⁻¹), G6P (0,2 mol L⁻¹) e Mg²⁺ (0,5 mol L⁻¹). O estudo da influência de pH realizou-se com o objetivo de conhecer o pH ótimo para a determinação da atividade enzimática, o estudo foi feito variando o pH (5,0, 6,8, 7,0, 7,6 e 8,2) da solução PBS. As respostas foram avaliadas pela intensidade das correntes de pico (Ip), deslocamento do potencial e estabilidade do sinal após a reação enzimática. Com as condições experimentais ajustadas, construíram-se as curvas analíticas pela adição de alíquotas da solução padrão de NAD⁺ (3×10^{-4} mol L⁻¹) na célula eletroquímica. As curvas analíticas foram construídas sob condições de triplicata, com base no aumento da corrente de pico devido à atividade catalítica da enzima, que se baseia na oxidação da G6P e redução NAD⁺ segundo mostrado na **Equação 1**. Os limites de detecção e de quantificação foram determinados em amostras brancas tendo as mesmas condições experimentais, avaliando-se o nível de ruído fornecido pelo equipamento nas faixas de potenciais onde ocorre a detecção.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Caracterização Eletroquímica

5.1.1. Determinação da Área Eletroativa dos Eletrodos de Trabalho e Biossensores

A **Figura 5.1** apresenta os gráficos de i (μA) vs $v^{1/2}$ ($\text{V}^{1/2}/\text{s}^{1/2}$) derivado dos voltamogramas cíclicos (**Anexo**), obtidos para cada um dos eletrodos (ouro e carbono) limpos. Cada voltamograma foi obtido no intervalo potencial de $-0,4$ a $0,8$ V, usando velocidades de varredura na faixa de $0,01$ a $0,1$ V s^{-1} .

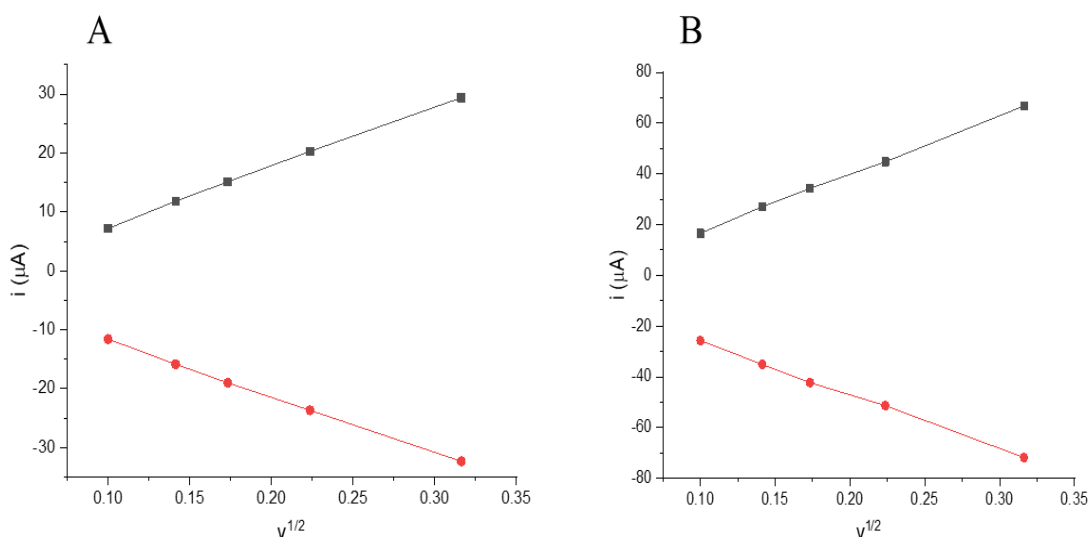


Figura 5.1. Representação gráfica i (μA) vs $v^{1/2}$ ($\text{V}^{1/2}/\text{s}^{1/2}$) para cada um dos eletrodos envolvidos ouro (A) e carbono (B).

Considerando os resultados mostrados na **Figura 5.1** sobre a relação linear existente entre a corrente e a raiz quadrada da velocidade, a equação de Randles-Sevcik foi usada para determinar a área eletroativa dos eletrodos de trabalho. Na **Tabela 5.1** são mostrados os resultados, e pode-se observar que os dois eletrodos de trabalho de ouro e carbono apresentam mínimas diferenças na ordem de $0,0014$ a $0,0072$ cm^2 com respeito às áreas geométricas situação favorável que permite estimar um bom aproveitamento da área no processo de modificação da superfície dos eletrodos.

Tabela 5.1. Resultados das áreas eletroativas determinadas pela equação de Randles-Sevcik

Eletrodos	Ouro	Carbono
A. geométrica (cm ²)	0,0314	0,0707
A (Ferri) (cm ²)	0,030(1)	0,0659(4)
A (Ferro) (cm ²)	0,029(1)	0,0635(4)
Fator de rugosidade	0,906(31)	0,899(6)
R ² (%)	99,1	99,4

Da mesma forma, a área de cada biossensor é determinada em consideração à variação do material compósito que os formam, e os resultados mostrados na **Tabela 5.2** obtidos da análise dos gráficos mostrados na **Figura 5.2**.

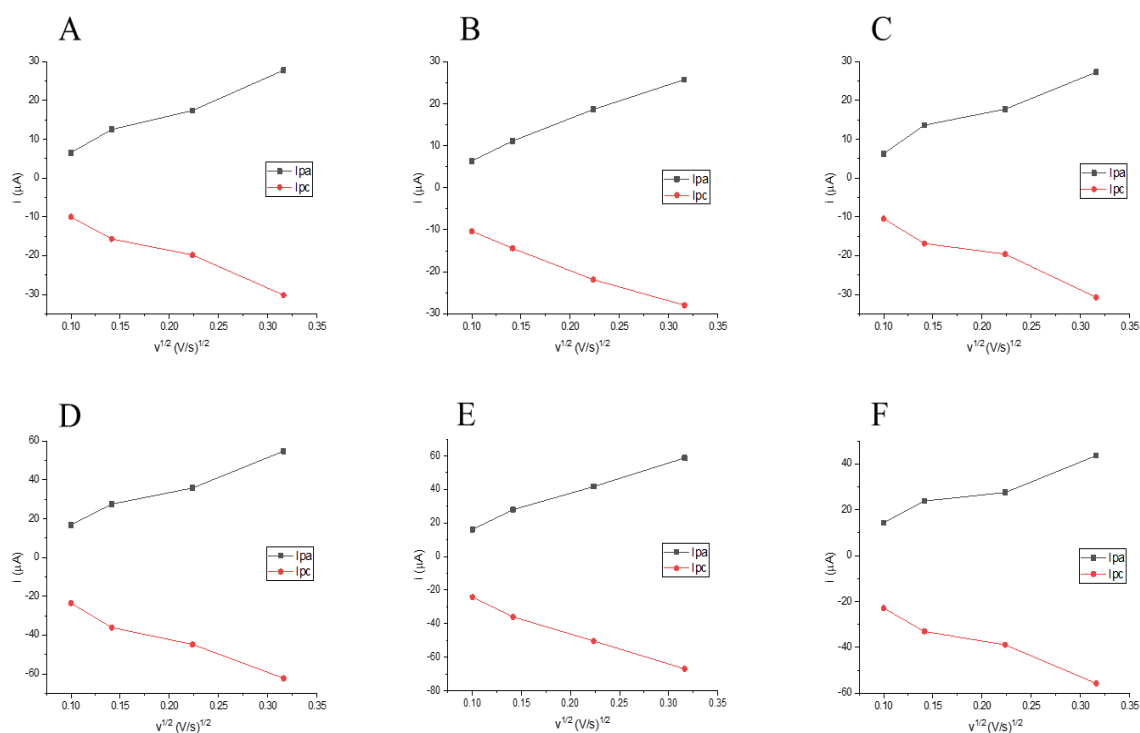


Figura 5.2. Representação gráfica i (μA) vs $v^{1/2}$ ($\text{V}^{1/2}/\text{s}^{1/2}$) para cada um dos eletrodos envolvidos. A, B, C- biossensores formados sobre substrato de ouro com a seguinte descrição: DHP-OG-G6PD; DHP-NPsAu-G6PD; DHP-OG-NPsAu-G6PD, respectivamente, e D, E, F- biossensores sobre substrato de carbono com a mesma descrição e ordem mencionada para os de ouro.

Tabela 5.2. Resultados das áreas eletroativas para os biossensores formados sobre o eletrodo de ouro, determinadas pela equação de Randles-Sevcik.

Compósitos	Eletrodo de Ouro				Eletrodo de Carbono			
	A(Ferri) (cm ²)	A(Ferro) (cm ²)	Fator de rugosidade	R ² (%)	A(Ferri) (cm ²)	A(Ferro) (cm ²)	Fator de rugosidade	R ² (%)
DHP-OG- G6PD	0,0277(2)	0,0267(2)	0,851(6)	98	0,0489(30)	0,0471(31)	0,667(20)	99
DHP- NPsAu- G6PD	0,0263(3)	0,0253(2)	0,807(8)	99	0,0534(20)	0,0515(21)	0,729(30)	99
DHP-OG- NPsAu- G6PD	0,0270(6)	0,0260(5)	0,829(17)	99	0,0395(10)	0,0381(10)	0,539(10)	98,9

Como é mostrado na **Tabela 5.2** os biossensores realizados a superfície de carbono apresentaram uma maior diferença na área eletroativa referido a sua área geométrica. Isso pode ser devido a sua maior possibilidade de absorção sobre sua superfície do polímero DHP, o que sugere maior diminuição da tensão superficial. Já os biossensores formados sobre a superfície de ouro, eles mostraram menos diferenças na ordem de 0,0037 a 0,0061 cm² explicado também pela sua menor capacidade de adsorção sobre a sua superfície do polímero (JANEGITZ et al., 2015).

5.1.2. Estabilidade dos Sistemas em Estudo

A estabilidade é o parâmetro investigado que avalia a resposta eletroquímica dos eletrodos para 10 ciclos de voltametria cíclica. Na **Figura 5.3** é mostrado os gráficos dos valores das correntes de pico anódico e catódico (A) assim como os potenciais relacionados com esses picos de corrente (B) frente à quantidade de ciclos, relacionado com os eletrodos de trabalho ouro (preto e vermelho) e carbono (azul e verde); em solução de 5 mmol L⁻¹ [Fe(CN)₆]^{4-/3-} em PBS 0,1 mol L⁻¹ e pH= 7,6.

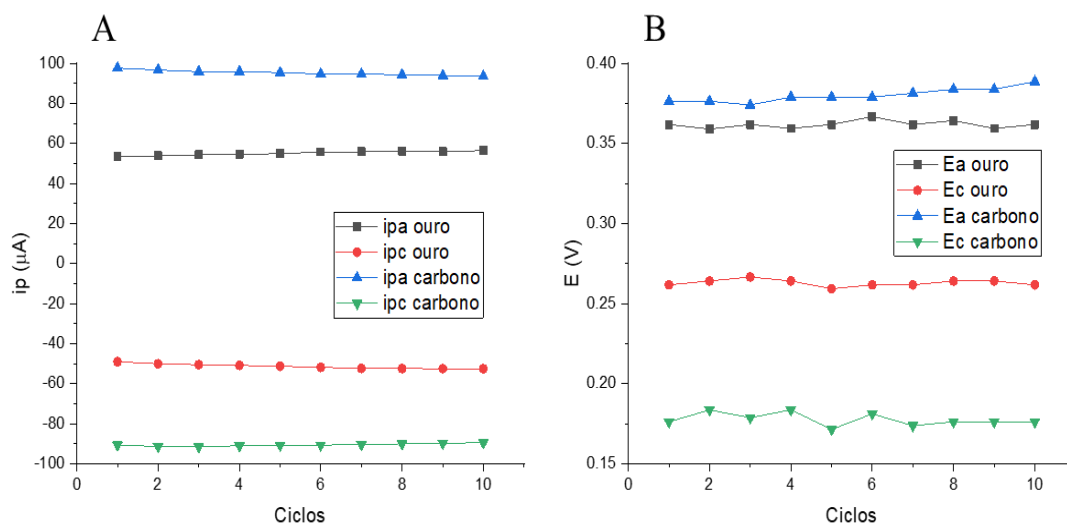


Figura 5.3. Estudo de estabilidade da resposta eletroquímica dos eletrodos de ouro e carbono limpos em $5 \text{ mmol L}^{-1} [\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}/ \text{PBS } 0,1 \text{ mol L}^{-1}$, $\text{pH}= 7,6$ a $0,1 \text{ V s}^{-1}$. A- ouro e B- carbono variação das correntes de pico anódica e catódica, C e D- os valores dos potenciais correspondentes a cada pico de corrente durante cada ciclo respectivamente.

Nota-se que a corrente dos picos para ambos os eletrodos ouro e carbono **Figura 5.3 A** não apresentam grande variação o que indica estabilidade durante a medição. É destacável que os picos de corrente para carbono são muito mais altos $i_{p_a} = 95,22 \pm 1,29 \mu\text{A}$ e $i_{p_c} = -90,57 \pm 0,65 \mu\text{A}$ o que permite concluir que o processo de limpeza foi mais efetivo e maior condutividade que para os eletrodos de ouro. Os valores de potenciais na **Figura 5.3 B** para ambos os eletrodos mostraram maior variabilidade tendo como resultado que para o eletrodo de ouro os valores de $\Delta E_a = 0,362 \pm 0,002 \text{ V}$; $\Delta E_c = 0,263 \pm 0,002 \text{ V}$ e para carbono $\Delta E_a = 0,345 \pm 0,11 \text{ V}$; $\Delta E_c = 0,178 \pm 0,004 \text{ V}$. Da mesma maneira foram estudados os biossensores e esse resultado se ilustra nas **Figura 5.4 e 5.5**.

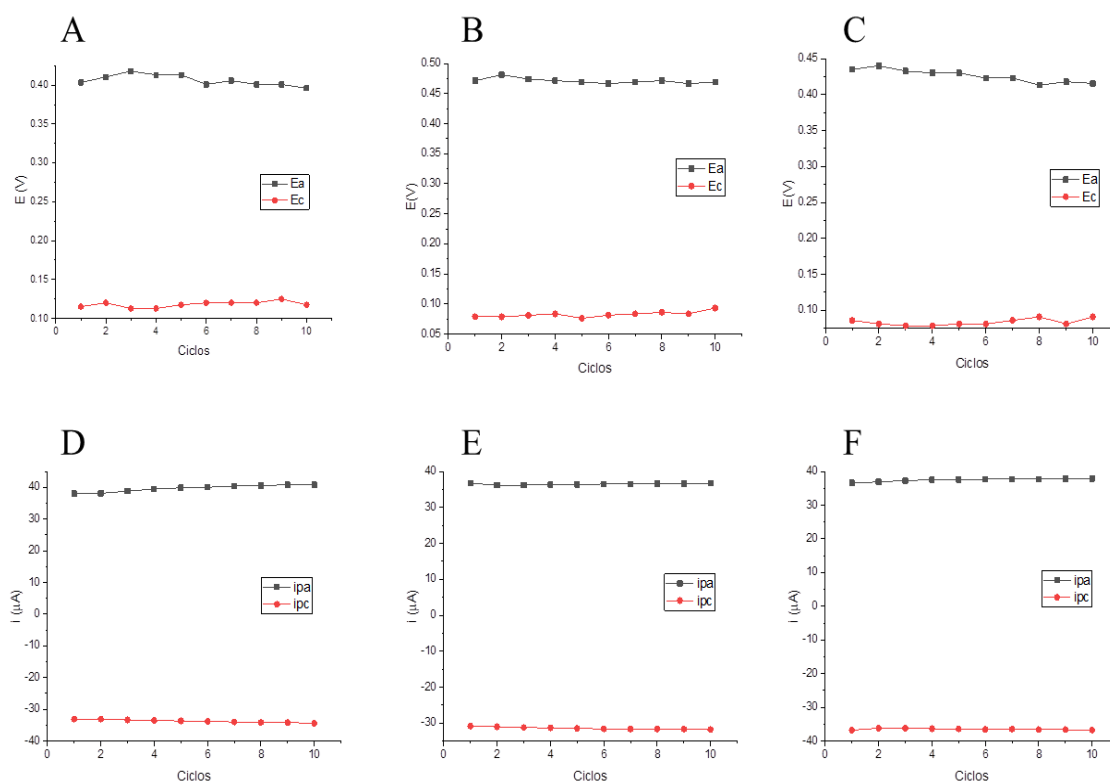


Figura 5.4. Estudo de estabilidade da resposta eletroquímica dos biossensores formados sobre substrato de ouro com a seguinte descrição: A e D- DHP-OG-G6PD; B e E- DHP-NPsAu-G6PD e C e F- DHP-OG-NPsAu-G6PD. D, E e F-correntes de pico e A, B e C- valores de potencial correspondentes a cada pico de corrente durante cada ciclo em 5 mmol L^{-1} $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$ /PBS $0,1 \text{ mol L}^{-1}$, $\text{pH}= 7,6$ a $0,1 \text{ V s}^{-1}$.

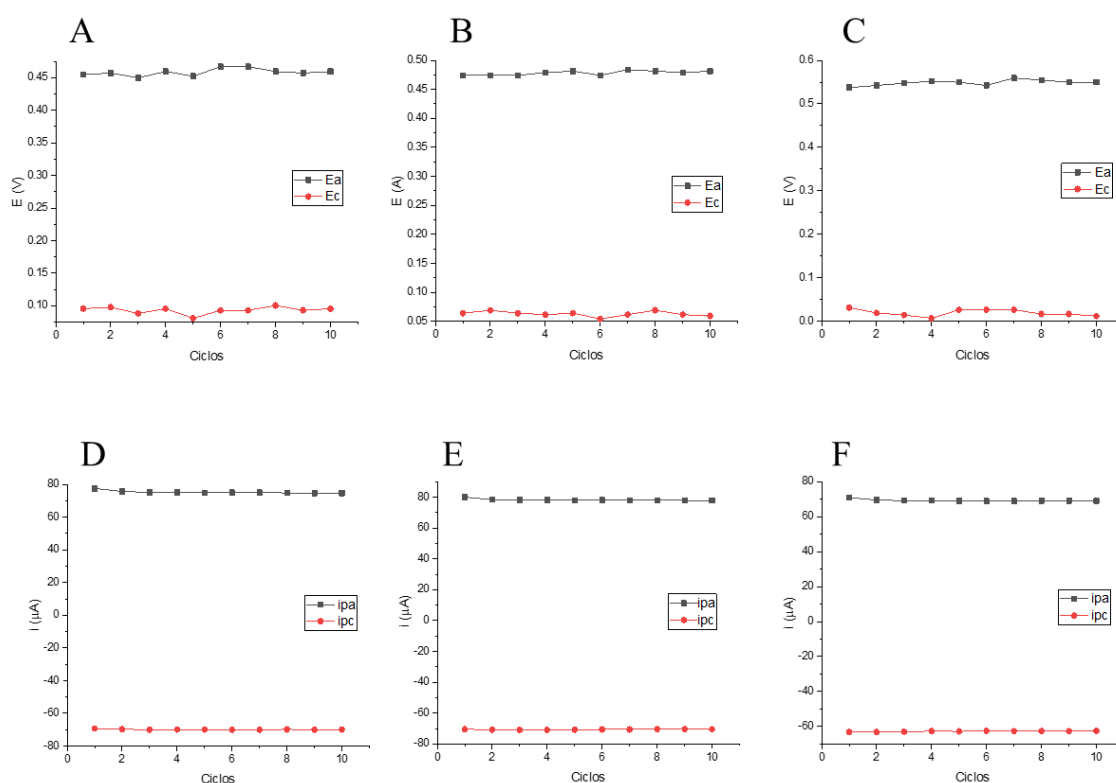


Figura 5.5. Estudo de estabilidade da resposta eletroquímica dos biossensores formados sobre substrato de carbono com a seguinte descrição: A, D- DHP-OG-G6PD; B, E- DHP-NPsAu-G6PD e C e F- DHP-OG-NPsAu-G6PD. D, E e F- correntes de pico e A, B e C- valores de potencial correspondentes a cada pico de corrente durante cada ciclo em $5 \text{ mmol L}^{-1} [\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-} / \text{PBS } 0,1 \text{ mol L}^{-1}$, $\text{pH} = 7,6$ a $0,1 \text{ V s}^{-1}$.

Nas **Figura 5.4 e 5.5** mostram os resultados da relação I_{pa} , I_{pc} , E_{pa} e E_{pc} com a quantidade de ciclos, sugerindo que os processos são estáveis e independentes do número de ciclos efetuados. Na **Figura 5.5 D** observa-se um aumento no pico de corrente anódico no biossensor EBAu-DHP-OG-G6PD, onde o valor é $i_{pa} = 39,68 \pm 1,06 \mu\text{A}$ que comparados com os biossensores que usam a mesma superfície de ouro, a variação é aproximadamente $3,21 \mu\text{A}$.

5.1.3. Caracterização do Processo de Imobilização

O desenvolvimento deste projeto foi necessário realizar um estudo preliminar de caracterização dos eletrodos de trabalho limpos e as modificações sobre sua superfície com filmes finos de DHP. Na **Figura 5.6 (A, B)** mostra os voltamogramas obtidos por VC de cada

uma das etapas de desenvolvimento de cada compósito sobre os eletrodos de ouro e carbono respectivamente.

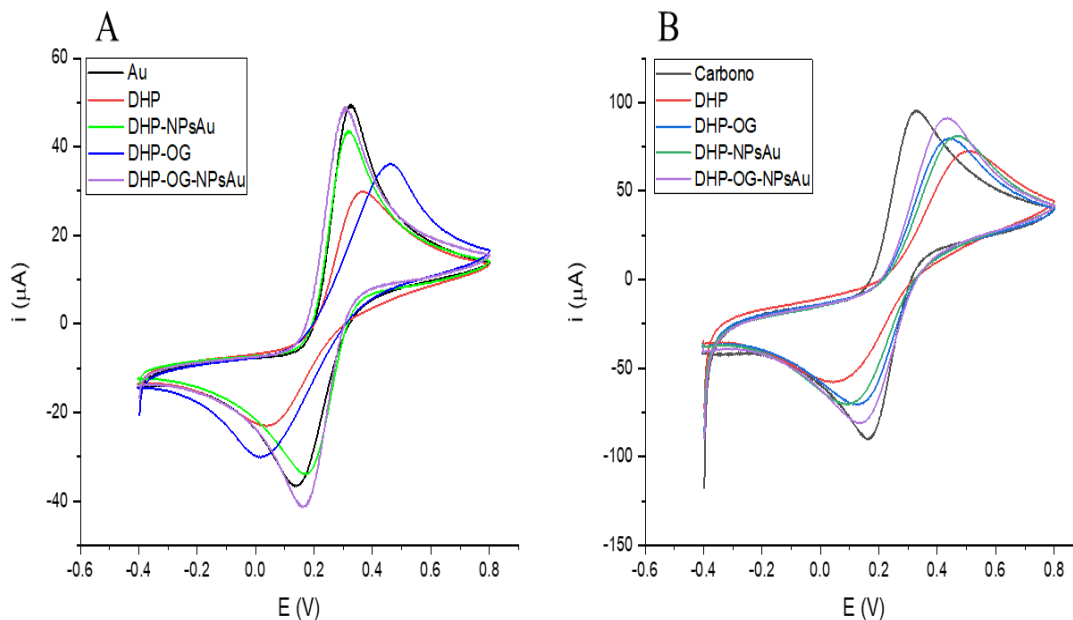


Figura 5.6. Caracterização eletroquímica mediante VC das etapas de formação dos componentes de cada biossensor formado sobre eletrodos de ouro (A) e carbono (B) em $5 \text{ mmol L}^{-1} [\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$ /PBS $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ e $\text{pH} = 7,6$ a $0,1 \text{ V s}^{-1}$

Como é observado na **Figura 5.6**, os eletrodos de ouro e carbono não modificados exibem um perfil reversível e valores altos das correntes faradaicas do processo redox do par $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$, indicando que a transferência de elétrons é controlada por difusão até a superfície dos eletrodos. Porém, ao recobrir os eletrodos com DHP, a magnitude de corrente diminui nos eletrodos de trabalho desde 39,7 a 24,29 % e os potenciais de pico anódico se deslocam para E_a de 0,042 a 0,175 V, respectivamente, devido à natureza isolante do filme resultante que retarda a transferência de carga. O comportamento descrito anteriormente muda ao adicionar ao DHP os componentes OG e NPsAu e finalmente a mistura de OG, NPsAu para formar os novos compósitos que foram depositados sobre os eletrodos de trabalho e que conferem a cada eletrodo maiores valores de corrente. A variante do compósito DHP-OG (azul) alcançou os seguintes valores de $i_{pa} = 36,2 \text{ } \mu\text{A}$ para eletrodo de ouro e para eletrodo carbono $i_{pa} = 79,9 \text{ } \mu\text{A}$; o filme de DHP-NPsAu (verde) alcançou valores de $i_{pa} = 43,6 \text{ } \mu\text{A}$ para ouro e para carbono $i_{pa} = 81,2 \text{ } \mu\text{A}$, melhorando as condições de transferência. No filme DHP-

OG-NPsAu (violeta) as condições condutoras dos eletrodos aumentam e consequentemente a melhora de transferência eletrônica na superfície dos eletrodos, sendo a $i_{pa} = 49,0 \mu A$ para ouro e para carbono $i_{pa} = 91,2 \mu A$ muito próximo à resposta mostrada pelos eletrodos limpos. A **Figura 5.7** confirma com um nível de maior precisão o comportamento ante observado nos voltamogramas cíclicos da **Figura 5.6**.

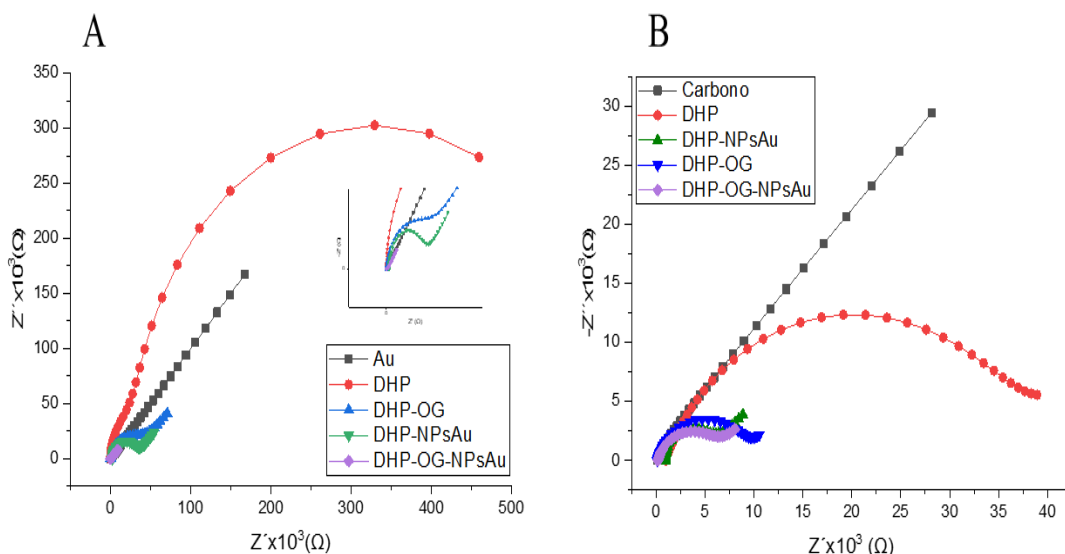


Figura 5.7. Caracterização eletroquímica mediante EIE das etapas de formação dos componentes de cada biossensor sobre eletrodos de ouro (A) e carbono (B) em 5 mmol L^{-1} de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$ /PBS $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ e $\text{pH} = 7,6$

A **Figura 5.7** destaca o estudo de EIE através dos gráficos de Nyquist, onde se pode observar que os eletrodos de ouro e carbono limpo possuem perfil linear com valores de resistência de transferência de carga (R_{tc}) de 501 e $9,33 \times 10^{-6} \Omega$ respectivamente, indicando que o processo de limpeza dos eletrodos foi efetivo. Com a deposição da molécula de DHP na superfície dos eletrodos, os valores de R_{tc} mudaram drasticamente sendo para ouro de $541 \times 10^3 \Omega$ e para o carbono $142 \times 10^3 \Omega$, o filme gera um impedimento eletrostático para os ânions do eletrólito, dificultado assim, a difusão e interação do par redox com a superfície do eletrodo e diminuição da velocidade cinética de transferência de elétrons (RADI et al., 2009).

A introdução dos outros componentes restantes OG e NPsAu para a formação dos filmes DHP-OG e DHP-NPsAu, conferem aos eletrodos uma diminuição nos valores de R_{tc} comparados com o filme de DHP, mostrando-se uma diminuição do semicírculo na região das

altas frequências. Para o eletrodo de ouro os valores correspondentes para ambos os filmes formados são $37,8 \times 10^3$ e $29,7 \times 10^3 \Omega$, respectivamente, com valores de porcentagem de diminuição de 93 e 94,5 % respectivamente. Para o eletrodo de carbono os valores são de $9,17 \times 10^3$ e $6,04 \times 10^3 \Omega$ alcançando valores de porcentagem de diminuição de 93,5 e 98,6 % respectivamente.

Na **Figura 5.7** é mostrado os resultados da mistura dos componentes OG e NPsAu com o polímero DHP sendo que o novo filme DHP-OG-NPsAu recobra maiores valores de velocidade cinética de transferência de cargas, sendo para o eletrodo de ouro $R_{tc} = 7,35 \times 10^3 \Omega$ com 98,6 % de diminuição e para o eletrodo de carbono $R_{tc} = 4,44 \times 10^3 \Omega$ para um 96,9 % de redução. As porcentagens são referidas aos valores de R_{tc} obtido pelo filme polimérico DHP para cada eletrodo. Na **Tabela 5.3** se resume dois dos parâmetros determinados.

Tabela 5.3. Sumário dos parâmetros de EIE estimados para os eletrodos modificados nas etapas de imobilização.

Eletrodos	Não modificados	DHP	DHP-OG	DHP-NPsAu	DHP-OG-NPsAu
OCP_{Au} (V)	0,243	0,242	0,242	0,245	0,243
Rts_{Au} (Ω)	501	541×10^3	$37,8 \times 10^3$	$29,7 \times 10^3$	$7,35 \times 10^3$
OCP_{Carb} (V)	0,243	0,245	0,245	0,246	0,247
Rts_{Carb} (Ω)	$9,33 \times 10^{-6}$	142×10^3	$9,17 \times 10^3$	$6,04 \times 10^3$	$4,44 \times 10^3$

Para estudar o comportamento da célula eletroquímica utilizando a técnica EIE, o sistema em estudo é representado por um modelo ou circuito equivalente como mostrado na **Figura 5.8**.

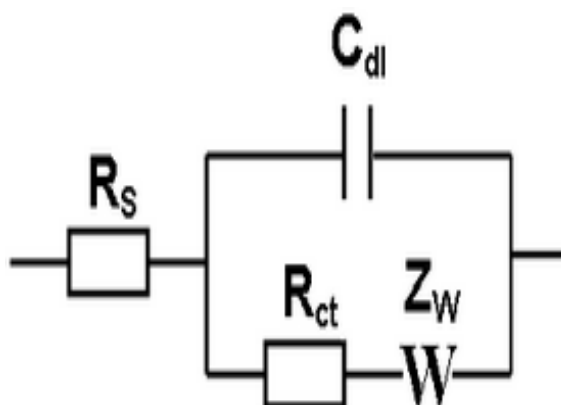


Figura 5.8. Circuito de Randles modelo para a simulação e ajuste dos dados de EIE.

Desta forma, um sistema eletroquímico simples pode ser representado por uma resistência, R_{ct} (resistência à transferência de carga de íons /elétrons), em série com um elemento Z_w (difusão das espécies redox em solução) e em paralelo com um capacitor, C_{dl} (A dupla camada elétrica que é como um capacitor), que simula a interface eletrodo /solução e está, por sua vez, em série com um segundo resistor, R_s (representa a resistência ôhmica entre o eletrodo de trabalho e o eletrodo de referência e abrange a resistência do eletrólito, a resistência dos fios usados para conectar a célula ao sistema de medição), conforme mostrado no circuito de Randles na **Figura 5.8**.

5.1.3.1. Caracterização dos biossensores

Os experimentos de VC e EIE foram realizados para analisar as características eletroquímicas dos biossensores conformados sobre eletrodos de ouro e carbono com a imobilização da biomolécula (G6PD). A **Figura 5.9** mostra os voltamogramas cíclicos dos processos faradaicos correspondente ao par redox nos eletrodos modificados de ouro e carbono com DHP-OG-G6PD, DHP-NPsAu-G6PD e DHP-OG-NPsAu- G6PD e comparados com os eletrodos sem modificação.

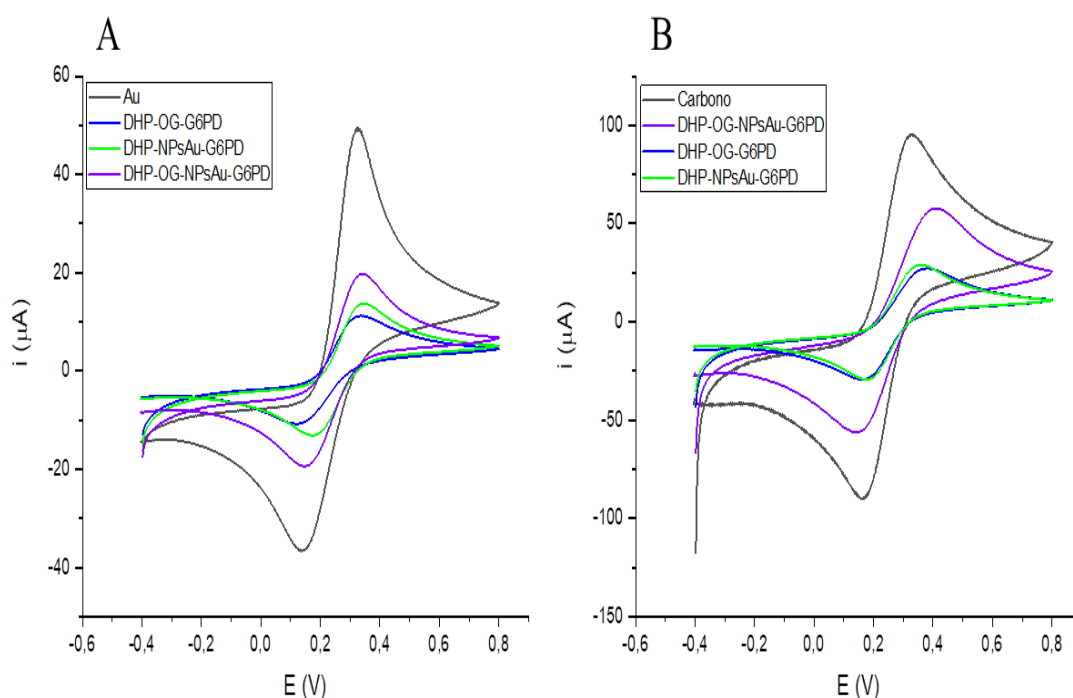


Figura 5.9. Caracterização eletroquímica por VC dos biosensores formados sobre eletrodos de ouro (A) e carbono (B) em 5 mmol L⁻¹ de [Fe(CN)₆]^{4-/3-} /PBS 0,1 mol L⁻¹ e pH= 7,6 a 0,1 V s⁻¹.

Na **Figura 5.9** são mostrados os voltamogramas correspondentes aos biosensores de ouro e carbono onde se visualiza a diminuição dos valores de corrente correspondente *i*_{pa} e mantendo-se o deslocamento do potencial. No caso dos biosensores sobre a superfície de carbono esse deslocamento foi menor que os exibidos **Figura 5.6 B**. Com a entrada de biomolécula aumenta a resistividade dos filmes com respeito à etapa estudada que deu origem à conformação dos biosensores, tendo para os biosensores sobre carbono valores de *i*_{pa}: 57,8, 29,1 e 27,2 µA representando uma diminuição de 28,8, 64,2 e 66 % seguindo a ordem mostrada no voltamograma **Figura 5.9 B**. Para os biosensores sobre ouro os valores reportados são: 19,7, 13,7 e 11,2 µA e com porcentagens de redução de 59,8, 62,2 e 74,3 % seguindo a ordem dos voltamogramas da **Figura 5.9 A**.

A **Figura 5.10** mostra os resultados do estudo de EIE do processo de caracterização dos biosensores.

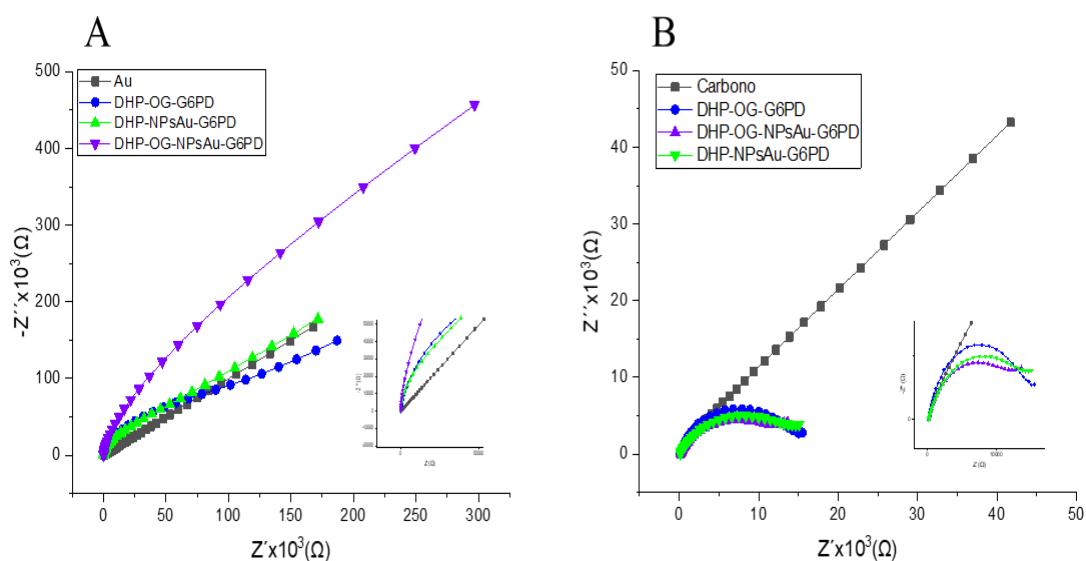


Figura 5.10. Caracterização eletroquímica por EIE dos biossensores formados sobre eletrodos de ouro (A) e carbono (B) em 5 mmol L^{-1} de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-/3-}$ /PBS $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ e $\text{pH}= 7,6$.

Na **Figura 5.10** se destaca o estudo de impedância eletroquímica onde se pode observar que para os biossensores de ouro e carbono se gerou um impedimento físico maior, que retarda a velocidade de transferência de carga até a superfície do eletrodo. Os valores de R_{tc} para cada um dos biossensores sobre ouro foram de 50×10^3 , $99,9 \times 10^3$ e $105 \times 10^3 \Omega$ com valores de porcentagem de aumento da resistividade na faixa de 183 a 580 % e para os biossensores sobre carbono valores de R_{tc} de $12,2 \times 10^3$, $14,2 \times 10^3$ e $14,5 \times 10^3 \Omega$ e porcentagem de aumento de resistividade na faixa de 58 a 219 %, segundo a ordem mostrada na **Figura 5.10**. Os resultados corroboram o comportamento antes descrito pela técnica de VC. Na **Tabela 5.4** se resume dois dos parâmetros determinados.

Tabela 5.4. Sumário dos parâmetros de EIE estimados para os biossensores.

Eletrodo	DHP-OG-G6PD	DHP-NPsAu-G6PD	DHP-OG-NPsAu-G6PD
OCP_{Au} (V)	0,249	0,249	0,249
Rts_{Au} (Ω)	105×10^3	$99,9 \times 10^3$	50×10^3
OCP_{Carb} (V)	0,249	0,248	0,248
Rts_{Carb} (Ω)	$14,5 \times 10^3$	$14,2 \times 10^3$	$12,2 \times 10^3$

5.2. Caracterização Morfológica e Estrutural dos Biossensores

5.2.1. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Na **Figura 5.11 (A-H)** são mostradas as micrografias dos diferentes componentes do compósito (G6PD, OG, DHP, NPsAu) assim como a misturas deles, mostrando as mudanças morfológicas superficiais. A imagem de MEV correspondente a enzima G6PD (**Figura 5.11 A**) mostrou a presença de uma superfície não uniforme, com irregularidades com tendência à formação de figuras com características circulares o que não descarta a presença de traços retos, situação que pode contribuir a rugosidade mostrada na mistura (**Figura 5.11 E**), onde a amostra não apresenta poros e nenhuma formação de agregados. Por outro lado, o OG representado pela **Figura 5.11 B** apresenta um aspecto semelhante ao de uma folha de papel amassada com rugas e dobras na superfície. Esta aparência sugere que às interações entre os grupos funcionais oxigenados presentes entre as camadas e nas bordas (ANDRADE, 2019). Por outro lado, na **Figura 5.11 C** é observado o DHP como descrito na literatura, após a evaporação do solvente onde é, observada a automontagem de filmes de múltiplas camadas, semelhantes a biomembranas, formando um filme estável na superfície do eletrodo, provavelmente devido as ligações de hidrogênio (JANEGITZ et al., 2015).

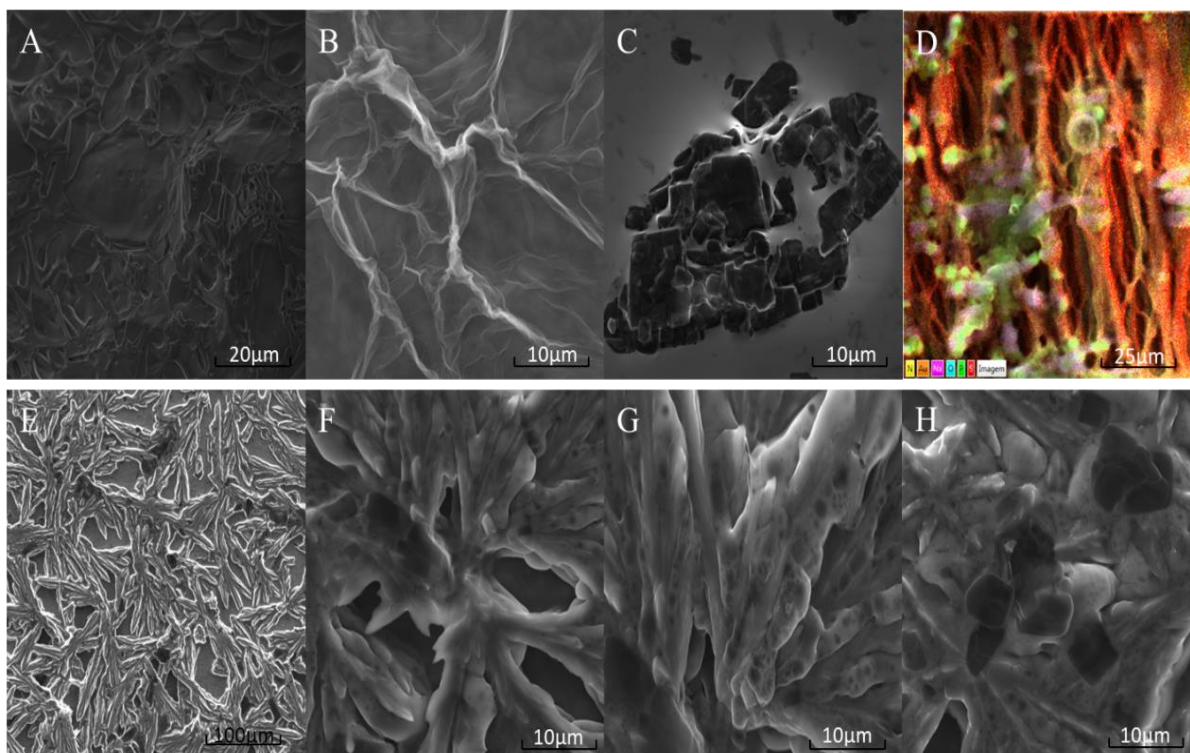


Figura 5.11. Imagens de MEV da G6PD (A), OG (B), DHP (C), EDS (D), DHP-OG-NPsAu-G6PD (E-H).

Nas imagens da **Figura 5.11 (E-H)** não são possíveis distinguir as nanopartículas de ouro, mas destaca-se a mistura dos componentes anteriores, distribuídos de maneira não uniforme sobre a superfície. As estruturas principais mostradas nas figuras têm formas ramificadas e longas, questão poderia estar atribuída à presença de OG devido a seu tipo de estrutura de folhas e as características antes descritas da G6PD, assim como também se observa materiais particulados e laminados atribuídos a OG e DHP. A **Figura 5.11 D** representa distribuição dos elementos químicos encontrados na amostra, correspondendo às cores a: amarelo (N), laranja (Au), violeta (Na), azul (O), verde (P) e vermelho (S).

5.2.2. Ângulo de Contato

Com o objetivo de mostrar as afetações sobre a superfície dos eletrodos de ouro e carbono foram realizados os experimentos de molhabilidade. Na **Tabela 5.5** são mostrados os resultados de molhabilidade (água) referido aos eletrodos de ouro e carbono e suas modificações, comparando entre si. Os eletrodos de ouro e carbono não modificados possuem característica predominantemente hidrofílica com ângulo de contato de 41,65 e 49,69°,

respetivamente. Essas mesmas características hidrofílicas são mantidas quando sobre eles é colocada uma gota do polímero DHP variando esses ângulos para 30,13 e 19,83°, destacando suas características tensoativas e a afinidade de ser muito mais adsorvido pela superfície de carbono.

Tabela 5.5. Valores de ângulo de contato para os eletrodos modificados.

Eletrodo	Au	Au-DHP	DHP	DHP-OG-G6PD	DHP-NPsAu-G6PD	DHP-OG-NPsAu-G6PD
Ângulo de contato	41,65	30,13	27,59	53,47	56,05	54,31
Eletrodos	Carb	Carb-DHP	DHP	DHP-OG-G6PD	DHP-NPsAu-G6PD	DHP-OG-NPsAu-G6PD
Ângulo de contato	49,69	19,83	35,06	24,84	36,22	34,4

A incorporação de nanoestruturas de ouro, óxido de grafeno e biomolécula na matriz polimérica de DHP promovem uma modificação superficial significativa referido ao substrato ouro com aumento do ângulo de 53,47 a 56,05°, porém ainda com características hidrofílicas de destaque. Já para o substrato carbono essas características hidrofílicas melhoram e os valores mostrados na tabela se encontram entre de 24,84 a 36,22° bem menores como mostrado na **Figura 5.12 (G-L)**.

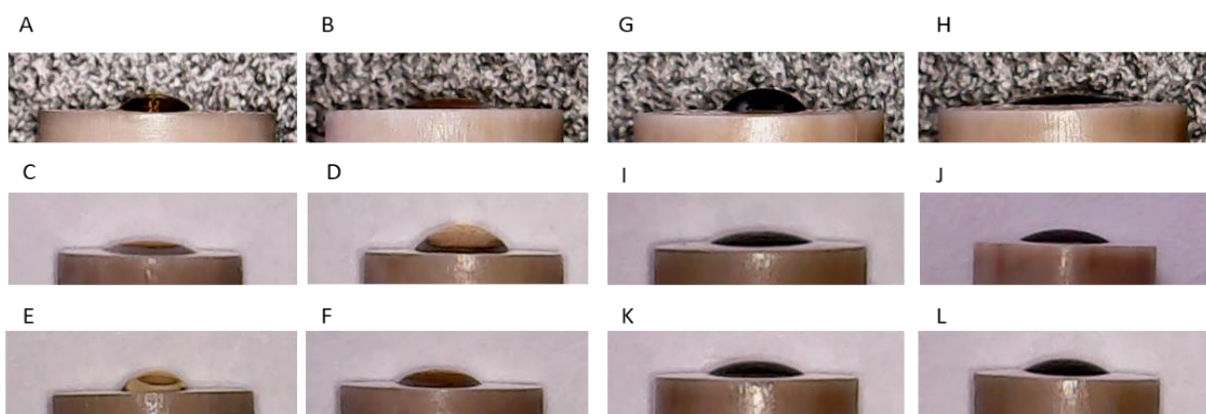


Figura 5.12. Ângulos de contato dos eletrodos de ouro, carbono e biosensores: A-Au, B-Au+ DHP, C-Au-DHP, D- Au-DHP-OG-G6PD, E- Au-DHP-NPsAu-G6PD, F- Au-DHP-OG-NPsAu-G6PD, a mesma descrição para o eletrodo de carbono tendo em conta as letras subsequentes.

O grau de molhabilidade da superfície dos eletrodos modificados com nanocompósitos poliméricos pode ser explicado pela tensão superficial devido à incorporação de grupos hidroxilas, $-OH$, $COOH$, $-O-$, vacâncias presente na superfície das nanoestruturas de ouro assim como determinadas interações eletrostáticas presentes na enzima que poderiam favorecer esse fato. O aumento dos ângulos de contato no eletrodo de ouro guarda estreita relação com a sua superfície que apresenta menos porosidade que a do carbono sendo a molécula polimérica menos adsorvida. Pode-se observar que as ordens dos ângulos de contato para um mesmo eletrodo estão relativamente próximo um do outro pelo que conseqüentemente, se apresenta uma energia superficial semelhante, corroborado com os resultados das áreas eletroativas determinadas para cada substrato tendo em conta as modificações compósitas como observado na tabela anterior.

5.2.3. Espectroscopia Infravermelha com Transformada Fourier- FTIR

Na **Figura 5.13** são mostrados os espectros de **FTIR-ATR** das amostras Glicose-6-Fosfato desidrogenase (G6PD), óxido de grafeno (OG) e Dihexadecil fosfato (DHP), identificando-se as bandas principais conseguidas mediante a análise.

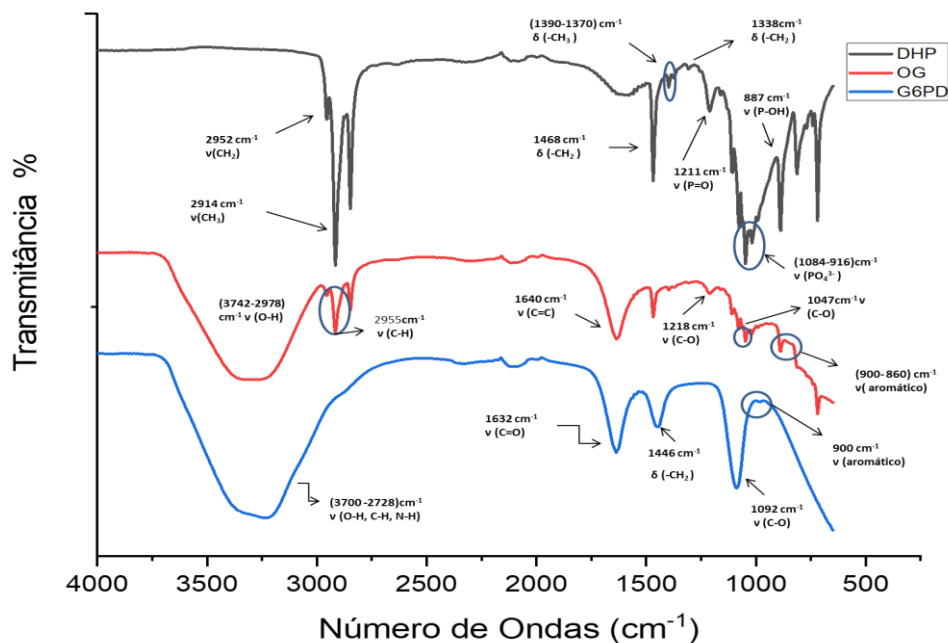


Figura 5.13. Espectros de FTIR-ATR para as amostras G6PD (azul), OG (vermelho) e DHP (preto).

Para a enzima G6PD foram identificadas no espectro na região de 3700 a 2728 cm^{-1} bandas relacionadas com os modos vibracionais de deformação axial dos grupos $\nu(\text{O-H}$, C-H e N-H), banda entorno a 1632 cm^{-1} característicos de vibração de estiramento de $\nu(\text{C=O})$ de amidas. Na região de 1760-1710 cm^{-1} poderiam se localizar $\nu(\text{C=O})$ relacionados com grupos carboxílicos presentes nos aminoácidos que formam a proteína. Na região de 1446 cm^{-1} uma banda relacionada com a deformação angular dos grupos $\delta(\text{CH}_2)$. A banda em 1092 cm^{-1} aproximadamente está relacionada com modos vibracionais de $\nu(\text{C-O})$ de grupos fenólicos e os sinais perto de 900 cm^{-1} relacionado com anel aromático.

A presença do óxido de grafeno foi identificada mediante o reconhecimento das seguintes bandas: 3742-2978 cm^{-1} que pode ser atribuído às vibrações do grupo hidroxila $\nu(\text{OH})$, banda próximo em 1640 cm^{-1} $\nu(\text{C=C})$ aromático, banda perto 1218 cm^{-1} relacionado com estiramento de $\nu(\text{C-O})$ de grupo epóxi, banda relacionada com grupos alcoxi perto de 1047 cm^{-1} , modos vibracionais de $\nu(\text{CH})$ aromáticos em 2847 cm^{-1} e na região de 900-860 cm^{-1} presença de anel aromático (CHEN et al., 2013; LI & YANG, 2014).

As bandas relacionadas com DHP foram: na região (2960-2850) cm^{-1} relacionados modos vibracionais do $\nu(\text{CH}_3)$ e $\nu(\text{CH}_2)$, as bandas na região (1468- 1338) cm^{-1} são referente à deformação angular dos grupos $\delta(\text{CH}_3, \text{CH}_2$ e $\text{CH})$, na região de 1211 cm^{-1} banda atribuída ao estiramento $\nu(\text{P}=\text{O})$, (MIELOCH et al., 2020), na região de 1084-916 cm^{-1} localizado modos vibracionais relacionados com estiramento assimétrico do grupo $\nu(\text{PO}_4)$ e 870 cm^{-1} relacionado com vibrações de alongamento de $\nu(\text{P-OH})$, (FOWLER et al, 1993; WLADYMYR et al., 2013).

5.2.4. Espectroscopia no UV-VIS das NPsAu

Na **Figura 5.14** é mostrado o espectro de absorbância correspondente à identificação das NPsAu nas amostras compósito em estudo. As NPsAu se caracterizam por apresentar oscilação eletrônica em ressonância com a frequência da radiação incidente, denominadas superfície de plasmon ressonante que depende, sobretudo, da morfologia e dimensão das NPs (SOARES, 2016). A **Figura 5.14** mostra a banda de absorção máxima entre 500-540 nm e é típica de NPsAu, coincidindo com a literatura (SILVA, 2015).

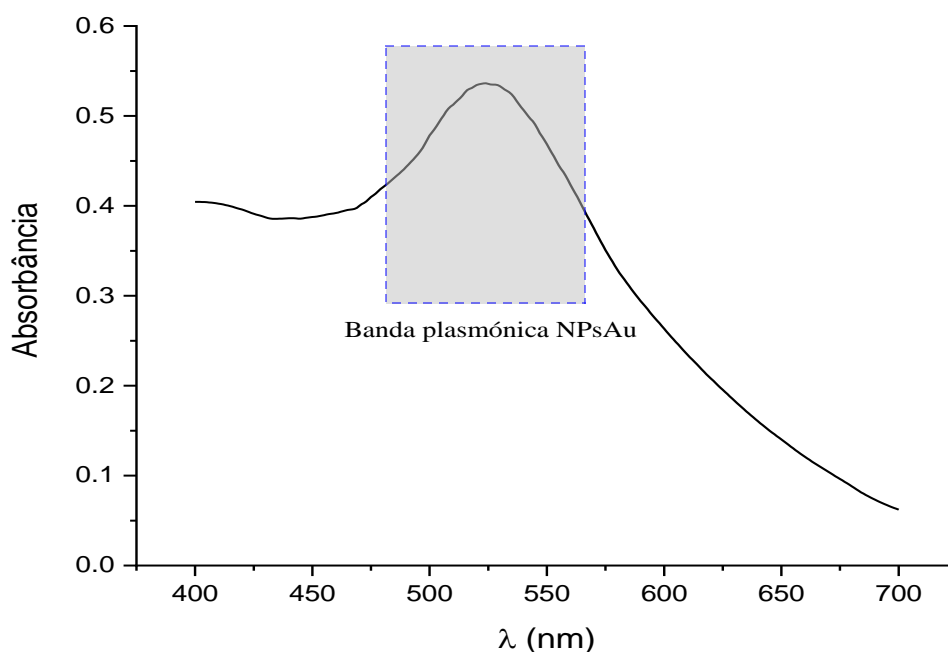


Figura 5.14. Espectro de absorção no UV-Vis das Nanopartículas de ouro.

5.2.4.1. Determinação da Atividade de Glicose-6-Fosfato Desidrogenase

Com intuito de avaliar a atividade enzimática da G6PD e definir o tempo de reação enzimática nas condições de desenvolvimento do biossensor, foram realizadas as medidas em triplicata da amostra: 4 μL da enzima em estudo, 20 μL (G6P), 15 μL (NAD^+), 10 μL (MgCl_2) e completou-se até 2 ml com solução PBS 0,1 mol L^{-1} pH 7,6. A leitura de absorbância foi realizada nos tempos (0, 1, 5, 10, 20, 30, 40, 50 e 60) minutos a 340 nm a temperatura ambiente. Uma unidade de atividade por mililitro (U mL^{-1}) é definida como a quantidade de enzima que causa o aumento de 0,001 unidades de absorbância por minuto (FATIBELLO-FILHO & VIEIRA, 2002; VIEIRA et al., 2003). Os resultados podem ser observados na **Figura 5.15**.

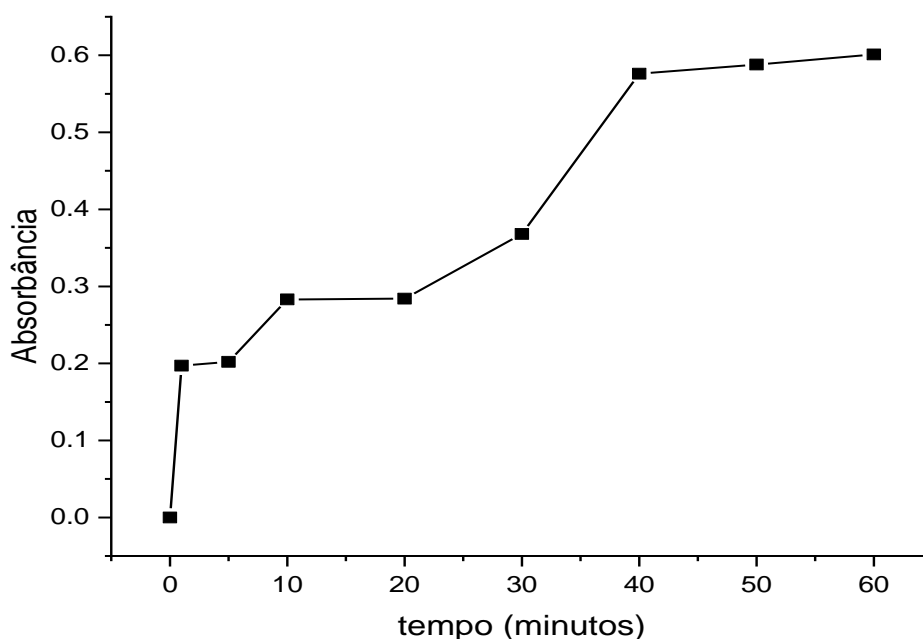


Figura 5.15. Medida da atividade enzimática (G6PD) mediante a redução do cofator NAD^+/NADH .

O aumento dos valores de absorbâncias obtidos indicou que com o aumento do tempo a formação de NADH aumenta o que confere atividade catalítica. Nos últimos pontos da curva é mostrado, como a diferença entre os valores de absorbância diminui devido à diminuição das moléculas NAD^+ . Para este trabalho o tempo de 30 minutos foi selecionado como tempo da reação enzimática, devido a que tempo superiores a esse valor resultam pouco

atrativos já que muitos dos métodos de detecção da atividade da G6PD usados estão na faixa de 10 a 30 minutos. Sendo assim a pesquisa tratou de se aproximar a isso tempos.

5.2.5. Otimização dos Parâmetros Voltamétricos do Biossensor Enzimático

Antes da construção das curvas analíticas para NAD^+ , realizou-se a otimização dos parâmetros da DPV e SWV em meio de tampão fosfato pH= 7,6 para os biossensores sobre carbono e ouro, respectivamente. Investigou-se para DPV, o tempo de modulação no intervalo de 0,01 a 0,05 s sendo 0,02 s como valor otimizado, amplitude 25 a 150 mV sendo 25 mV o valor selecionado e $\Delta E= 2,5$ a 100 mV, exibindo 5 mV como o valor de melhor resultados, entretanto para SWV foram investigados a frequência 10 a 91 Hz, a amplitude 10 a 100 mV e o step 1 a 7 mV, sendo os valores selecionados 25 Hz, 20 e 5 mV respectivamente. A resposta foi avaliada tendo em conta os valores de intensidade de corrente e perfil gráfico do voltamograma **Figura 5.16** e **5.17**, com adição de 20 μL (G6P), 20 μL (NAD^+), 10 μL (MgCl_2) em solução PBS 0,1 mol L^{-1} e pH= 7,6.

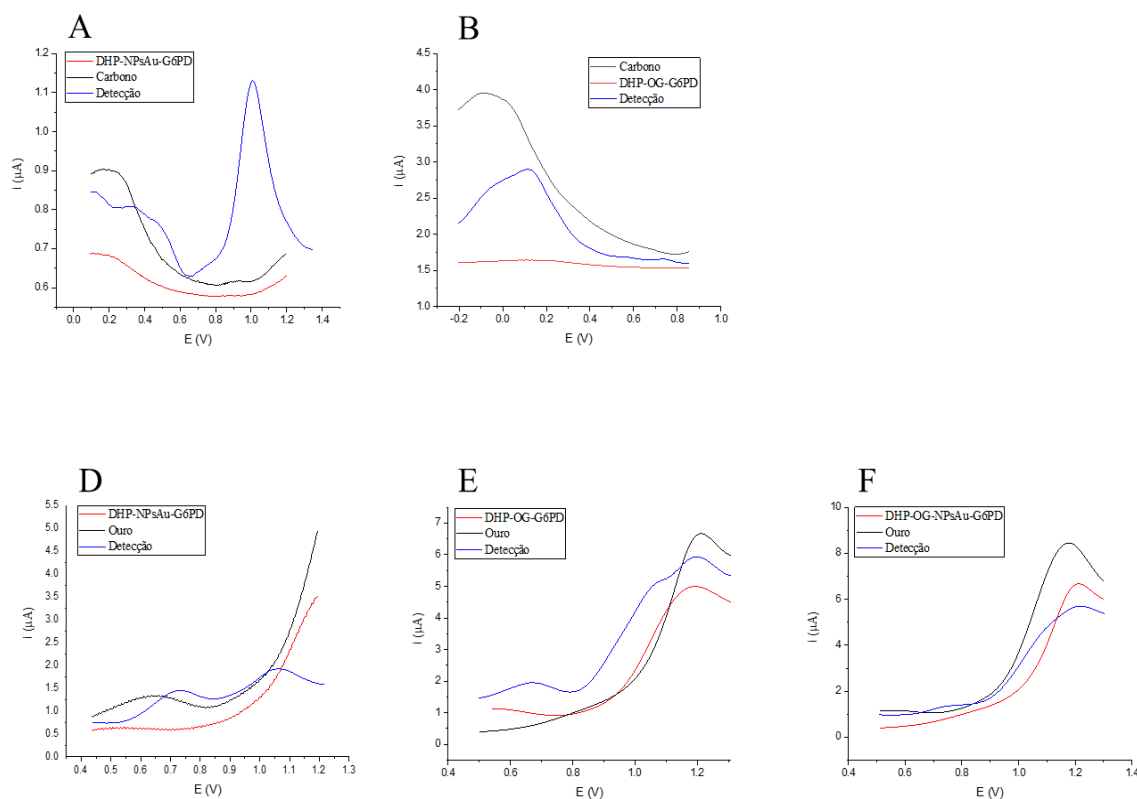


Figura 5.16. DPV e SWV dos eletrodos de trabalho, biossensores e processo de detecção dos biossensores. DPV de A, B- sobre eletrodos de carbono e SWV de D, E, F- sobre eletrodos de ouro, em PBS 0,1 mol L^{-1} e pH= 7,6.

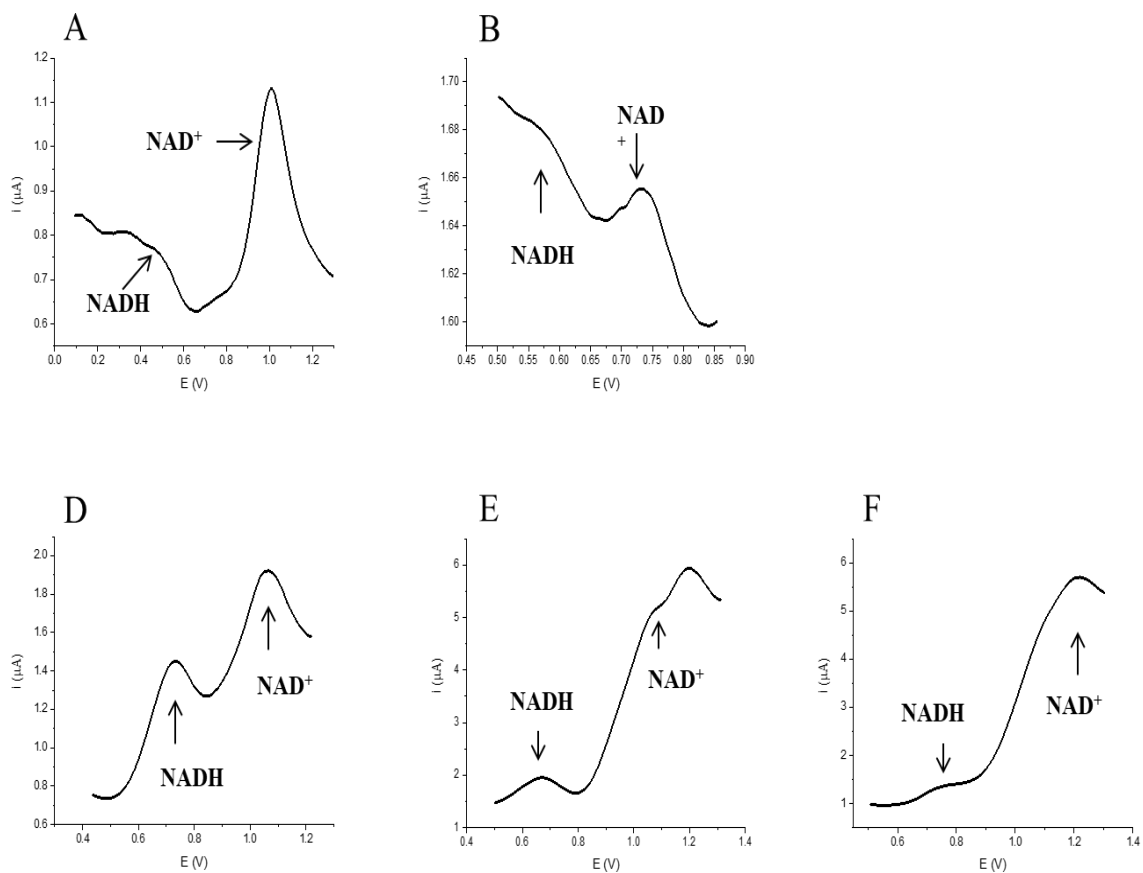


Figura 5.17. DPV e SWV dos processos de detecção dos biossensores relacionados com a **Figura 5.19** em PBS 0,1 mol L⁻¹ e pH= 7,6

A **Figura 5.16** (A, B, D, E e F) mostra a comparação da detecção dos biossensores com os perfis dos eletrodos de trabalho e os perfis das modificações sobre as suas superfícies, mostrando os picos de corrente do processo de oxidação e redução da molécula NAD⁺/NADH. A formação de NADH é um indicador de atividade enzimática, conforme mostrado nos voltamogramas da **Figura 5.17** foram identificados os picos de corrente na ordem de microampere correspondentes ao NAD⁺/ NADH nas faixas de potenciais (0,7- 1,3) / (0,25- 0,65), (0,67-0,83) / (0,51- 0,65) V para os biossensores sobre carbono e para os biossensores sobre ouro nas faixas (0,82- 1,2) / (0,5- 0,8), (0,81-1,1) / (0,5- 0,8), (0,9-1,1) / (0,6- 0,85) V. O incremento da corrente de redução está relacionado com a maior formação de NADH, que a sua vez apresenta estreita relação como a maior quantidade de centros ativos da enzima disponível para acelerar a oxidação de molécula G6P substrato da reação enzimática.

5.2.6. Influência do pH do Eletrólito Suporte sobre a Atividade da G6PD

Os resultados do estudo do efeito do pH do meio sobre a resposta dos dispositivos são mostrados na **Figura 5.18**. Os experimentos foram realizados para 20 μL (NAD^+) de $3 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ como solução padrão em PBS $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ e $\text{pH} = 7,6$.

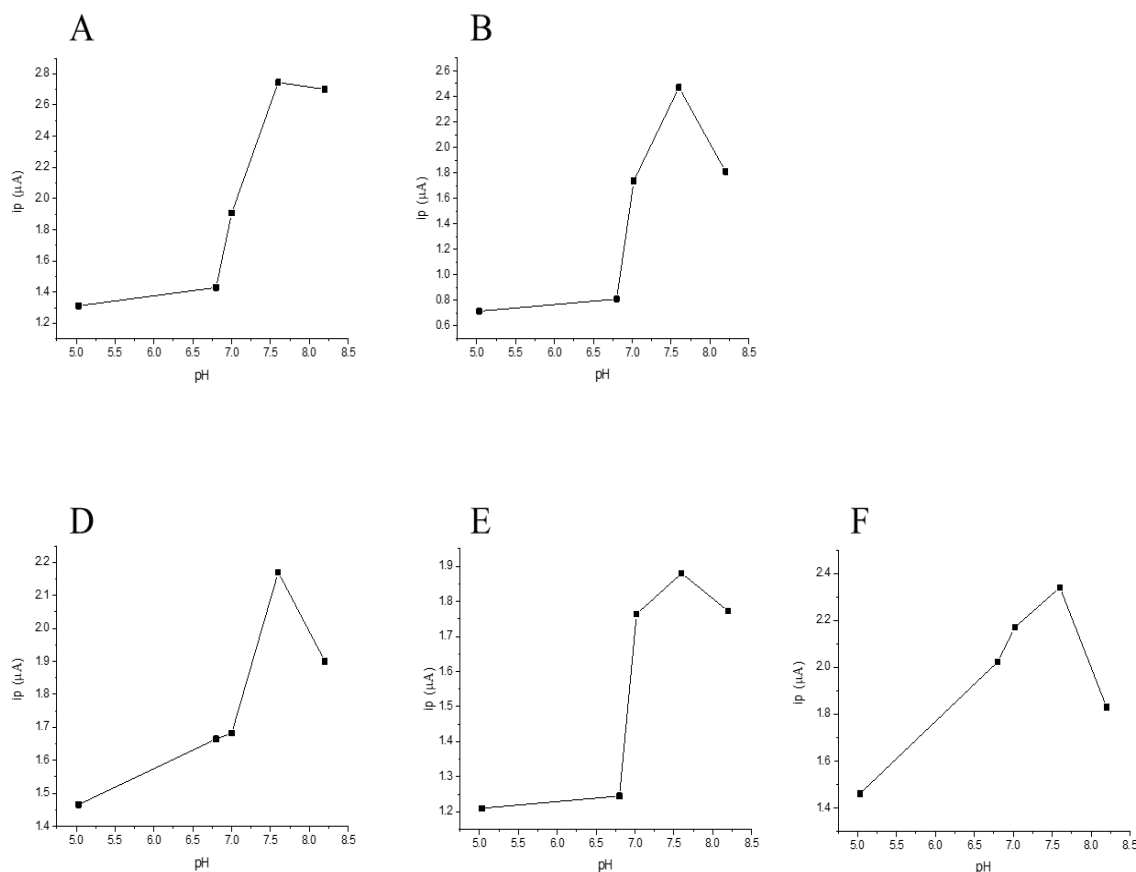


Figura 5.18. Estudo da influência do pH a partir das respostas dos biossensores durante a detecção com a adição de 20 μL NAD^+ de $3 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ em PBS $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ e $\text{pH} = 7,6$. A (EBC-DHP-NPsAu-G6PD), B (EBC-DHP-OG-G6PD), D (EBAu-DHP-NPsAu-G6PD), E (EBAu-DHP-OG-G6PD) e F (EBAu-DHP-OG-NPsAu-G6PD).

Os resultados do estudo mostrados na **Figura 5.18** demonstram que existe atividade enzimática mostrada para cada valor de pH em estudo, porém os melhores resultados de sinal de corrente de pico foram alcançados para $\text{pH} = 7,6$ em todos os biossensores, tendo esses resultados comportamento similar aos reportados na literatura. A reação enzimática é favorecida segundo literatura em pH próximos 7,8, pelo que esse valor de $\text{pH} = 8,2$ poderia ser estudado com posterioridade já que mostrou valores de pico de corrente

de redução consideráveis (ISHAQUE et al., 1974; OLIVE & LEVY, 1975; ROWLAND et al., 1994).

5.2.7. Construção da Curva Analítica para NAD^+

Na **Figura 5.19** são mostradas as curvas analíticas construída empregando o método de adição de padrão, por adições de alíquotas de 5 a 40 μL de NAD^+ de $3 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ à célula eletroquímica, com agitação por 2 segundos e tempo de incubação para a reação de catálise enzimática de 30 minutos. Realizou-se as leituras mediante o uso das técnicas DPV e SWV para os biossensores sobre carbono e ouro, respectivamente, em PBS $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ e $\text{pH} = 7,6$.

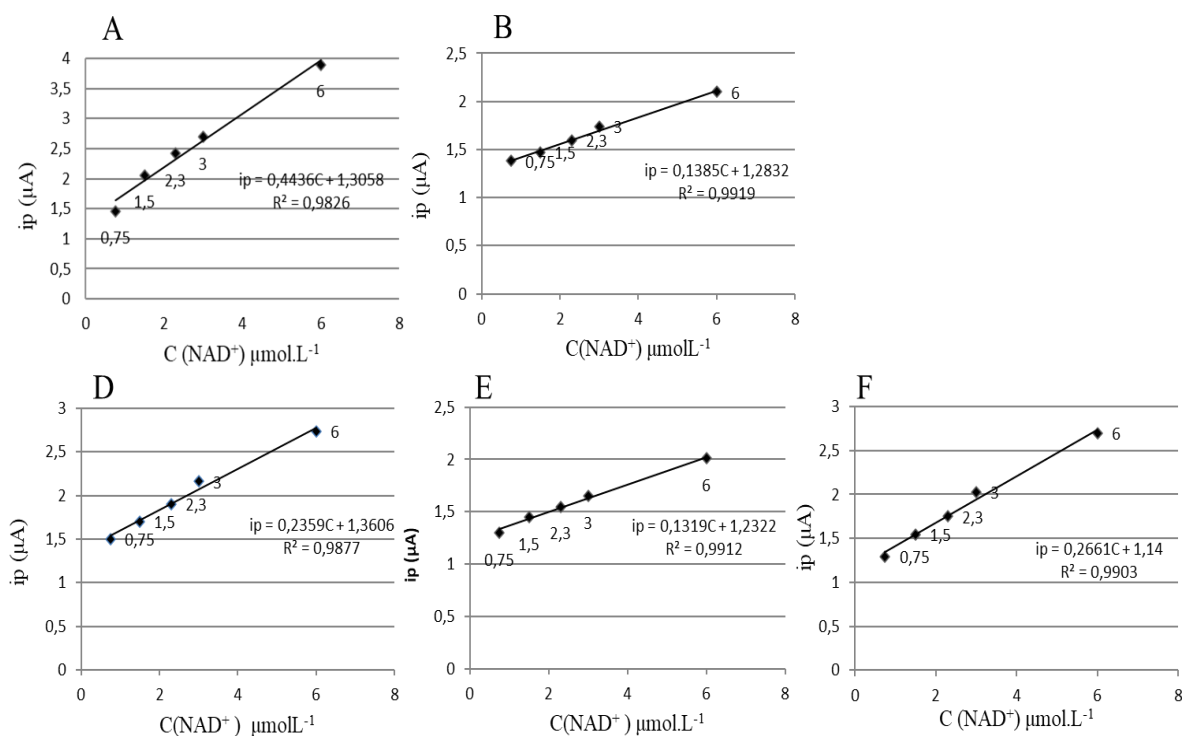


Figura 5.19. Curvas analíticas a partir das respostas dos biossensores durante a detecção a diferentes concentrações de NAD^+ de 0,75 a 6 $\mu\text{mol L}^{-1}$ / PBS $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ e $\text{pH} = 7,6$. A- (EBC-DHP-NPsAu-G6PD), B- (EBC-DHP-OG-G6PD), D- (EBAu-DHP-NPsAu-G6PD), E- (EBAu-DHP-OG-G6PD) e F- (EBAu-DHP-OG-NPsAu-G6PD).

A **Figura 5.19 (A, B) e (D, E, F)** correspondem os biossensores sobre carbono e ouro, respetivamente. A figura mostra que existe uma correlação linear entre os valores de pico de corrente relacionados com a resposta do biossensor e os valores de concentração do

cofator na solução. Essa linearidade é evidenciada pelas equações da reta e valores os coeficientes de correlação mostrados na figura e apresentados na **Tabela 5.6** junto aos LD e LQ. Os limites foram determinados para cada biossensor tendo em conta a relação sinal/ruídos em amostras brancos (ausência de NAD^+).

Tabela 5.6. Resumo da correlação das curvas analíticas e os LD e LQ.

Eletrodos	Parâmetros	DHP-NPsAu-G6PD	DHP-OG-G6PD	DHP-OG-NPsAu-G6PD
Carbono	Equação	$i = 0,44C + 1,31$	$i = 0,14C + 1,28$	
	R^2 (%)	98,3	99,2	
	LD (mol L^{-1})	$1,17 \times 10^{-6}$	$1,74 \times 10^{-6}$	
	LQ (mol L^{-1})	$1,20 \times 10^{-6}$	$2,21 \times 10^{-6}$	
Ouro	Equação	$i = 0,24C + 1,36$	$i = 0,13C + 1,23$	$i = 0,27C + 1,14$
	R^2 (%)	98,8	99,1	99,0
	LD (mol L^{-1})	$1,1 \times 10^{-6}$	$1,43 \times 10^{-6}$	$1,81 \times 10^{-6}$
	LQ (mol L^{-1})	$1,9 \times 10^{-6}$	$2,68 \times 10^{-6}$	$2,19 \times 10^{-6}$

5.2.8. Estabilidade do Biossensor

Os ensaios de estabilidade dos biossensores foram realizados pela análise dos valores de corrente da resposta dos biossensores após período de armazenamento usando a solução PBS $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ e $\text{pH} = 7,6$ para realizar as medições, resultados mostrados na **Figura 5.20**.

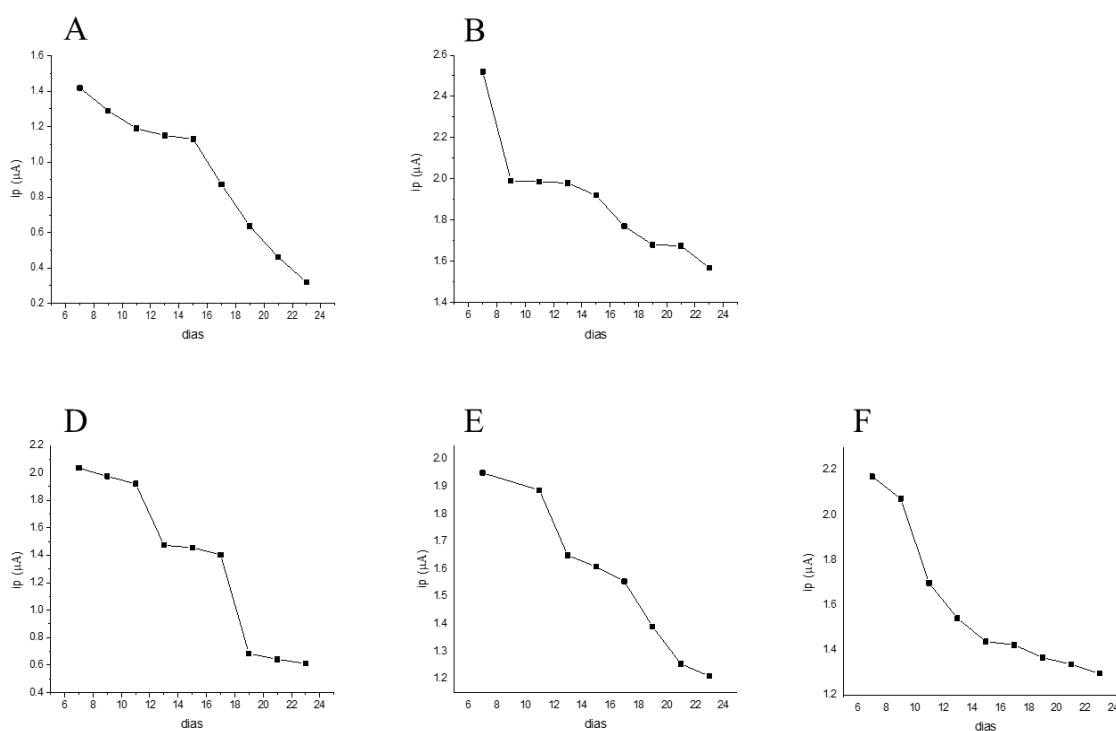


Figura 5.20. Estudo de estabilidade dos dispositivos depois de um período de armazenamento. Resposta à adição de 20 μL NAD^+ de 3×10^{-4} mol L^{-1} em PBS 0,1 mol L^{-1} , pH= 7,6. A (EBC-DHP-NPsAu-G6PD), B (EBC-DHP-OG-G6PD), D (EBAu-DHP-NPsAu-G6PD), E (EBAu-DHP-OG-G6PD) e F (EBAu-DHP-OG-NPsAu-G6PD).

Os resultados **Figura 5.20** indicaram que após 7 dias de armazenamento as respostas dos biossensores apresentam tendência a decrescer gradualmente com o tempo, sendo muito mais considerável essa perda de atividade da G6PD após 23 dias. Os biossensores de carbono perdem entre 36,5- 92 % e os de ouro entre 40- 71,8 %, sendo os mais afetados os que apresentam a modificação DHP-NPsAu-G6PD. Estudos apresentados na literatura mostraram ensaios de estabilidade de biossensores baseados em G6PD no intervalo de 5 a 20 dias, com perda significativa da atividade enzimática (BASSI et al., 1999; CUI et al., 2006).

6. CONCLUSÕES

No presente trabalho foram desenvolvidos cinco dispositivos com o objetivo de determinar a atividade enzimática da G6PD. Para desenvolvimento do mesmo foram caracterizados eletroquimicamente (VC e EIE), os eletrodos de trabalho de ouro e carbono assim como as modificações sobre as suas superfícies.

Empregando o método de encapsulamento, a G6PD foi adequadamente imobilizada em DHP sobre os eletrodos de ouro e carbono modificado formando filmes finos com diferentes variantes de compósitos sobre as superfícies de eletrodos de ouro e carbono dispostos da seguinte forma: DHP-NPsAu-G6PD, DHP-OG-G6PD, DHP-OG-NPsAu-G6PD. O processo de imobilização foi caracterizado eletroquimicamente (VC e EIE), morfológicamente (MEV e AC) e estruturalmente (FTIR e UV-Vis).

Os dispositivos desenvolvidos foram aplicados para a determinação da atividade enzimática mediante a detecção da formação de NADH em amostras sintéticas e apresentaram excelente resposta linear entre $0,75 \times 10^{-7}$ a $6,0 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹ com R² entre 98 e 99 % nas condições 20 µL (G6P), 20 µL (NAD⁺) 10 µL (MgCl₂), 30 min de incubação em PBS 0,1 mol L⁻¹, pH= 7,6 e parâmetros otimizados das técnicas DPV e SWV.

Os valores de LD e de LQ calculados encontram-se na ordem de $1,1 \times 10^{-6}$ a $1,81 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹ e $1,20 \times 10^{-6}$ a $2,68 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹, respectivamente, sendo comparáveis com os reportados na literatura para biossensores usando a G6PD. Os estudos de influência do pH e de estabilidade após período de armazenamento indicaram que a resposta do biossensor foi melhor no pH= 7,6, por apresentar os melhores valores de corrente de pico para todos os biossensores construídos e a estabilidade após seis dias de armazenamento foi decrescendo gradualmente em uns mais que outros biossensores alcançando níveis de perda da atividade da enzima de 36,5 a 92 % para os biossensores sobre carbono e os biossensores sobre ouro entre 40 a 71,84 %.

Portanto, os dispositivos eletroquímicos baseado na enzima G6PD apresentaram desempenho analítico desejado para determinação da atividade da G6PD visando a elaboração de futuro sensor amperométrico para a detecção do déficit enzimático da G6PD, exibindo

fácil construção, sensibilidade satisfatória, faixa de trabalho adequada e estabilidade. Os novos dispositivos têm a cobertura futura de ser usados para análises de G6P em diferentes amostras biológicas.

7. PERSPECTIVAS FUTURAS

De modo geral, muito estudo ainda pode ser realizado para otimizar os parâmetros dos biossensores propostos, garantindo o melhor desempenho dos mesmos nas medidas de atividade enzimática.

Terminar os estudos de:

- Concentração da enzima G6PD,
- Temperatura visando o melhor desempenho da G6PD,
- Com diferentes tampões a diferentes concentrações
- PBS 0,1 mol L⁻¹ e pH= 7,6/ KCl 0,2 mol L⁻¹
- Interferentes

Realizar os trabalhos de

- Validação do método proposto
- Fabricação dos biossensores amperométricos
- Estudo comparativo dos biossensores usando NAD⁺ e NADP⁺
- Determinação de custo dos biossensores
- Estudo de factibilidade económica dos biossensores
- Aplicação dos biossensores em amostras biológicas

8. BIBLIOGRAFIA

- ALONSO, N.; LÓPEZ-GALLEGO, F.; BETANCOR, L.; HIDALGO, A.; MATEO, C.; GUIBAN, J. M.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Immobilization and stabilization of glutaryl acylase on aminated sephabeads supports by the glutaraldehyde crosslinking method. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 35, n. 1–3, p. 57–61, 2005.
- ALTIKAT, S.; CIFTCI, M.; SUYUKOKUROGLU, M. In vitro effects of some anesthetic drugs on enzymatic activity of human red blood cell glucose-6-phosphate dehydrogenase. *Journal of enzyme inhibition and medical Chemistry*, v. 54, n. 1, p. 67–71, 2001.
- ARDILA, J. A.; OLIVEIRA, G. G.; MEDEIROS, R. A.; FATIBELLO-FILHO, O. Square-wave adsorptive stripping voltammetric determination of nanomolar levels of bezafibrate using a glassy carbon electrode modified with multi-walled carbon nanotubes within a dihexadecyl hydrogen phosphate film. *Analyst*, v. 139, p. 1762–1768, 2014.
- ARTIMO, P.; JONNALAGEDDA, M.; ARNOLD, K.; BARATIN, D.; CSARDI, G.; DE CASTRO, E.; DUVAUD, S.; FLEGEL, V.; FORTIER, A.; GASTEIGER, E.; GROSDIDIER, A.; HERNANDEZ, C.; IOANNIDIS, V.; KUZNETSOV, D.; LIECHTL, R.; MORETTI, S.; MOSTAGUIR, K.; REDASCHI, N.; ROSSIER, G.; XENARIOS, I.; STOCKINGER, H. **Expasy**. Disponível em: <<http://www.expasy.ch/enzyme>>, acessado em: 26 de fevereiro de 2020.
- ARYA, S.; SINGH, S.; MALHOTRA, B. *Electrochemical Techniques in Biosensors. Handbook of biosensor and biochips*. 1. ed. Ed. John Wiley & Sons Ltd, 2008, 1000 p.
- AU, S. W.; GOVER, S.; LAM, V. M. S.; ADAMS, M. J. Human glucose-6-phosphate dehydrogenase: the crystal structure reveals a structural NADP(+) molecule and provides insights into enzyme deficiency. *Structure*, v. 8, n. 3, p. 293–303, 2000.
- BANG-CE; HONGQIONG, L.; ZHENSONG, L. Rapid detection of common Chinese glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) mutations by microarray-based assay. *American Journal Hematology*, v. 76, p. 405–412, 2004.
- BASSI, A.; TANG, D.; SERGOUGNOU, M. Mediated, amperometric biosensor for glucose-6-phosphate monitoring based on entrapped glucose-6-phosphate dehydrogenase, Mg²⁺ ions, tetracyanoquinodimethane, and nicotinamide adenine dinucleotide phosphate in carbon paste. *Analytical Biochemistry*, v. 268, n. 2, p. 223–228, 1999.

--BRÁS, D. F. R. A deficiência na enzima Glicose-6-Fosfato Desidrogenase - Sensibilidade a fármacos. Dissertação de mestrado, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade do Algarve (UAlg), 2017

BERNSTEIN, R. E. A rapid screening dye test for the detection of glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency in red cells. *Nature*, v. 194, p. 192–193, 1962.

BETANCOR, L.; LOPÉZ-GALLEGO, F.; HIDALGO, A.; FUENTES, M.; PODRASKY, O.; KUNCOVA, D.; GUISÁN, J. M.; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R. Advantages of the pre-immobilization of enzymes on porous supports for their entrapment in sol-gels. *Biomacromolecules*, v. 6, p. 1027–1030, 2005.

BETKE, K.; BREWER, G. J.; KIRKMAN, H. N.; LUZZATO, L.; MOTULSKY, A. G.; RAMOT, B.; SINISCALCO, M. Standardization of procedures for the study of glucose-6-phosphate dehydrogenase. Report No.366 of a WHO Scientific Group, p. 1–56, 1967.

BEUTLER, E. G6PD Deficiency. *The American Society of Hematology.*, v. 84, n. 11, p. 3613–3636, 1994.

BEUTLER, E.; YEH, M.; FAIRBANKS, V. The normal human female as a mosaic of X-chromosome activity: Studies using the gene for G6PD deficiency as a marker. *Obstetrical and Gynecological Survey*, v. 48, p. 9–16, 1962.

BEUTLER, E.; YOSHIDA, A. Genetic variation of glucose-6-phosphate dehydrogenase: a catalog and future prospects. *Medicine*, v. 67, p. 311--334, 1988.

BIELLMANN, J.; LAPINTE, C.; HAID, E.; WEIMANN, G. Structure of lactate dehydrogenase inhibitor generated from coenzyme. *Biochemistry*, v. 18, n. 7, p. 1212–1217, 1979.

BOTAS, C.; ÁVAREZ, P.; BLANCO, C.; SANTAMARIA, R.; GRANDA, M.; ARES, P.; RODRÍGUEZ-REINOSO, F.; MENÉNDEZ, R. The effect of the parent graphite on the structure of graphene oxide. *Carbon*, v. 50, n. 1, p. 275–282, 2012.

BRETT, A. M. O.; BRETT, C. M. A. *Eletroquímica: princípios, métodos e aplicações*. In: Oxford University Press. USA: Oxford University Press., v. 5, p. 236–244; 416–418, 1996.

BRETT, C. M. A.; BRETT, A. M. O. *Electroanalysis*. 1. ed. USA, Ed. Oxford University Press, 1998.

BUCHACHART, K. Effect of primaquine standard dose (15mg/day for 14 days) in the treatment of vivax patients in Thailand. *Southeast Asian Journal Tropical Medicine and Public Health*, v. 32, n. 4, p. 720–726, 2001.

BUZEA, C.; PACHECO, I.; ROBBIE, K. Nanomaterials and nanoparticles: sources and

toxicity. *Biointerphases*, v. 2, n. 4, 2007.

CALIL, S. S.; QUEIROZ, P. S. *Biossensores: estrutura, funcionamento e aplicabilidade*. 6a Mostra de Produção Científica Da Pós-Graduação Lato Sensu Da PUC Goiás, p. 20, 2011.

CALLISTER, W. D. *Materials science and engineering: An introduction*. 5. ed. New York: John Wiley & Sons, 2000.

CARLOS, J. M. O. *Imunossensores amperométricos label-free para a detecção de biomarcadores da Malaria*. Dissertação de mestrado, Programa de Pós-Graduação em Química, Universidade Federal do Amazonas (UFAM), Brasil, 2017.

CARSON, P.; FLANAGAN, P. C.; ICKES, E. C.; ALVING, S. A. Enzymatic deficiency in primaquine-sensitive erythrocytes. *Science*, v. 124, n. 3220, p. 484–485, 1956.

CHAMBER, J. P.; ARULANANDAM, B. P.; MATTA, L. L.; WEIS, A.; VALDES, J. J. Biosensor Recognition Elements. *Current Issues in Molecular Biology*, v. 10, p. 1–12, 2008.

CHAMPLUVIER, B.; KULA, M. . Dye-ligand membranes as selective adsorbents for rapid purification of enzymes: a case study. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 40, p. 33–40, 1992.

CHANG, Y.; CHASE, H. Ion exchange purification of G6PDH from unclarified yeast cell homogenates using expanded bed adsorption. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 49, n. 2, p. 204–16, 1996.

CHANG, Y.; MCCREATH, G.; CHASE, H. Development of an expanded bed technique for an affinity purification of G6PDH from unclarified yeast cell homogenates. *Biotechnology and Bioengineering*, v. 48, p. 355–366, 1995.

CHATEL, S.; VOIRIN, A.; LUCIANI, A.; ARTAUD, J. Starch Identification and Determination in Sweetened Fruit Preparations. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 44, n. 2, p. 502–506, 1996.

CHEN, J.; YAO, B.; LI, CH.; SHI, G. An improved Hummers method for eco-friendly synthesis of graphene oxide. *Carbon*, v. 64, p. 225–229, 2013.

CHIM, C.; LAM, C.; CHAN, T. Hemiphost cell in acute hepatitis A: glucose-6-phosphate deficiency revisited. *American Journal of Medicine*, v. 111, p. 81, 2001.

CISZEWSKI, M.; MIANOWSKI, A. Capacitive behavior of highly-oxidized graphite. *Materials Science-Poland*, v. 32, n. 3, p. 307–314, 2014.

COBAN, T. K.; CIFTCI, M.; KUFREVIOGLU, O. I. Purification and investigation of some kinetic properties of glucose-6-phosphate dehydrogenase from parsley (*Petroselinum hortense*) leaves. *Preparative Biochemistry Biotechnology*, v. 32, n. 2, p. 173–187, 2002.

COHEN, P.; ROSEMEYER, M. A. Subunit interactions of glucose-6-phosphate dehydrogenase from human erythrocytes. *European Journal Biochemistry*, v. 8, p. 8–15, 1969.

COLE, L. E. Nanopartículas de ouro como agentes de contraste em imagens de raios-X e tomografia computadorizada. *Nanomedicine*, v. 10, n. 2, p. 321–341, 2015.

COSGROVE, M.; NAYLOR, C.; PALUDAN, S.; ADAMS, M. J.; LEVY, H. R. On the mechanism of the reaction catalyzed by glucose-6-phosphate dehydrogenase. *Biochemistry*, v. 37, p. 2759–2767, 1998.

CUI, Y.; BARFORD, J. P.; RENNEBERG, R. Amperometric Determination of Phosphoglucose mutase Activity with a Bienzyme Screen-printed Biosensor. *Analytical Biochemistry*, v. 354, n. 1, p. 162–164, 2006.

DAL BORG, P.; SILVA, R.; CAVIERES, M. Two new glucose 6 phospho-dehydrogenase mutations, G6PD Santiago and G6PD Calvo Mackenna. *Revista Chilena de Pediatría*, v. 71, p. 419–422, 2000.

DALLA-VECCHIA, R.; NASCIMENTO, M.; SOLDI, V. Aplicações sintéticas de lipase imobilizadas em polímeros. *Química Nova*, v. 27, n. 4, 2004.

DANERO, A. F. Fundamentos de Eletroquímica. São Paulo: Bliicher Ltda, 1974.

DANIEL, M. C.; ASTRUC, D. Gold Nanoparticles: Assembly, Supramolecular Chemistry, Quantum-Size-Related Properties, and Applications toward Biology, Catalysis, and Nanotechnology. *Chemical Reviews*, v. 104, n. 1, p. 293–346, 2004.

DAWSON, R. BEN. Data for biochemical research. 3rd. ed. Oxford: Oxford: Clarendon Press, 1985.

DE SOUZA, A.; POPPI, R. Experimento didático de quimiometria para análise exploratória de óleos vegetais comestíveis por espectroscopia no infravermelho médio e análise de componentes principais: um tutorial, parte I. *Química Nova*, v. 35, n. 1, p. 223–2229, 2012.

DE SOUZA, D.; MACHADO, S. A. S.; AVACA, L. A. Voltametria de onda quadrada. Primeira parte: Aspectos teóricos. *Química Nova*, v. 26, n. 1, p. 81–89, 2003.

DEDAVID, B. A.; GOMES, C. I.; MACHADO, G. Microscopia Eletrônica de Varredura - Aplicações e preparação de amostras - Materiais Poliméricos, metálicos e semicondutores. Porto Alegre: EdiPUCRS, 2007, 60 p.

DENG, P.; FENG, Y.; FEI, J. Trace determination of zirconium by adsorptive anodic stripping voltammetry of its complex with alizarin violet using a glassy carbon electrode modified with acetylene black–dihexadecyl hydrogen phosphate composite film. *Microchimica Acta*, v. 175, p. 233–240, 2011.

DREYER, D. R.; PARK, S.; BIELAWSKI, CH. W.; RUOFF, R. S. The chemistry of graphene oxide. *Chemical Society Reviews*, v. 39, n. 1, p. 228–240, 2010.

DU, C; Ren, X.; Chen, L.; Jiang, W.; He, Y.; Yang, M. Detection of the most common G6PD gene mutations in Chinese Using amplification refractory mutation system. *Human Heredity*, v. 321, p. 133–138, 1999.

DZYADEVYCH, S. V.; ARKHYPOVA, V. N.; SOLDATKIN, A. P.; EL'SKAYA, A. B.; MARTELET, C.; JAFFREZIC-RENAULT, N. Amperometric enzyme biosensors: past, present and future. *IRBM*, v. 29, n. 2–3, p. 171–180, 2008.

EDWARDS, R. S.; COLEMAN, K. S. Graphene synthesis: relationship to applications. *Nanoscale*, v. 5, n. 1, p. 38–51, 2013.

FAN, G.; HUANG, J.; FAN, X.; XIE, S.; ZHENG, Z.; CHENG, Q.; WANG, P. Enhanced oxidation and detection of toxic clenbuterol on the surface of acetylene black nanoparticle-modified electrode. v. 169, p. 102–105, 2012.

FARADAY, M. The Bakerian Lecture: Experimental Relations of Gold (and Other Metals) to Light. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London*, v. 147, p. 145–181, 1857.

FATIBELLO-FILHO, O.; VIEIRA, I. C. Uso analítico de tecidos e de extratos brutos vegetais como fonte enzimática. *Quimica Nova*, v. 25, n. 3, p. 455–464, 2002.

FAYAZFAR, H.; AFSHAR, A.; DOLATI, A.; GHALKHANI, M. Modification of well-aligned carbon nanotubes with dihexadecyl hydrogen phosphate: application to highly sensitive nanomolar detection of simvastatin. *Journal of Applied Electrochemistry*, v. 44, n.2, p. 263–277, 2014.

FERNÁNDEZ, J.; LÓPEZ, J. R.; CORREIG, X.; KATAKIS, I. Biossensores de fosfato de pasta de carbono sem reagente: estudos preliminares. *Sensors Actuators B*, v. 47, p. 13–20, 1998.

FERREIRA, M. L. Revestimentos Hidrofóbicos. Dissertação de mestrado, Programa de Pós-graduação em Engenharia de Materiais, Universidade Nova de Lisboa, Portugal, 2013.

FIGUEIREDO-FILHO, L. C. S.; SILVA, T.A.; VICENTINI, F.C.; FATIBELLO-FILHO, O. Simultaneous voltammetric determination of dopamine and epinephrine in human body fluid samples using a glassy carbon electrode modified with nickel oxide nanoparticles and carbon nanotubes within a dihexadecylphosphate film. *Analyst*, v. 139, p. 2842–2849, 2014.

FIM, F.; RADAELLI, G.; AZAMBUJA, D.; GALLAND, G. Comparação entre Nanocompósitos de Polietileno/Nanotubos de Carbono e Polietileno/Nanolâminas de Grafeno

Obtidos por Polimerização In Situ. *Polímeros Ciência e Tecnologia*, v. 24, n. 3, p. 373–380, 2014.

FOUCAULT, R.; BIRKE, R. L.; LOMBARDI, J. R. SERS of surfactants in monolayer and multibilayer forms on an electrified Ag surface. *Langmuir*, v. 19, p. 8818–8827, 2003.

FOWLER, B. O.; MARKOVIC, M.; BROWN, W. E. Octacalcium phosphate. 3. Infrared and Raman vibrational spectra. *Chemistry of Materials*, v. 5, n. 10, p. 1417–1423, out. 1993.

FRANK, J. E. Diagnosis and Management of G6PD Deficiency. *American Family Physician*, v. 72, n. 7, p. 1277–1282, 2005.

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, p. 230–243, 2003.

FREVERT, D. V.; NARDIN, E. Arrest in the liver- A genetically Defined malaria Vaccine? *New England Journal of Medicine*, v.352, n.15, p. 1600-1602, 2005.

FREY, S.; ELLLOTT, E.; PAUSTIAN, K. Application of the hexokinase-glucose-6-phosphate dehydrogenase enzymatic assay for measurement of glucose in amended soil. *Soil Biology. Biochemistry*, v. 31, n. 6, p. 933–935, 1999.

GARCIA, L. L.; FIGUEIREDO-FILHO, L. C. S.; OLIVEIRA, G. G.; FATIBELLO-FILHO, O.; BANKS, C. E. Square-wave voltammetric determination of paraquat using a glassy carbon electrode modified with multiwalled carbon nanotubes within a dihexadecylhydrogenphosphate (DHP) film. *Sensors and Actuators, B: Quimical*, v. 181, p. 306–311, 2013.

GARRIDO, A.; GUTIÉRREZ, C. V.; GAITÁN, M. D. B.; RIVERA, J. M. T.; MENDOZA, C. *Fundamentos de Bioquímica metabólica*. 3. ed. Madrid, Ed. © 2006 Editorial Tébar, S.L, 2009, 423 p.

GHANEM, M. A.; CHRÉTIEN, J.; KILBURN, J.; BARTLETT, P. Electrochemical and solid-phase synthetic modification of glassy carbon electrodes with dihydroxybenzene compounds and the electrocatalytic oxidation of NADH. *Bioelectrochemistry*, v. 76, p. 115–125, 2009.

GODFREY, T.; WEST, S. Introduction to industrial enzymology. In: *Industrial Enzymology*, 2. ed. London, Ed. Godfrey, T. & West, S. The Macmillan Press Ltd, 1996, 609 p.

GRIESHABER, D.; MACKENZIE, R.; VÖRÖS, J.; REIMHULT, E. Electrochemical Biosensors - Sensor Principles and Architectures. *Sensors*, v. 8, p. 1400–1458, 2008.

GUILLÉN, M. M. Caracterización, inmovilización y aplicación en biocatálisis de la lipasa *Rhizopus Oryzae* expresada en *Chippia Pastori*. Tesis de doctorado, Departamento de Ingeniería Química, Universidad Autónoma de Barcelona, España, 2012.

HALL, G. *Methods of testing protein functionality*. 1. ed. London, Ed. Blackie Academic and Professional, 1996, 265p.

HANUKOGLU, I. Proteopédia: dobra de Rossmann: uma dobra beta-alfa-beta em locais de ligação de dinucleotídeos. *Biochemistry and Molecular Biology Education*, v. 43, n. 3, p. 206–209, 2015.

HU, X.; WANG, P.; YANG, J.Q.; ZHANG, B.; LI, J.; LUO, J.; WU, K.B. Enhanced electrochemical detection of erythromycin based on acetylene black nanoparticles. *Colloids Surfaces B: Biointerfaces*, v. 81, p. 27–31, 2010.

HUANG, W.; LUO, S.; ZHOU, D.; ZHANG, S.; WU, K. Electrochemical determination of resveratrol using multi-walled carbon nanotubes-modified glassy carbon electrode. *Nanoscience and Nanotechnology Letters*, v. 5, n. 3, p. 367–371, 2013.

ISHAQUE, A.; MILLHAUSEN, M.; LEVY, H. On the absence of cysteine in glucose-phosphate dehydrogenase from *Leuconostoc mesenteroides*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 59, n. 3, p. 894, 1974.

ISHIBASHI, T.; TAKIZAWA, T.; IWASAKI, H.; SAITO, T.; MATSUBARA, S.; NAKAZAWA, E.; KANAZAWA, K. Glucose-6-phosphate dehydrogenase cytochemistry using a copper ferrocyanide method and its application to rapidly frozen cells. *Histochemistry and Cell Biology*, v. 112, n. 3, p. 221–232, 1999.

JANA, N. R.; GEARHEART, L.; MURPHY, C. J. Seed-mediated growth approach for shape-controlled synthesis of spheroidal and rod-like gold nanoparticles using a surfactant template. *Advanced Materials*, v. 13, n. 18, p. 1389–1393, 2001.

JANEGITZ, B.; PAULIUKAITE, R.; GHICA, M. E.; BRETT, C. M. A.; FATIBELLO-FILHO, 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.

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 and Engineering C*, v. 37, n. 1, p. 14–19, 2014.

JANEGITZ, B. C.; BACCARIN, M.; RAYMUNDO-PEREIRA, P. A.; DOS SANTOS, F. A.; OLIVEIRA, G. G.; MACHADO, S. A.S.; LANZA, MARCOS. R.V.; FATIBELLO-FILHO,

O.; ZUCOLOTTI, VALTENCIR. The use of dihexadecylphosphate in sensing and biosensing. *Sensors and Actuators, B: Chemical*, v. 220, p. 805–813, 2015.

KASHANIAN, S.; TARIGHAT, F.A.; RAFIPOUR, R.; ABBASI-TARIGHAT, M. Biomimetic synthesis and characterization of cobalt nanoparticles using apoferritin, and investigation of direct electron transfer of Co(NPs)-ferritin at modified glassy carbon electrode to design a novel nanobiosensor. *Molecular Biology Reports*, v. 39, n. 9, p. 8793–8802, 2012.

KATZ, E.; WILLNER, I.; WANG. Sistemas integrados de nanopartículas-biomoléculas híbridas: síntese, propriedades e aplicações. *chemical Society*, v. 43, n. 45, p. 6042–6108, 2004.

KOTAKA, M.; GOVER, S.; VANDEPUTTE-RUTTEN, L.; AU, S. W.; LAM, V. M.; ADAMS, M. J. Structural studies of glucose-6-phosphate and NADP⁺ binding to human glucose-6-phosphate dehydrogenase. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, v. 61, n. 5, p. 495–504, 2005.

KRAJEWSKA, B. Review Urease. II. Properties and their customizing by enzyme immobilizations. *Jornal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 59, n. 1, p. 22–40, 2009.

KRZELJ, V.; ZLONORE, S.; TERZIC, J.; MESTROVIC, M.; JAKSIC, J.; PAVLOV, N. Prevalence of G6PO deficiency in the Croatian Adriatic coast population. *Archives of Medical Research*, v. 32, n. 5, p. 454–457, 2001.

LEHNINGER, A.; NELSON, D.; COX, M. *Princípios de bioquímica*. 2. ed. São Paulo, Ed.Savier, 1995, 839 p

LEHNINGER, A.; NELSON, D.; COX, M. *Princípios de bioquímica*. 6. ed. São Paulo, Ed. ARMED Editora LTDA, 2014. 1207 p.

LEI, Y.; CHEN, W.; MULCHANDANI, A. Microbial biosensors. *Analytica Chimica Acta*, v. 568, p. 200–210, 2006.

LEITE, D. O.; PRADO, R. J. Espectroscopia no infravermelho: uma apresentação para o Ensino Médio. *Revista Brasileira de Ensino de Física*, v. 34, n. 2, p. 2504–2512, 2012.

LI, W.; YANG, Y. J. The reduction of graphene oxide by elemental copper and its application in the fabrication of graphene supercapacitor. *Solid State Electrochemistry*, v. 18, p. 1621–1626, 2014.

LIMA, A.; SOARES, J.; GRECO, J. *Métodos de laboratório Aplicados à Clínica-Técnica e interpretação*. 8. ed. Rio de Janeiro, Ed. Guanabara Koogan, 2001, 500 p.

LIN, L.; GAO, H.; LIN, D.; GAO, M.; XIAO, M.; YANG, S.; LI, X. LC-ED with an acetylene black-dihexadecyl hydrogen phosphate composite film-modified electrode for in vivo analysis of thiols in rat striatal microdialysate. *Chromatographia*, v. 72, n. 5-6, p. 447–452, 2010.

LIU, Z.; ZHOU, Y.; WANG, Y.; CHENG, Q.; WU, K. Enhanced oxidation and detection of toxic ractopamine using carbon nanotube film-modified electrode. *Electrochimica Acta*, v. 74, p. 139–144, 2012.

LOHR, G.; WALLER, H. Glucose 6 phosphate dehydrogenase: In: *Method of enzyme analysis*. 3. ed. New York, Ed. Varlarge Chemic Wehnhenin, p. 636-643, 1974.

LOJUOICE, F.; SILVA, O. P.; ZANCHIN, N. I. T.; OLIVEIRA, C. C.; PESSOA-JR, A. A Overexpression of glucose-6-phosphate dehydrogenase in genetically modified *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied Biochemistry and Biotechnology - Part A Enzyme Engineering and Biotechnology*, v. 91–93, p. 161–169, 2001.

LÓPEZ-GALLEGO, F.; BETANCOR, L.; MATEO, C.; HIDALGO, A.; ALONSO-MORALES, N.; DELLAMORA-ORTIZ, G.; GUISÁN, J. M.; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R. Enzyme stabilization by glutaraldehyde crosslinking of adsorbed proteins on aminated supports. *Journal of Biotechnology*, v. 119, p. 70–75, 2005.

LUCKY, S. S.; SOO, K. C.; ZHANG, Y. Nanoparticles in Photodynamic Therapy. *Chemical Reviews*, v. 115, n. 4, p. 1990–2042, 2015.

LUZZATO, L.; METHA, A. Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase Deficiency. In: *The metabolic basis of inherited disease*. New York, Ed. McGraw-Hill, p. 3367-3398, 1995.

MAFFI, D.; PASQUINO, M. T.; CAPRARI, P.; CAFORIO, M. P.; CIANCIULLI, P.; SORRENTINO, F. Identification of G6PD Mediterranean mutation by amplification refractory mutation system. *Clinical Chimica Acta*, v. 321, n. 1-2, p. 43–47, 2002.

MARZZOCO, A.; TORRES, B. *Bioquímica Básica*. 2. ed. Rio de janeiro, Ed. Guanabara Koogan, 1999, 360p.

MCALLISTER, M. J. LI, J.; ADAMSON, D.; SCHNIEPP, H.; ABDALA, A.; LIU, J.; HERRERA-ALONSO, M.; MILIUS, D.; CAR, R.; PRUD'HOMME, R.; AKSAY, I. Single sheet functionalized graphene by oxidation and thermal expansion of graphite. *Chemistry of Materials*, v. 19, n. 18, p. 4396–4404, 2007.

MIELOCH, A.; ŻURAWEK, M.; GIERSIG, M. Bioavaliação de nanopartículas de óxido de ferro superparamagnéticas (SPIONs) funcionalizadas com dihexadecil fosfato (DHP). *Science*, v. 10, n. 1, p. 2725, 2020.

MINISTÉRIO DA SAUDE. Boletim Epidemiológico Malaria 2021. Edição Especial. Brasília, Ed. Secretaria de Vigilância em Saúde, 2021, 100 p.

MOINO, B. P.; VALENTE, R. K. M. Desenvolvimento de um biossensor potenciométrico para a determinação de triglicerídeos em biodiesel. In: Anais do XVII Encontro de Iniciação Científica, Campinas, SP, 2012.

MONTEIRO, V.; SILVA, R. Aplicações Industriais da Biotecnologia Enzimática. Revista de processos Químicos, v. 3, n. 5, p. 9–23, 2009.

MORI, H.; ISHIDA, M.; OKAMOTO, S. Glucose determination using a flow system with enzyme and application to analysis of glucose content in beverages. Journal of Health Science, v. 45, n. 3, p. 126–129, 1999.

MURRAY, R. K. Harper Bioquímica Ilustrada. 29. ed. México, Ed. Mc Graw Hill Educación, 2013, 814 p.

NANDA, S. S.; PAPAETHYMIU, G. C.; YI, D. K. Functionalization of Graphene Oxide and its Biomedical Applications. Critical Reviews in Solid State and Materials Sciences, v. 40, n. 5, p. 291–315, 2015.

ODUOLA, T.; ADEOSUN, G.; OGUNYEMI, E. Studies on G6PD Stability in Blood stored Activity of G6PD in Stored Blood with Different Anticoagulants. Internet Journal Hematol, v. 2, n. 2, 2006.

OLIVE, C.; LEVY, H. Glucose-6-phosphate dehydrogenase from *Leuconostoc mesenteroides*. Methods in Enzymology, v. 41, p. 196-201, 1975.

OLIVEIRA-FERREIRA. Malária in Brazil. Malaria Journal, v. 9, n. 115, p. 1–15, 2010.

OMS. World Malaria Report 2016. Genebra: Disponível em: <www.who.int/publications-detail-redirect/WHO-HTM-GMP-2017.4>; acessado em 8 de janeiro de 2020.

OMS. World Malaria Report 2021. Genebra: Disponível em: <<https://www.who.int/teams/global-malaria-programme/reports/world-malaria-report-2021?msclkid=9f82b8e3bb5111ec8cd233098d8f1b56>>, acessado em 11 de fevereiro de 2022.

OZER, N.; AKSOY, Y.; OGUS, H. Kinetic properties of human placental glucose-6-phosphate dehydrogenase. International Journal Biochemistry & Cell Biology, v. 33, p. 221–226, 2001.

PACHECO, W. SEMAAN, F.; DE ALMEIDA, V.; RITTA, A.; AUCÉLIO, R. Voltammetry: A brief review about concepts. Revista Virtual de Química, v. 5, n. 4, p. 516–537, 2013.

PAGLIAI, R. L. Comparação do uso da tirosinase purificada e na forma de extrato bruto enzimático em biossensores amperométricos para a detecção de catecol. Dissertação de

mestrado, Programa de Pós-Graduação em Ciências e Engenharia de Materiais, Universidade São Paulo (USP), Brasil, 2009.

PARELLADA, J.; NARVÁEZ, A.; LÓPEZ, M. A.; DOMÍNGUEZ, E.; FERNÁNDEZ, J. J.; PAVLOV, V.; KATAKIS, I. Imunossensores amperométricos e eletrodos de enzima para aplicações ambientais. *Analytica Chimica Acta*, v. 362, p. 47–57, 1998.

PARK, S.; RUOFF, R. S. Synthesis and characterization of chemically modified graphenes. *Current Opinion in Colloid and Interface Science*, v. 20, n. 5–6, p. 322–328, 2015.

PATHAK, P.; KATIYAR, V. K.; GIRI, S. Cancer Research - Nanoparticles, Nanobiosensors and Their Use in Cancer Research. *Azojono Journal of Nanotechnology Online*, v. 3, 2007.

PENG, Y.; LU, C.; HU, B. L.; WANG, Z. B.; HU, S. S. Development of an acetylspiramycin sensor based on a single-walled carbon nanotubes film electrode. *Microchimica Acta*, v. 158, p. 79–84, 2007.

PEREIRA, L. L. M.; BRAVIN, C. A.; CINTRA, T. S.; CASSA, W. S.; SANTOS, T. A.; FONSECA, A.; PRATTE-SANTOS, R. Prevalência da deficiência de G6PD e caracterização molecular dos polimorfismos G202A, A376G e C563T em neonatos no Sudeste do Brasil. *Journal Einstein (São Paulo)*, v. 17, n. 1, 2019.

POLLAK, N.; DÖLLE, C.; ZIEGLER, M. The power to reduce: pyridine nucleotides—small molecules with a multitude of functions. *Biochemical Journal*, v. 402, n. 2, p. 205–208, 2007.

POTTS, J. R.; DREYER, D. R.; BIELAWSKI, C. W.; RUOFF, R. S. Graphene-based polymer nanocomposites. *Polymer*, v. 52, n. 1, p. 5–25, 2011.

PYUN, S.; SHIN, H. C.; LEE, J. W.; GO, J. Y. Electrochemical Methods. In: *Electrochemistry of insertion materials for hydrogen and lithium, (monographs in electrochemistry)*. Berlin, Ed. Springer-Verlag, p. 11, 2012

RADI, A. E.; MUÑOZ-BERBEL, X.; LATES, V.; MARTY, J. L. Label-free impedimetric immunosensor for sensitive detection of ochratoxin A. *Biosensors and Bioelectronics*, v. 24, n. 7, p. 1888–1892, 2009.

REY, L. *Parasitologia*. 3. ed. Rio de Janeiro, Ed. Guanabara Koogan, 2001, 856p.

RODUNER, E. Size Matters: Why Nanomaterials are Different. *Chemical Society Reviews*, v. 35, n. 7, p. 583–592, 2006.

ROSA, T. A. S. Imobilização e detecção de biomoléculas em matrizes de poli(ácido 4-hidroxifenilacético): aplicações no desenvolvimento de genossensores. *Dissertação de mestrado, Programa de Pós-Graduação do instituto de Química, Universidade Federal de Uberlândia (UFU), Brasil, 2008.*

ROSATTO, S. S.; DURAN, N.; KUBOTA, L. T. Biossensores amperométricos para determinação de compostos fenólicos em amostras de interesse ambiental. *Química Nova*, v. 24, n. 1, p. 77–86, 2001.

ROWLAND, P. BASAK, A. K.; GOVER, S.; LEVY, H. R.; ADAMS, M. J. The threedimensional structure of glucose-6-phosphate dehydrogenase from leuconostoc mesenteroides refined at 2.0 Å resolution. *Structure*, v. 2, n. 11, p. 1073–1087, 1994.

SAHIN, S.; OZMEN, I.; BASTEMUR, G. Y. Development of Voltammetric Glucose-6-phosphate Biosensors Based on the Immobilization of Glucose-6-phosphate Dehydrogenase on Polypyrrole- and Chitosan-Coated Fe₃O₄ Nanoparticles/Polypyrrole Nanocomposite Films. *Applied biochemistry and biotechnology*, v. 188, n. 4, p. 1145–1157, 2019.

SALEH, F. S.; RAHMAN, M.; OKAJIMA, T.; MAO, L.; OHSAKA, T. Determination of formal potential of NADH/NAD⁺ redox couple and catalytic oxidation of NADH using poly(phenosafranin)-modified carbon electrodes. *Bioelectrochemistry*, v. 80, p. 121–127, 2011.

SALLES, B. C. C.; OLIVEIRA, C. M.; MACIEL, S. C.; DELMORO, A. C. L.; OLIVEIRA, C. H. S.; CAMILO, F. F.; TERRA, M. C. Uma revisão de literatura sobre a deficiência de Glicose-6-Fosfato-Desidrogenase. *Revista Científica Multidisciplinar Núcleo do Conhecimento*, v. 13, p. 91-105, 2021.

SALGADO, A. M. Desenvolvimento e aplicação de sensores e sistemas de monitoração de biomassa, etanol e de substrato por modelo. Tese de Doutorado, Programa de Pós-Graduação em Química, Universidade Federal de Rio de Janeiro (UFRJ), Brasil, 2001.

SANTHIAGO, M. Construção de plataformas nanoestruturadas para detecção de Cys e NADH. Dissertação de mestrado, Programa de Pós-Graduação em Química Universidade de Campinas (UC), Brasil, 2010.

SCHNEIDER, C. A.; RASBAND, W. S. ; ELICEIRI, K. W. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature Methods*, v. 9, n. 7, p. 671, 2012.

SEGEL, I. H. *Bioquímica: Teoria e problemas*. Rio de Janeiro, Ed. Livros técnicos e científicos, 1979, 528 p.

SHAH, R.; KAUSAR, A.; MUHAMMAD, B.; SHAH, S. Progression from Graphene and Graphene Oxide to High Performance Polymer-Based Nanocomposite: A Review. *Polymer-Plastics. Technology and Engineering*, v. 54, n. 2, p. 173–183, 2015.

SHAMAILA, S.; SAJJAD, A. K. L.; IQBAL, A. Modifications in development of graphene oxide synthetic routes. *Chemical Engineering Journal*, v. 294, p. 458–477, 2016.

SILVA, L. H. Estudos físico-químicos sobre interação de nanopartículas metálicas com óxido inorgânico de estrutura unidimensional. Tese de Doutorado, Programa de Pós-Graduação em Química, Universidade Federal da Bahia (UFB), Brasil, 2015.

SILVA, M. Desenvolvimento de imunossensores eletroquímicos para detecção de tireoglobulina baseado em nanocompósitos poliméricos. Tese de Doutorado, Programa de Pós-Graduação em Química, Universidade federal do Amazonas (UFA), Brasil, 2018.

SKOOG, D. A.; WEST, D. M.; HOLLER, F. J.; CROUCH, S. R. Fundamentos de química analítica. São Paulo, Ed. Cengage Learning Editores, 2010, 999 p.

SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; NIEMAN, T. Fundamentos de Química Analítica. São Paulo: Cengage, 2005.

SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J.; NIEMAN, T. A. Princípios de análise instrumental. 5. ed. Porto Alegre, Ed. Bookman, 2002.

SMITH, W.; HASHEMI, J. Fundamentos de Engenharia e Ciência dos Materiais. São Paulo, Ed. AMGH Editora Ltda & McGraw-Hill Education, 2012, 734 p.

SOARES, J. C. Biossensores eletroquímicos fabricados a partir da imobilização da urease em filmes de polipirrol. Tese de Doutorado, Programa de Pós-Graduação Interunidades em Ciência e Engenharia de Materiais, Universidade de São Paulo (USP), Brasil, 2011.

SOARES, L. R. P. D. Nanopartículas de ouro anisométricas como nanossondas para a identificação do polimorfismo de DNA associado à Intolerância à Lactose. Tese de Doutorado, Programa de Pós-Graduação de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa (UNL), Portugal, 2016.

SOARES, L. F.; LEAL, J. M. A.; VIEIRA, J. F. P. N.; BARROS, V. C.; OLIVEIRA, E. H. Atividade de glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PD) em membros de povos de terreiros de umbanda na cidade de Teresina, Piauí. Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada, 2013. Disponível em: <http://serv-bib.fcfar.unesp.br/seer/index.php/Cien_Farm/article/viewFile/2611/1460 >. Acesso em: 07 set. 2017.

TZANG, C. H.; YUAN, R.; YANG, M. Biossensores voltamétricos para a determinação de formato e glicose-6-fosfato com base na medição de NADH e NADPH gerados por desidrogenase. Biossensores e bioeletrônica, v. 16, n. 3, p. 211–219, 2001.

UNDEN, G.; BONGAERTS, J. Alternative respiratory pathways of *Escherichia coli*: energetics and transcriptional regulation in response to electron acceptors. Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics, v. 1320, n. 3, p. 217–234, 1997.

VENTURA, A. . Malária por plasmodium vivax em crianças e adolescentes. *Jornal de pediatria*, v. 75, n. 3, p. 187–194, 1999.

VICENTINI, F. C.; JANEGITZ, B. C.; BRETT, C. M. A.; FATIBELLO-FILHO, O. Tyrosinase biosensor based on a glassy carbon electrode modified with multi-walled carbón nanotubes and 1-butyl-3-methylimidazolium chloride within a dihexadecylphosphate film. *Sensor Actuators*, v. 188, p. 1101–1108, 2013.

VIEIRA, T. A. Redução eletroquímica do óxido de grafeno utilizando sistemas de análise por injeção em batelada. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Química industrial), Universidade Federal de Uberlândia (UFU), Brasil, 2019. Disponível em: <<https://repositorio.ufu.br/handle/123456789/26118>>.

VIEIRA, I. C.; LUPETTI, K. O.; FATIBELLO-FILHO, O. Determinação de paracetamol em produtos farmacêuticos usando um biossensor de pasta de carbono modificado com extrato bruto de abobrinha (*Cucurbita pepo*). *Quimica Nova*, v. 26, n. 1, p. 39–43, 2003.

VILLAVERDE, A. Allosteric enzymes as biosensors for molecular diagnosis. *FEBS letters*, v. 554, n. 1, p. 169–172, 2003.

VITOLO, M.; ROCHE, J. A. *Enzimas no contexto da síntese orgânica*. São Paulo: Fundação Biblioteca Nacional, 1998, 48 p.

VO-DINH, T.; CULLU, B. Biosensors and biochips: advances in biological and medical diagnostics. *Fresenius Journal Analytical Chemistry*, v. 336, n. 6–7, p. 540–551, 2000.

VOUGHT, V.; CICCONE, T.; DAVINO, M. H.; FAIRBAIRN, L.; LIN, Y.; COSGROVE, M. S.; ADAMS, M. J. Delineation of roles of amino acids involved en the catalytic function of *Leuconostoc mesenteroides* glucose-6-phosphate dehydrogenase. *Biochemistry*, v. 12, n. 49, p. 15012–15021, 2000.

VULLIAMY, T. The molecular basis of glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. *Trends in Genetics*, v. 8, n. 4, p. 138–143, abr. 1992.

WAGNER, H. H.; HILL, N. R. *Becoming Counselors Through Growth and Learning: The Entry Transition Process*. *Counselor Education and Supervision*, v. 54, n. 3, p. 189–202, set. 2015.

WANG, J. *Analytical Electrochemistry*. 2. ed. Hoboken, NJ, USA, Ed. John Wiley & Sons, Inc., 2006.

WANG, X.; CHAN, T. F.; LAM, V. M.; ENGEL, P. C. What is the role of the second “structural” NADP⁺-binding site in human glucose 6-phosphate dehydrogenase? *Protein Science*, v. 17, n. 8, p. 1403–1411, 2008.

WINDHOLZ, M. The Merck Index: an encyclopedia of chemicals, drugs, and biologicals. 10. ed. USA, Ed. Rahway NJ, 1983.

WLADYMYR, J. B. S.; CARDOSO, M. J. B.; ALMEIDA, K. V.; NASCIMENTO, E. P.; FARIAS, K. A. S.; FOOK, M. V. L. Desenvolvimento de compósitos a base de quitosana/fosfato de cálcio. *Revista Eletrônica de Materiais e Processo*, v. 8, n. 3, p. 136–140, 2013.

WONG, C. H. A.; SOFER, Z.; KUBEŠOVÁ, M.; KUČERA, J.; MATĚJKOVÁ, S.; PUMERA, M. Synthetic routes contaminate graphene materials with a whole spectrum of unanticipated metallic elements. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 111, n. 38, p. 13774–13779, 2014.

WU, Y. H. Nano-TiO₂/dihexadecylphosphate based electrochemical sensor for sensitive determination of pentachlorophenol. *Sensors and Actuators, B: Chemical*, v. 137, p. 180–184, 2009.

WU, Y.; HU, S. Direct electrochemistry of glucose oxidase in a colloid Au-dihexadecylphosphate composite film and its application to develop a glucose biosensor. *Bioelectrochemistry*, v. 70, n. 2, p. 335–341, 2007.

XU, W. et al. Glucose 6 phosphate dehydrogenase mutations and haplotypes in various ethnic groups. *Blood*, v. 85, p. 257–263, 1995.

YOU, J.; JEON, S. Electrocatalytic oxidation of NADH on a glassy carbon electrode modified with MWCNT-Pd nanoparticles and poly 3,4-ethylenedioxy pyrrole. *Electrochimica Acta*, v. 56, p. 10077–10082, 2011.

ZAITZEVA, E. A.; CHUKRAI, E. S.; POLTORAK, O. M. Thermostability of yeast hexokinase and glucose-6-phosphate dehydrogenase. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 61, p. 67–74, 1997.

ZHANG, Y.; WANG, Y.; WU, K.; ZHANG, S.; ZHANG, Y.; WAN, C. Electrochemical determination of chrysophanol based on the enhancement effect of acetylene black nanoparticles. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v. 103, p. 94–98, 2013.

ZHANG, Z.; RUSLING, J. Electron transfer between myoglobin and electrodes in thin films of phosphatidylcholines and dihexadecylphosphate. *Biophysical Chemistry*, v. 63, n. 2-3, p. 133–146, 1997.

ZHU, Y.; STOLLER, M.; CAI, W.; VELAMAKANNI, A.; PINER, R.; CHEN, D.; RUOFF, R. Exfoliation of graphite oxide in propylene carbonate and thermal reduction of the resulting graphene oxide platelets. *ACS Nano*, v. 4, n. 2, p. 1227–1233, 2010.

ZIBETTI, A. W. Desenvolvimento de um sistema reacional de hidrólise enzimática de tributirina para aplicação em biossensor de tempo-temperatura. Dissertação de mestrado, Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Brasil, 2008.

ZUCOLOTTO, V.; DAGHASTANLI, K. R. P.; HAYASAKA, C. O.; RIUL, A.; CIANCAGLINI, P.; OLIVEIRA, O. N. Using capacitance measurements as the detection method in antigen-containing layer-by-layer films for biosensing. *Analytical Chemistry*, v. 79, n. 5, p. 2163–2167, 2007.

9. ANEXO

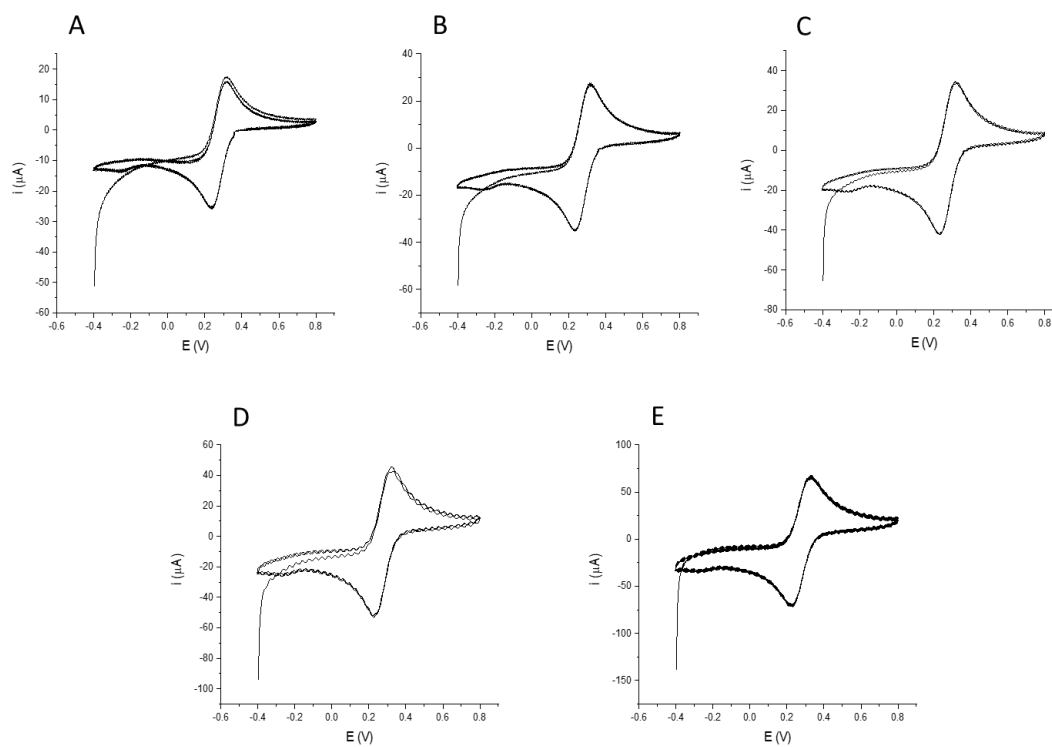


Figura 9.1. A, B, C, D, E- voltamogramas cíclicos do eletrodo de carbono às velocidades 0,01, 0,02, 0,03, 0,05 e 0,1 V s^{-1} para 3 ciclos em solução de $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ $5 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ /KCl $0,5 \text{ mol L}^{-1}$.

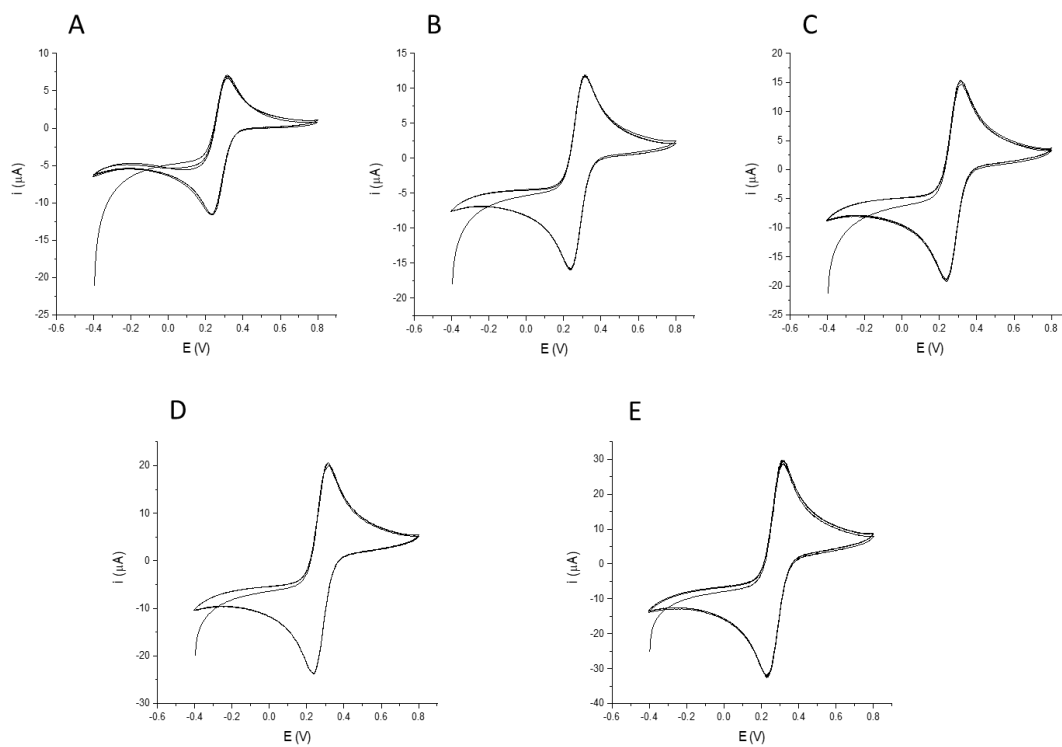


Figura 9.2. A, B, C, D, E- voltamogramas cíclicos do eletrodo de ouro às velocidades 0,01, 0,02, 0,03, 0,05 e 0,1 V s^{-1} a 3 ciclos em solução de $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ $5 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ / KCl 0,5 mol L^{-1} .