



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

JOAO HENRIQUE COELHO

**DESENVOLVIMENTO DE UM BIOSENSOR
VOLTAMÉTRICO À BASE DE EXTRATO BRUTO DE
LACASE, BOTRIOSFERANA E MATERIAIS
NANOESTRUTURADOS PARA APLICAÇÕES ANALÍTICAS**

Londrina
2018

JOAO HENRIQUE COELHO

**DESENVOLVIMENTO DE UM BIOSSENSOR
VOLTAMÉTRICO À BASE DE EXTRATO BRUTO DE
LACASE, BOTRIOSFERANA E MATERIAIS
NANOESTRUTURADOS PARA APLICAÇÕES ANALÍTICAS**

Dissertação apresentada ao Departamento de Química da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Química.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Elen Julciléia Romão Sartori Braz

Londrina
2018

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

Coelho, João Henrique.

Desenvolvimento de um biossensor voltamétrico à base de extrato bruto de lacase, botriosferana e materiais nanoestruturados para aplicações analíticas / João Henrique Coelho. - Londrina, 2018.
65 f. : il.

Orientador: Elen Julciléia Romão Sartori Braz.

Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Exatas, Programa de Pós-Graduação em Química, 2018.
Inclui bibliografia.

1. lacase - Tese. 2. biossensores eletroquímicos - Tese. 3. polissacarídeo extracelular - Tese. 4. espironolactona - Tese. I. Romão Sartori Braz, Elen Julciléia. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Exatas. Programa de Pós-Graduação em Química. III. Título.

JOÃO HENRIQUE COELHO

**DESENVOLVIMENTO DE UM BIOSSENSOR VOLTAMÉTRICO À
BASE DE EXTRATO BRUTO DE LACASE, BOTRIOSFERANA E
MATERIAIS NANOESTRUTURADOS PARA FINS ANALÍTICOS**

Dissertação apresentada ao Departamento de
Química da Universidade Estadual de Londrina,
como requisito parcial à obtenção do título de
Mestre em Química.

BANCA EXAMINADORA

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Elen Julciléia Romão
Sartori Braz
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Prof. Dr. Edivaldo Egea Garcia
Universidade Estadual de Maringá – UEM

Prof.^a Dr.^a Débora Nóbile Clausen Peraro
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Londrina, 5 de março de 2018.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus que me deu saúde, paciência e determinação para superar todas as dificuldades.

À minha mãe Theresinha Fátima de Souza Coelho, heroína que me deu apoio, incentivo nas horas difíceis, de desânimo e cansaço.

Ao meu pai e irmão por estarem ao meu lado nessa etapa.

À minha orientadora Prof.^a Dr.^a Elen Sartori, pelo suporte, pela dedicação, pelas suas correções e incentivos.

À Prof.^a Dr.^a Aneli Barbosa por todo auxílio e disponibilidade para o desenvolvimento do projeto.

Agradeço aos amigos de laboratório por todo suporte durante a caminhada.

À todos que direta ou indiretamente fizeram parte da minha formação, o meu muito obrigado.

COELHO, João Henrique. **Desenvolvimento de um biossensor voltamétrico à base de extrato bruto de lacase, botriosferana e materiais nanoestruturados para fins analíticos**. 2018. 65 f. Dissertação (Mestrado em Química). Departamento de Química. Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2018.

RESUMO

No presente trabalho, uma nova arquitetura de biossensor utilizando botriosferana e lacase, ambos produzidos a partir do fungo lignolítico *Botryosphaeria rhodina* MAMB-05 foi descrito. A enzima foi imobilizada por adsorção física em botriosferana na superfície do eletrodo de carbono vítreo modificado com nanotubos de carbono de paredes múltiplas. O desempenho do novo biossensor foi avaliado pela determinação de dopamina, um típico composto fenólico. Parâmetros experimentais como a concentração da enzima, valor de pH e parâmetros instrumentais das técnicas eletroquímicas foram otimizados. Utilizando a voltametria de onda quadrada, determinou-se dopamina em uma faixa de concentração de 2,99 – 38,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$, com o limite de detecção de 0,127 $\mu\text{mol L}^{-1}$. O método proposto foi aplicado com sucesso na determinação de dopamina em formulações farmacêuticas e em fluidos biológicos, apresentando uma boa seletividade mesmo na presença de ácido úrico, ácido ascórbico e outros compostos fenólicos, atestando o potencial de aplicação deste biossensor em matrizes complexas. Os diferentes aspectos a respeito da estabilidade operacional da lacase foram avaliados, demonstrando boa repetibilidade intra- e inter-dia e estabilidade em relação ao tempo de vida útil, com valores de desvios padrão relativos de 3,6, 4,3 e 8,2 %, respectivamente. Além do método direto de determinação, o biossensor proposto pode ser aplicado na determinação indireta de espironolactona, apresentando um limite de detecção de 0,94 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Os resultados obtidos na análise da mesma em amostras farmacêuticas comerciais foram satisfatórios quando comparados ao método oficial descrito na Farmacopéia Brasileira, a um nível de confiança de 95%. Ademais, o biossensor proposto possui simplicidade de fabricação e pode ser aplicado como uma alternativa viável aos procedimentos utilizando enzimas puras.

Palavras-chave: Lacase. Biossensores eletroquímicos. Polissacarídeo extracelular. Espironolactona. Compostos fenólicos. Inibição.

COELHO, João Henrique. **Development of a voltammetric biosensor based on crude extract of laccase, botryosphaeran and nanostructured materials for analytical purposes.** 2018. 65 p. Dissertação (Mestrado em Química). Departamento de Química. Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2018.

ABSTRACT

In the present work, a novel biosensor architecture using botryosphaeran and laccase, both from the ligninolytic fungus *Botryosphaeria rhodina* MAMB-05 was described. The enzyme was immobilized by physical adsorption on botryosphaeran on the surface of the glassy carbon electrode modified with multi-walled carbon nanotubes. The performance of the new biosensor was evaluated by the determination of dopamine, a typical phenolic compound. Experimental parameters such as enzyme concentration, pH value and instrumental parameters of the electrochemical techniques were optimized. Using square-wave voltammetry, dopamine was determined in a concentration range of 2.99 - 38.5 $\mu\text{mol L}^{-1}$, with a detection limit of 0.127 $\mu\text{mol L}^{-1}$. The proposed method was successfully applied in the determination of dopamine in pharmaceutical formulations and in biological fluids, showing good selectivity even in the presence of uric acid, ascorbic acid and other phenolic compounds, attesting the potential of application of this biosensor in complex matrices. The different aspects regarding the operational stability of the laccase were evaluated, showing good intra- and inter-day repeatability and stability over the useful life, with values of relative standard deviations of 3.6, 4.3 and 8.2%, respectively. In addition, the proposed method can be applied to determination of spironolactone, presenting a detection limit of 0.94 $\mu\text{mol L}^{-1}$. The result obtained in the analysis of spironolactone in commercial pharmaceutical samples was satisfactory when compared to the official method described in the Brazilian Pharmacopoeia, at a confidence level of 95%. In addition, the proposed biosensor has manufacturing simplicity and can be applied as a viable alternative to procedures using pure enzymes.

Keywords: Laccase. Electrochemical biosensors. Extracellular polysaccharide. Spironolactone. Phenolic compounds. Inhibition.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	– Esquema geral dos componentes de um biossensor eletroquímico enzimático.....	14
Figura 2	– Fórmula estrutural da dopamina	18
Figura 3	– Representação do mecanismo das reações que ocorrem nos biossensores para a determinação de dopamina. Lacase _{RED} e Lacase _{OX} são as formas reduzida e oxidada, respectivamente da Lacase.....	19
Figura 4	– Representação estrutural da botriosferana	24
Figura 5	– Representação dos principais processos de imobilização de enzimas sendo (A) adsorção, (B) encapsulação, (C) ligação covalente e (D) ligação covalente cruzada.....	25
Figura 6	– Fórmula estrutural da espironolactona	29
Figura 7	– Representação esquemática do preparo do biossensor proposto	37
Figura 8	– (A) Voltamogramas de onda quadrada obtidos utilizando o ECV (a), botriosferana/ECV (b), botriosferana-NTCs/ECV (c) e lacase-botriosferana-NTCs /ECV (d) em solução tampão fosfato (pH 6,0) contendo 39,8 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de dopamina. Condições de VOQ: $f = 30 \text{ Hz}$, $a = 50 \text{ mV}$, $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$. (B) Respostas relativas (%) para os respectivos eletrodos.....	43
Figura 9	– (A) Voltamogramas de onda quadrada obtidos utilizando o biossensor proposto para 0,38 mmol L^{-1} de dopamina em solução tampão fosfato em diferentes valores de pH: 4,0 até 8,0; (B) Influência do pH no pico de corrente catódica e o pico de potencial do biossensor proposto. Condições de VOQ: $f = 30 \text{ Hz}$, $a = 50 \text{ mV}$ e $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$	46
Figura 10	– Mecanismo proposto para o processo de oxirredução da dopamina	47
Figura 11	– (A) Voltamogramas de onda quadrada obtidos em solução tampão fosfato (pH 6,0) utilizando o biossensor proposto para as seguintes concentrações de dopamina: (b – h): 2,99 – 38,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$. (B) Curva analítica correspondente	48

Figura 12 – Representação esquemática da oxidação enzimática da dopamina (1) para dopamina quinona (2) no biossensor e a reação com espirolactona (3) para formação de imina (4) e (5).....	54
Figura 13 – (A) Voltamogramas de onda quadrada obtidos em solução tampão fosfato (pH 6,0) utilizando o biossensor proposto para (a) 7,4 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de dopamina e (b) 2,97, (c) 4,94, (d) 9,83, (e) 14,7, (f) 19,5, (g) 24,2 e (h) 28,9 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de espirolactona. (B) Curva analítica correspondente.....	56

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Comparação dos resultados obtidos para determinação da dopamina utilizando o biossensor proposto e outros reportados na literatura	50
Tabela 2 – Resultados obtidos na determinação de dopamina em amostras de urina sintética e fluido cerebrospinal sintético pelo biossensor e método proposto	53
Tabela 3 – Comparação de parâmetros obtidos usando o biossensor proposto e outros métodos analíticos para determinação de espironolactona	57
Tabela 4 – Determinação de espironolactona em amostras farmacêuticas pelo método de VOQ usando o biossensor proposto e pelo método espectrofotométrico	58

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<i>a</i>	Amplitude de pulso
ABTS	2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin)6-ácido sulfônico
AF	Ácido fítico
AM	Ácido mercaptopropiônico
BA	Benzaldeído
<i>c</i>	Concentração
CD	β-ciclodextrina
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
DMF	N,N-dimetilformamida
DPR	Desvio padrão relativo
EAu	Eletrodo de ouro
EBE	Extrato bruto enzimático
ECV	Eletrodo de carbono vítreo
EDC	1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida
EPC	Eletrodo de pasta de carbono
ETI	Eletrodo de tela impressa
<i>f</i>	Frequência
<i>i</i> _{pc}	Corrente de pico catódico
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
K_m^{app}	Constante aparente de Michaelis-Menten
LD	Limite de detecção
LQ	Limite de quantificação
MSMV	Meio salino mínimo de Vogel
NHS	N-hidroxissuccinimida
NPsAu	Nanopartículas de ouro
NPsSiO ₂	Nanopartículas de Sílica
NTCs	Nanotubos de carbono
OGr	Óxido de grafeno reduzido
OX	Oxidada
PCA	Policloreto de alilamina
PPR	Polipirrol
<i>r</i>	Coefficiente de correlação

RED	Reduzida
Si	Esferas de Sílicio
VC	Voltametria cíclica
VOQ	Voltametria de onda quadrada
VPD	Voltametria de pulso diferencial
YSI	Yellow Springs, Ohio, USA
ΔE_s	Incremento de varredura

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
1.1	BIOSSENSORES ELETROQUÍMICOS ENZIMÁTICOS.....	13
1.2	DETERMINAÇÃO DE DOPAMINA EMPREGANDO BIOSSENSORES.....	18
1.3	ENZIMA LACASE	21
1.4	SUPORTES SÓLIDOS E IMOBILIZAÇÃO ENZIMÁTICA	22
1.5	ELETRODOS MODIFICADOS	28
1.6	DETERMINAÇÃO DE ESPIRONOLACTONA	29
2	OBJETIVOS	33
2.1	OBJETIVOS GERAIS	33
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	33
3	MATERIAIS E MÉTODOS	34
3.1	REAGENTES E SOLUÇÕES	34
3.2	INSTRUMENTAÇÃO	34
3.3	OBTENÇÃO DO EXTRATO BRUTO DA LACASE	35
3.4	OBTENÇÃO DA BOTRIOSFERANA	36
3.5	IMOBILIZAÇÃO DA ENZIMA LACASE EM BOTRIOSFERANA PARA A CONSTRUÇÃO DO BIOSSENSOR	37
3.6	PROCEDIMENTOS ANALÍTICOS	38
3.7	PREPARO DAS AMOSTRAS FARMACÊUTICAS E DOS FLUIDOS BIOLÓGICOS SINTÉTICOS PARA A DETERMINAÇÃO DE DOPAMINA.....	38
3.8	PREPARO DAS AMOSTRAS FARMACÊUTICAS PARA A DETERMINAÇÃO DE ESPIRONOLACTONA.....	39
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	41
4.1	IMOBILIZAÇÃO DA ENZIMA LACASE NO ELETRODO DE CARBONO VÍTREO MODIFICADO VIA EXOPOLISSACARÍDEO BOTRIOSFERANA	41
4.2	RESPOSTA ELETROQUÍMICA DO BIOSSENSOR PROPOSTO PARA DOPAMINA	42
4.3	OTIMIZAÇÃO DA RESPOSTA DO BIOSSENSOR PARA A DOPAMINA E CONDIÇÕES ANALÍTICAS.....	44

4.4	SELETIVIDADE E APLICAÇÃO ANALÍTICA PARA A DETERMINAÇÃO DE DOPAMINA.....	51
4.5	APLICAÇÃO DO BIOSSENSOR PROPOSTO NA DETERMINAÇÃO INDIRETA DE ESPIRONOLACTONA.....	53
5	CONCLUSÕES	59
6	REFERÊNCIAS	60

1 INTRODUÇÃO

1.1 BIOSSENSORES ELETROQUÍMICOS ENZIMÁTICOS

A incorporação de moléculas biológicas ativas na superfície de sensores eletroquímicos para fins analíticos tem aumentado consideravelmente nos últimos anos e novas arquiteturas de biossensores eletroquímicos vêm proporcionando sucesso em análises quantitativas, principalmente para aplicação em análises de amostras complexas, seja de origem biológica ou ambiental.

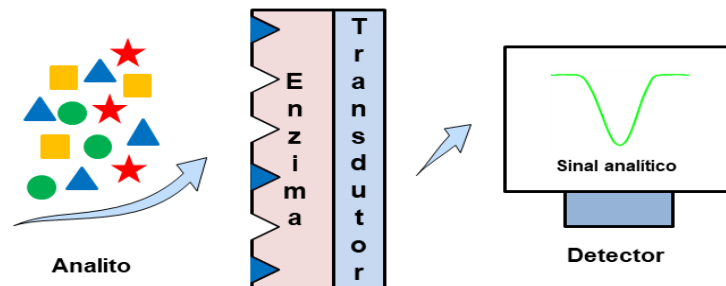
Os biossensores eletroquímicos são dispositivos que apresentam um material biológico de reconhecimento, intimamente em contato com um eletrodo, sendo capazes de converter uma resposta biológica em um sinal elétrico mensurável (FATIBELLO-FILHO; CAPELATO, 1992). Estes dispositivos apresentam seletividade que são fornecidas pelo uso do componente biológico (enzimas, antígenos, anticorpos, microrganismo, organelas, tecido animal ou vegetal, ácidos nucleicos, entre outros) em conjunto com a sensibilidade do transdutor (FATIBELLO-FILHO; CAPELATO, 1992).

A Figura 1 apresenta um esquema geral dos componentes de um biossensor eletroquímico enzimático. O analito alvo (substrato) presente na amostra interage seletivamente com a enzima, gerando um ou vários produtos detectáveis. Na sequência, a detecção destes produtos é possível devido a presença do transdutor (eletrodo) que converte a resposta biológica em um sinal quantificável pela aplicação de um potencial adequado. Por fim, com o auxílio de um detector, a corrente é obtida e é proporcional à concentração do analito na solução (MOHANTY; KOUGIANOS, 2006; LEE, 2008).

Esses dispositivos são seletivos, versáteis, relativamente econômicos e com resposta em tempo real, representando uma ferramenta promissora para auxiliar as técnicas existentes como a cromatografia e espectrofotometria na determinação de compostos de interesse e também para a compreensão de seus mecanismos. As técnicas clássicas como espectrofotometria e cromatografia não permitem facilmente um monitoramento contínuo *on site*, pois são de elevado custo, necessitam de operadores bem treinados e, em alguns casos,

requerem etapas de extração ou pré-concentração, que aumenta o risco de perda de amostra (ROSATTO et al., 2001).

Figura 1 – Esquema geral dos componentes de um biossensor eletroquímico enzimático.



Fonte: Adaptado de Mohanty e Kougiianos, 2006.

Os biossensores apresentam resposta rápida, precisão e são de fácil utilização. Ainda assim, podem ser descartáveis e miniaturizados, o que os torna amplamente empregados nas mais diversas áreas, como em diagnósticos clínicos, segurança alimentar e no monitoramento ambiental de áreas contaminadas (WANG, 2001).

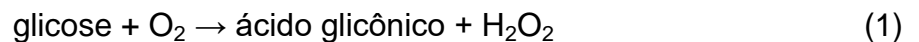
Os biossensores são classificados a partir do material biológico e também do transdutor eletroquímico utilizado. Os imunossensores são baseados em reação imunológica, havendo interações do par antígeno-anticorpo, sendo o antígeno ou o anticorpo imobilizado na superfície do transdutor. Os biossensores celulares utilizam bactérias, algas ou leveduras imobilizadas na superfície do transdutor. Os genossensores apresentam sequência de fitas simples de oligonucleotídeos imobilizados na superfície de um transdutor. Os biossensores enzimáticos usam enzimas como material biológico de reconhecimento, sendo estes os mais empregados no desenvolvimento de novos biossensores (WANG, 2001).

Frente a outros biossensores, como os ópticos, calorimétricos, piezoelétricos e magnéticos, os eletroquímicos são os mais difundidos, numerosos e comercializados com sucesso. Nos transdutores eletroquímicos, o eletrodo converte o sinal biológico em sinal elétrico mensurável, proporcional à concentração do

analito alvo. Além disso, podem ser classificados como condutométricos, potenciométricos e voltamétricos/amperométricos (GRIESHABER et al., 2008).

Os biossensores condutométricos baseiam-se nas medidas de condutância, resultante de produtos de reação catalítica. Os biossensores potenciométricos baseiam-se na diferença de potencial entre dois eletrodos em condições de corrente constante. Os biossensores amperométricos/voltamétricos baseiam-se na medida de corrente resultante de reações de oxidação ou redução de espécies eletroativas. Este último tem a vantagem de apresentar versatilidade, sensibilidade e baixo custo.

Clark e Lyons (1962) foram os primeiros a desenvolver um biossensor enzimático, utilizando a enzima glicose oxidase, como material biológico, imobilizada em um eletrodo amperométrico para oxigênio usando uma membrana semipermeável de diálise. Nesse biossensor, considerado de primeira geração, a glicose é oxidada a ácido glicônico pela ação da enzima na presença de oxigênio molecular, de acordo com a reação (Equação 1):



Quando uma baixa tensão é aplicada, ocorre a redução do O_2 na superfície do eletrodo de platina, no qual um sinal elétrico proporcional à concentração de glicose é produzido (Equação 2):



A diminuição da concentração (consumo) de oxigênio medida é proporcional à concentração de glicose no sangue. Assim, nesses biossensores de primeira geração não ocorre transferência direta de elétrons, mas sim se baseiam na eletroatividade do substrato ou produto de reação enzimática, apresentado problemas de interferência em decorrência da necessidade de elevados potenciais de oxidação/redução.

Esse modelo foi tão bem-sucedido que muitos outros biossensores comerciais para glicose foram produzidos usando o conceito original de medição de oxigênio. Entretanto, este tipo de biossensor apresenta algumas limitações, como a

difusão do oxigênio em soluções aquosas. Uma alternativa optada é quantificar a concentração de peróxido de hidrogênio (WANG, 2001). Em 1975, a Yellow Springs Instrument Company (YSI; Yellow Springs, Ohio, USA) comercializou o primeiro biossensor enzimático para detecção de glicose no sangue, o qual era baseado na detecção amperométrica de peróxido de hidrogênio. Este foi o primeiro de muitos analisadores de laboratório baseados em biossensores a serem construídos e comercializados por empresas em todo o mundo para pacientes com diabetes poderem monitorar com facilidade a glicose no sangue. Shichiri e colaboradores (1982) descreveram o primeiro biossensor tipo agulha subcutâneo implantável, sendo um grande avanço na aplicação “*in vivo*” de biossensores de glicose. Esses dispositivos enzimáticos são obtidos em eletrodos impressos, permitindo a análise rápida de glicose em uma única gota de sangue por pacientes diabéticos em sua própria casa. Há ainda, os biossensores não invasivos, aplicados sobre a pele e na boca (monitoramento de algum analito alvo em saliva).

Uma abordagem diferente destes tipos de biossensores foi a substituição do oxigênio por um mediador sintético para transferência de elétrons entre o sítio ativo da enzima e a superfície do eletrodo, classificado como biossensores de segunda geração. Na transferência mediada de elétrons, a enzima recebe elétrons de uma substância doadora (mediador), a qual é regenerada e o mediador, oxidado, é então reduzido por elétrons provenientes do eletrodo, gerando uma corrente que é proporcional à concentração do substrato (analito alvo). Isso proporciona menor potencial, mas pode facilitar a transferência de elétrons de reações redox secundárias, além da baixa estabilidade dos mediadores (MOROZOVA et al., 2007). O uso de mediadores, como o ferroceno e seus derivados, imobilizados ou não em conjunto com enzimas oxirredutases constituíram a base para os biossensores impressos lançados pelo MediSense em 1987, como o medidor de glicemia de uso doméstico do tamanho de uma caneta.

Posteriormente, foram desenvolvidos também os biossensores em que a troca de elétrons se dá entre o centro ativo da enzima e a superfície do eletrodo sem o uso de mediadores, assim classificados como biossensores de terceira geração. Com isso, pode-se obter um dispositivo simplificado, miniaturizado e que opera em potenciais mais próximos aos da enzima, minimizando efeitos de compostos concomitantes provenientes de amostras complexas (JANEGITZ, 2012).

Uma variedade de biossensores que exploram outros tipos de enzimas em combinação com transdutores eletroquímicos foram descritos na literatura. Cada um deles apresenta alternativas que podem ser aplicados a numerosos problemas analíticos em análises clínicas, de alimentos e bebidas, indústrias de processos, monitoramento ambiental, defesa e segurança. Guilbault e Montalvo (1969) foram os primeiros a detalhar a construção de um biossensor potenciométrico. Nesse trabalho, eles imobilizaram a enzima urease em um eletrodo de membrana líquida seletiva a íons amônio para a determinação de uréia em fluidos biológicos. Esses autores destacaram a importância do uso de enzimas imobilizadas em eletrodos, no sentido de reutilização das mesmas.

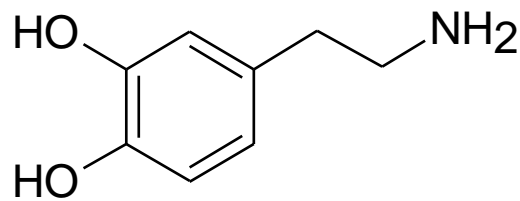
Os cuidados de saúde são a principal área na aplicação de biossensores, como o monitoramento de níveis de glicose no sangue por pacientes diabéticos empregando biossensores de glicose. Por outro lado, detecção de ureia tem aplicações potenciais para pacientes com doença renal, seja em casa ou no hospital. As aplicações industriais para biossensores incluem acompanhamento de caldos de fermentação ou procedimentos de processamento de alimentos através da detecção de concentrações de glicose e outros produtos finais de fermentação. A detecção sensível de compostos fenólicos é um tópico importante tanto para acompanhamento e diagnóstico clínico, como na pesquisa ambiental, porque estes tipos de compostos geralmente existem nas águas residuais de muitas indústrias, dando origem a problemas de saúde pública, já que muitos deles são de elevada toxicidade.

1.2 DETERMINAÇÃO DE DOPAMINA EMPREGANDO BIOSENSORES

Os compostos fenólicos consistem na classe de compostos que apresenta no mínimo um grupo hidroxila ligado diretamente a um hidrocarboneto aromático, sendo encontrado em variedades de vegetais, frutas e produtos industrializados, em fluidos biológicos e também como poluente ambiental. Dentre esses compostos, pode-se citar a dopamina (Figura 2). Ela é um neurotransmissor de grande importância no sistema nervoso central, renal e hormonal, a qual também desempenha um papel importante nas funções psicológicas. A dopamina pode provocar alterações fisiológicas como estimulação cardíaca e a taquicardia

(HARDMAN; LIMBIRD; GILMAN, 1996). Assim, sua determinação é de grande importância, tanto em fármacos como em fluidos biológicos, pelo fato de seu metabolismo anormal estar associado a doenças como esquizofrenia e mal de Parkinson. Ademais, o tratamento dessas doenças neurológicas muitas vezes passa pelo uso de medicamentos que contem em sua composição a dopamina.

Figura 2 – Fórmula estrutural da dopamina.



Fonte: o próprio autor.

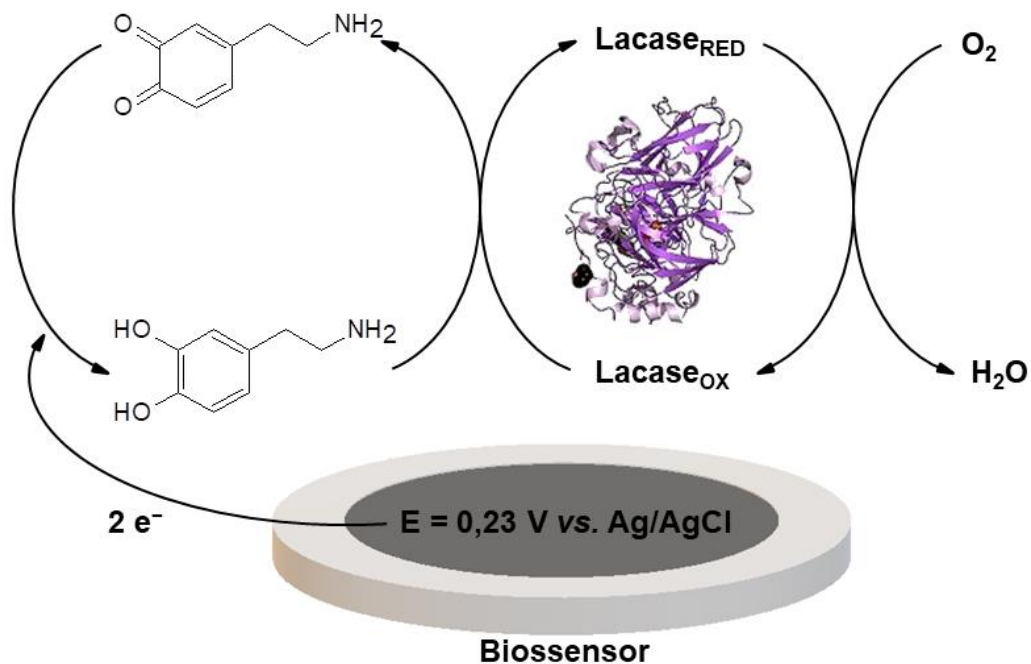
A dopamina pode ser determinada pela oxidação direta sobre a superfície de diferentes tipos de sensores eletroquímicos em elevado potencial, que pode promover a formação de produtos poliméricos que passivam a superfície do eletrodo. Frente a isso, os biossensores eletroquímicos enzimáticos demonstram ser uma ferramenta altamente promissora para a determinação de dopamina nos mais diferentes tipos de amostras.

As enzimas são biocatalisadoras muito eficientes que conferem ao eletrodo uma maior seletividade, conferindo característica importante nas medidas eletroquímicas. Muitas moléculas podem ocasionar interferência nas análises, uma vez que podem possuir potenciais de redução/oxidação próximos dos potenciais do analito, além do que, os biossensores operam em um potencial mais próximos de 0 V, onde a contribuição de espécies interferentes é minimizada.

A enzima lacase pode ser eficientemente empregada para essa finalidade (RODRÍGUEZ-DELGADO et al., 2015). Quando a enzima lacase está imobilizada na superfície de um eletrodo, ela recebe elétrons do composto fenólico (dopamina), sendo reduzida. Para se regenerar, ela é oxidada na presença de oxigênio molecular presente na solução que é então reduzido a água, de acordo com esquema apresentado na Figura 3. Subseqüentemente, o produto formado é eletroquimicamente reduzido na superfície do biossensor e volta para a dopamina (ROSATTO et al., 2001). O pico de corrente obtido na redução eletroquímica é

proporcional à concentração de dopamina na solução e é usado para a quantificação da mesma em amostras reais. Dessa forma, a enzima é utilizada para converter uma substância a ser determinada (substrato), a qual não é diretamente medida em outra e pode ser medida ou monitorada amperometrica/voltametricamente.

Figura 3 – Representação do mecanismo das reações que ocorrem nos biossensores para a determinação de dopamina. Lacase_{RED} e Lacase_{OX} são as formas reduzida e oxidada, respectivamente da Lacase.



Fonte: Adaptado de Rosatto e colaboradores, 2001.

A literatura dispõe de vários trabalhos que descrevem o desenvolvimento de biossensores eletroquímicos enzimáticos para a determinação de dopamina. Silva e colaboradores (2016) decoraram nanopartículas de ouro (NPsAu) estabilizadas em policloreto de alilamina (PCA) com a enzima lacase em um eletrodo de pasta de carbono (EPC) (NPsAu-PCA-lacase/EPC) para a determinação de dopamina em formulações farmacêuticas empregando a voltametria de onda quadrada (VOQ). A curva analítica apresentou linearidade no intervalo de concentração de $0,49 - 23,0 \mu\text{mol L}^{-1}$, com limite de detecção (LD) igual a $0,26 \mu\text{mol L}^{-1}$. Li e colaboradores (2012) imobilizaram a enzima lacase em esferas de sílica (Si) na superfície de um eletrodo de tela impressa (ETI) modificado com nanotubos de carbono de paredes múltiplas (NTCs) (lacase-Si-NTCs/ETI) para a

determinação de dopamina por voltametria de pulso diferencial (VPD). A curva analítica apresentou linearidade no intervalo de concentração de $1,3 - 85,5 \mu\text{mol L}^{-1}$, com LD igual a $0,42 \mu\text{mol L}^{-1}$. Zhao e colaboradores (2014) imobilizaram a enzima lacase em um eletrodo de carbono vítreo (ECV) modificado com SiO_2 nanoestruturado (lacase- SiO_2/ECV) para a determinação de dopamina em amostra de sangue fresco (obtido de coelho). Neste trabalho foi obtido linearidade no intervalo de $0,99 - 138,4 \mu\text{mol L}^{-1}$, com LD igual a $0,42 \mu\text{mol L}^{-1}$, empregando-se amperometria. Wang e colaboradores (2014) utilizaram nanopartículas de sílica modificada com ácido fítico (AF) (lacase/NPs SiO_2 -AF) para a determinação de dopamina em amostra farmacêutica e em amostra de sangue de rato. O método apresentou linearidade no intervalo de concentração de $0,99 - 103,1 \mu\text{mol L}^{-1}$, com LD igual a $0,26 \mu\text{mol L}^{-1}$, empregando-se amperometria. Cesarino e colaboradores (2013) desenvolveram um biossensor a base de lacase imobilizada em um ECV modificado com NTCs e polipirrol (NTCs-PPR-lacase/ECV) para a determinação de dopamina em amostras de urina. Foi obtida linearidade no intervalo de concentração de $0,5 - 4,75 \mu\text{mol L}^{-1}$, com LD igual a $0,14 \mu\text{mol L}^{-1}$, empregando-se VPD. Hua e colaboradores (2015) imobilizaram a enzima lacase em ETI utilizando óxido de grafeno reduzido (OGr), β -ciclodextrina (CD) e benzaldeído (BA) (lacase-CDBA-OGr/ETI). Este biossensor foi aplicado na determinação de dopamina em amostras de urina humana. O método apresentou linearidade no intervalo de concentração de $0,1 - 70 \mu\text{mol L}^{-1}$, com LD igual a $0,03 \mu\text{mol L}^{-1}$, empregando-se VPD. Shervedani e Amini (2012) imobilizaram a enzima lacase em um eletrodo de ouro (EAu) empregando a técnica de camadas automontadas com auxílio do ácido mercaptopropiônico (AM) (lacase-AM/EAu) para a determinação de dopamina em solução injetável e plasma humano. O método apresentou linearidade nos intervalos de concentração de $0,5 - 13,0$ e $47,0 - 430,0 \mu\text{mol L}^{-1}$, com LD igual a $0,029 \mu\text{mol L}^{-1}$, empregando-se VPD.

1.3 ENZIMA LACASE

As lacases (EC 1.10.3.2, benzenodiol: oxigênio oxidoreductase) são enzimas do tipo oxidase que contêm, no geral, quatro átomos de cobre por molécula; um cobre mononuclear (sítio T1) e três cobres em um cluster (sítio T2/T3), o qual é responsável pelo seu comportamento eletroquímico. O sítio T1 confere cor

azul clara à solução de lacase em água, sendo este o aceptor primário de elétrons do substrato, o qual será reduzido. Ela catalisa a oxidação de uma grande variedade de substratos orgânicos aromáticos, especialmente estruturas fenólicas, como mono, di, polifenóis e metoxifenóis na ausência de H_2O_2 , pela abstração de um elétron destes com concomitante redução de oxigênio para água (MOROZOVA et al., 2007; JONES; SOLOMON, 2015; CANNATELLI; RAGAUSKAS, 2017).

De acordo com dados da literatura ainda não há um mecanismo definido sobre a transferência de elétrons e redução do oxigênio molecular. Entretanto, descreve-se que o cobre T1 da lacase recebe elétrons do substrato, formando um cátion radical ou cátion intermediário, os quais subsequentemente podem reagir através de mecanismos não enzimáticos, transferindo os elétrons para os três átomos de cobre do cluster T2/T3, onde o oxigênio molecular é reduzido a água (JONES; SOLOMON, 2015; CANNATELLI; RAGAUSKAS, 2017).

A enzima lacase ocorre amplamente em fungos, plantas, bactérias e insetos, principalmente como enzimas extracelulares. O fungo ascomiceto *Botryosphaeria rhodina* MAMB-05 isolado de fruta tropical apodrecida foi descrito na literatura como produtor deste tipo de enzima induzido pelo álcool veratrílico (BARBOSA; DEKKER; HARDY, 1996). A sua utilização no desenvolvimento de novas arquiteturas de biossensores desponta como promissora por ser ainda pouco explorada. Há poucos trabalhos descritos na literatura que relatam o uso de lacase obtida pelo fungo *Botryosphaeria rhodina* MAMB-05 em biossensores. Em 2008, Cortes utilizou a técnica de *layer by layer* para depositar a enzima lacase junto com o exopolissacarídeo botriosferana, as quais foram adsorvidas, alternativamente, com o policloreto de dialildimetilamônio para a determinação de dopamina utilizando o ABTS (2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin)6-ácido sulfônico) como mediador de elétrons.

Ainda pode-se destacar que, a literatura descreve o uso de extrato bruto enzimático (EBE) na fabricação de biossensores para aplicação em amostras reais. O uso de EBE apresenta vantagens quando comparados com a utilização da enzima purificada e comercial, como preservação da atividade catalítica, manutenção da estabilidade, maior tempo de vida útil, além de ser de fácil obtenção. De acordo com Fatibello-Filho e Vieira (2002) os procedimentos para obtenção de

EBE são simples, rápidos e eficientes, destacando que a atividade enzimática no extrato bruto é mantida por longos períodos.

1.4 SUPORTES SÓLIDOS E IMOBILIZAÇÃO ENZIMÁTICA

A enzima a ser imobilizada no eletrodo para obtenção de um biossensor é escolhida de acordo com o analito alvo e o sucesso no desenvolvimento do dispositivo depende do processo de imobilização, que tem por objetivo manter um contato direto entre a enzima e a superfície do sensor de forma estável.

A utilização de enzimas na forma livre é normalmente dificultada devido às mesmas estarem sujeitas a fatores químicos, físicos e biológicos que limitam sua vida útil durante uso ou estocagem (OLIVEIRA; VIEIRA, 2006). A imobilização consiste na retenção da enzima em um suporte sólido insolúvel, devendo manter a função, estrutura e atividade biológica e não serem desorvidas durante o uso (SASSOLAS; BLUM; LECA-BOUVIER, 2012). Dessa forma, a enzima pode ser reutilizada, com possibilidade de conduzir processos contínuos e pode-se utilizar o extrato bruto como fonte enzimática, que implica em menor custo para o processo. Além disso, a reação pode ser interrompida a qualquer momento, tornando mais fácil a separação da enzima dos produtos de reação, sem haver contaminação. Entretanto, a imobilização pode afetar a conformação da enzima, sua estabilidade, ou fazer com que os sítios ativos se tornem menos acessíveis para a difusão de substratos. Dessa forma, a etapa de imobilização da enzima ao eletrodo é crucial no desenvolvimento de um biossensor.

Sempre que possível, deve-se escolher um método de imobilização mais simples e de menor custo, tornando o processo mais econômico, mas desde que obtenha maior retenção da atividade enzimática, estabilidade e durabilidade. Há uma diversidade de métodos de imobilização; entretanto, não há um específico aplicável para todas as enzimas conhecidas. É importante sempre conhecer as características físicas e químicas do suporte, bem como a possibilidade de regeneração do mesmo e também as técnicas de imobilização.

Vários tipos de suportes sólidos vêm sendo estudados para a imobilização de lacases. Na seleção de um suporte é importante observar a área

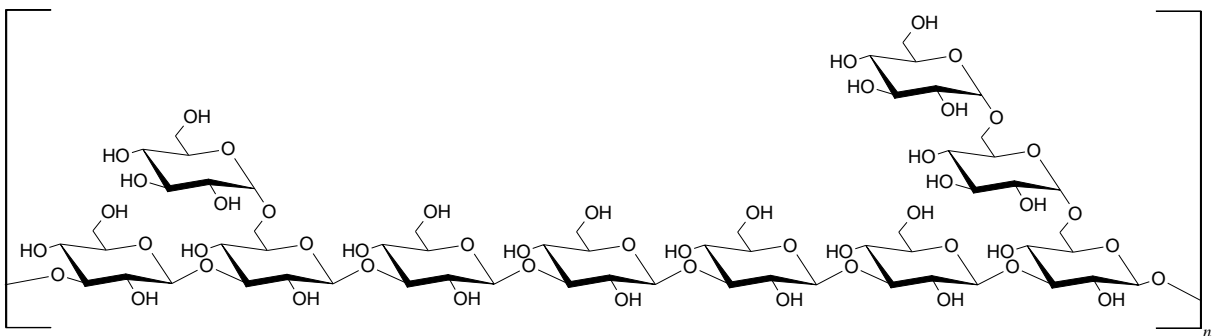
superficial, sua insolubilidade, ser resistente a ataque microbiano, o custo, natureza hidrofílica/hidrofóbica, capacidade de regeneração. Dentre outros suportes amplamente empregados na confecção de sensores ou biossensores, destacam-se os polissacarídeos, como a quitosana (XU et al., 2006; OLIVEIRA et al., 2009; FRANZOI et al., 2009; YANG et al., 2013) e a carboximetilcelulose (CHENG et al., 2013), uma vez que apresentam características notáveis como, biocompatibilidade, biodegradabilidade, habilidade para formar um filme de pequena espessura, aderência na superfície do eletrodo, renovável, abundância na natureza e geralmente não tóxicos. Oliveira e colaboradores (2009) desenvolveram um biossensor baseado na imobilização de lacase em micropartículas de quitosana para determinar rutina em produtos farmacêuticos. Franzoi e colaboradores (2009) imobilizaram lacase em quitosana por ligação covalente cruzada com cloreto cianúrico, obtendo um dispositivo com alta sensibilidade, boa repetibilidade e reprodutibilidade e estabilidade a longo prazo (13% de redução na resposta ao longo de 70 dias) para a determinação de luteolina em amostras de chás. Cheng e colaboradores (2013) desenvolveram um biossensor baseado no uso de carboximetilcelulose e óxido de grafeno reduzido para imobilização de hemoglobina. Xu e colaboradores (2006) utilizaram o nanocompósito a base de carboximetilquitosana e NPsAu para a imobilização da enzima peroxidase de raiz forte. Yang e colaboradores (2013) modificaram um ECV com carboximetilquitosana e óxido de grafeno reduzido para a fabricação de um citossensor.

O fungo ascomiceto *Botryosphaeria rhodina* MAMB-05 também é produtor do polissacarídeo extracelular botriosferana (BARBOSA et al., 2003). Exopolissacarídeos são polissacarídeos produzidos no meio externo da célula fúngica, isto é, são extracelulares (BARBOSA et al., 2004). Estes podem ser classificados em homopolissacarídeos, quando possui em sua estrutura molecular apenas monômeros ligados por ligações glicosídicas, do mesmo tipo, como o amido e glicogênio, proveniente de fonte vegetal e animal, e os heteropolissacarídeos, também ligados por ligações glicosídicas, constituem em sua estrutura mais de um tipo de monômero, como, o peptidoglicanos, de origem fúngica (BARBOSA et al., 2004).

A produção do exopolissacarídeo ocorre quando o meio de cultura contém glicose como única fonte de carbono para estabilizar a enzima lacase

também produzida pelo mesmo fungo. O exopolissacarídeo botriosferana foi primeiramente descrito em 2003 por Barbosa e colaboradores e tem uma estrutura molecular caracterizada como β (1 \rightarrow 3; 1 \rightarrow 6)-D-glucana com aproximadamente 22 % de ramificação lateral C-6 e também apresenta baixa solubilidade em meio aquoso (Figura 4). Isto se deve ao seu meio de cultivo ser a glicose, porém há outras fontes de carbono que podem ser exploradas como, a sacarose e a frutose, entretanto, a solubilidade e a ramificação são diferentes.

Figura 4 – Representação estrutural da botriosferana.



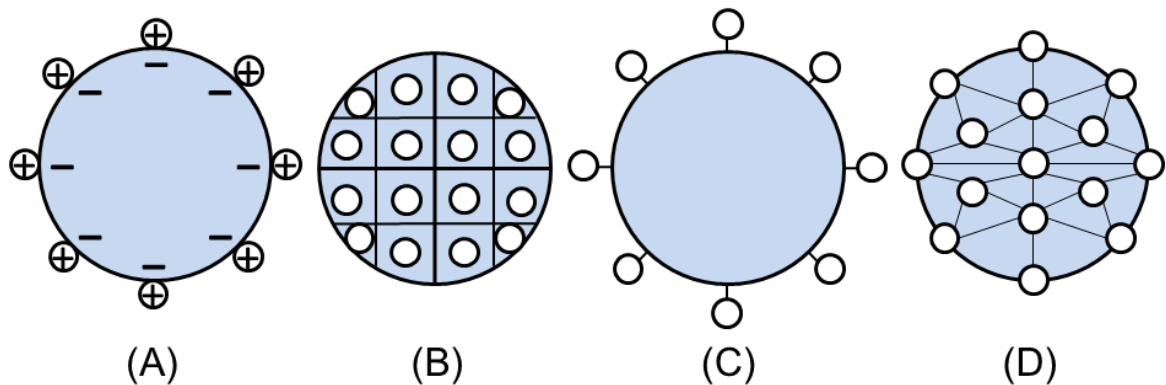
Fonte: Baseado em Bongiovani e colaboradores, 2009.

Uma característica atrativa do exopolissacarídeo é ajudar a manter a estabilidade da enzima lacase, pois esta fornece um ambiente bioquímico similar ao ambiente natural da enzima nas células biológicas, preservando sua estrutura sem a perda da atividade catalítica. Além disso, assim como outros polissacarídeos, ele pode ser usado para imobilizar a enzima lacase na superfície de transdutores eletroquímicos, sem que haja um bloqueio na transferência de elétrons entre a enzima e o eletrodo. Poucos trabalhos descritos na literatura empregam este exopolissacarídeo. Em 2007, França o empregou para sintetizar um biomaterial constituído por polianilina e botriosferana e em 2008, Cortes o empregou para obter um biossensor por *layer by layer*. Cabe ressaltar aqui, que botriosferana ainda não foi utilizada para a imobilização simples da enzima lacase em eletrodos à base de carbono para aplicações eletroquímicas e no desenvolvimento de biossensores.

Os métodos de imobilização mais empregados são aqueles baseados em ligações físicas e químicas entre a enzima e o eletrodo, como adsorção, encapsulamento, ligação covalente e ligação covalente cruzada (Figura 5). Deve-se levar em conta a atividade da enzima, de forma a garantir máxima

atividade, as características de regeneração, o custo do procedimento de imobilização, a toxicidade dos reagentes de imobilização e a estabilidade operacional (MARQUES; YAMANAKA, 2008).

Figura 5 – Representação dos principais processos de imobilização de enzimas sendo (A) adsorção, (B) encapsulação, (C) ligação covalente e (D) ligação covalente cruzada.



Fonte: Adaptado de Marques e Yamanaka, 2008.

O método de imobilização por adsorção física se baseia na interação da enzima com o suporte por meio de pontes de hidrogênio, forças de Van der Waals, ligações hidrofóbicas e ligações iônicas, as quais são consideradas fracas e podem atribuir desvantagens. Porém, a utilização deste método é simples, fácil e de baixo custo, e ainda há a possibilidade de reutilização do suporte após várias análises. A adsorção física não altera a estrutura molecular da enzima e com isso não afeta a sua atividade catalítica. Como mencionado, devido as estas interações serem fracas, há a possibilidade de dessorção da enzima pelas alterações nas variáveis de pH, temperatura e força iônica. Todavia, há a vantagem da não utilização de reagentes para imobilização, o suporte pode ser reutilizado, e é simples e econômico.

Outro método é a encapsulação de enzimas em membranas poliméricas semipermeáveis (nylon, acetato de celulose, dentre outros), que ocorre quando uma molécula da enzima permanece confinada numa membrana localizada na superfície do eletrodo e que apresenta uma porosidade controlada para a livre difusão do analito e dos produtos de reação. A vantagem desse método de imobilização é a não interação da enzima com a matriz e o meio reacional, não

afetando sua atividade catalítica, pode-se imobilizar várias enzimas em uma única etapa, é reutilizável e apresenta elevada área superficial para contato do substrato e da enzima no interior de um volume relativamente pequeno. Como desvantagens, pode ocorrer o crescimento de microorganismos na superfície do eletrodo e a enzima pode vaziar dos poros.

A imobilização de enzima pelo método de ligação covalente é o mais popular método de imobilização química. As enzimas se ligam por meio de seus grupos funcionais que não são essenciais para a sua atividade catalítica com grupos reativos específicos presentes no suporte (hidroxilas, carbonilas, aminas, tióis, etc.), por ligações covalentes. Esses grupos reativos do suporte podem ser ativados (modificados para produzir intermediários reativos), empregando-se reagentes multifuncionais, seguido de acoplamento enzimático ao suporte ativado, com posterior remoção de enzimas não ligadas.

Os reagentes mais utilizados para ativação de superfície de eletrodos, chamados de reagentes de reticulação são glutaraldeído, cistamina, 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC)/N-hidroxissuccinimida (NHS). Estes são moléculas que tem pelo menos duas extremidades reativas que se ligam a grupos específicos de aminoácidos na superfície da enzima (BRONDANI et al., 2009). O glutaraldeído promove a formação de grupos aldeídos na superfície do eletrodo e assim os grupos aminos da enzima ligam-se covalentemente aos grupos aldeídos do suporte. A cistamina (2,2-diaminoetildissulfeto) é um amino sulfeto que se liga fortemente ao ouro, introduzindo a este, grupamentos amino. Na sequência o glutaraldeído pode fazer ligação covalente cruzada entre a enzima e o eletrodo. A ligação covalente cruzada é um método de imobilização que se baseia na formação de uma rede rígida entre o reagente de reticulação e a enzima. O EDC promove a formação de ligação amida entre os grupos carboxílicos presentes na superfície do eletrodo e o grupo funcional amino de uma enzima. O NHS pode ser associado ao EDC para melhorar a eficiência da imobilização, promovendo estabilidade e aumento no número de ligações (SASSOLAS; BLUM; LECA-BOUVIER, 2012).

Freire, Duran e Kubota (2001) investigaram diferentes métodos de imobilização da enzima lacase em eletrodo de fibra de carbono, incluindo adsorção física, uso de glutaraldeído, de EDC e EDC/NHS. Com esse estudo, eles mostraram que diferentes processos de imobilização têm uma influência importante na

sensibilidade do biossensor. O EDC/NHS, usado para acoplar à lacase a grupos carboxílicos nas fibras de carbono, promoveu maior sensibilidade e excelente estabilidade, mantendo a atividade da enzima ao longo de 2 meses.

Há ainda outros reagentes de reticulação empregados no desenvolvimento de biossensores. Glioxal e tripolifosfato de sódio foram empregados para imobilizar a enzima lacase em micropartículas de quitosana, sendo obtidas por spray drying, visando a construção de biossensores para determinação de rutina em produtos farmacêuticos (OLIVEIRA et al., 2009). Carbodiimida e Glioxal foram utilizados para imobilização da peroxidase, obtida por extrato bruto de homogeneizado de milho, em quitina. O biossensor assim desenvolvido apresentou estabilidade e reprodutibilidade a longo prazo com um desvio padrão relativo de 2,0 % (BRONDANI et al., 2009). Fernandes, Santos e Vieira (2013) desenvolveram um biossensor com lacase imobilizada em uma matriz de quitosana. Antes da imobilização da lacase, a quitosana foi reticulada com a genipina, um agente de reticulação natural e incorporada em um eletrodo de pasta de carbono. O dispositivo foi aplicado na determinação dos compostos fenólicos totais em amostras de ervas combinadas. Os autores atribuíram o bom desempenho do biossensor à imobilização efetiva da lacase no suporte reticulado com genipina.

Vantagens como maior estabilidade pode ser observada com a imobilização por ligação covalente ou covalente cruzada, além de maior resistência da enzima quanto à variação de pH, temperatura, solventes orgânicos e o fato da enzima não ser desorvida do suporte. Todavia, como desvantagem, este método pode ocasionar a inativação da enzima, devido a interação de grupos funcionais da enzima com o suporte imobilizador, desconformando sua estrutura.

1.5 ELETRODOS MODIFICADOS

A escolha do tipo de eletrodo é um aspecto importante da preparação de um biossensor. Ele deve apresentar características eletroquímicas apropriadas e também ser adequado para o método de imobilização selecionado.

O eletrodo de carbono vítreo (ECV) é um dos eletrodos comumente utilizados na eletroanálise e é usado em uma ampla gama de aplicações analíticas. É uma alternativa mais econômica quando comparado aos metais nobres e apresenta propriedades eletroquímicas atraentes, como ampla faixa de potencial de

trabalho, razoavelmente inerte quimicamente e possui facilidade de modificação, fazendo com que várias estratégias de modificação de sua superfície tenham sido conduzidas para o desenvolvimento de biossensores (MALEKI et al., 1998).

Para melhorar o desempenho analítico (sensibilidade e seletividade) dos biossensores desenvolvidos utilizando ECV, realiza-se uma modificação de sua superfície. A modificação do ECV é importante porque o transdutor elétrico no biossensor eletroquímico é um eletrodo. Deste modo, empregando-se um eletrodo modificado, a sensibilidade e a seletividade dos procedimentos utilizando as técnicas eletroanalíticas são significativamente maiores que as obtidas com o emprego de eletrodos não modificados (MOSES et al., 1975).

Materiais nanoestruturados baseados em carbono, como os NTCs, foram extensivamente aplicados para modificação da superfície de ECV para construção de novas arquiteturas de biossensores. Eles apresentam alta condutividade elétrica, alta atividade eletrocatalítica e elevada área superficial. Estes materiais são adequados para transdução de sinais elétricos gerados após o reconhecimento da resposta biológica resultante da reação bioquímica entre a enzima imobilizada na superfície do eletrodo e o analito de interesse (ABDULBARI; BASHEER, 2017).

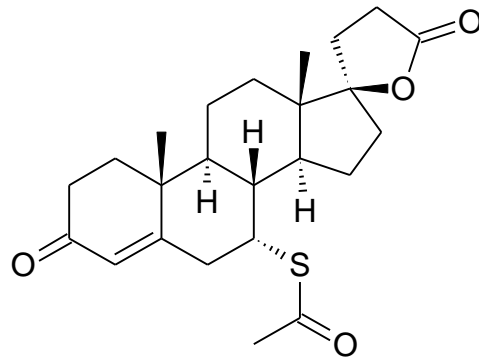
Os NTCs têm uma área superficial muito maior do que quando comparada com seu volume. Devido ao tamanho dos NTCs, uma melhora no desempenho eletroquímico dos ECVs pode ocorrer, com elevada transferência eletrônica entre a interface eletrodo/solução, aumento da sensibilidade e diminuição do LD. Ademais, a modificação com NTCs pode colaborar com a diminuição do sobrepotencial para vários substratos eletroativos e aumentar a reatividade eletroquímica dos produtos enzimáticos.

Os NTCs são insolúveis em água ou em solventes comuns, contudo, uma rica variedade de estratégias foram propostas para resolver estes problemas, incluindo oxidação química com ácidos fortes, os quais ajudam a eliminar impurezas metálicas, removem as extremidades e adicionam grupos funcionais oxigenados na superfície ou extremidade dos mesmos ($-\text{COOH}$, $-\text{OH}$, $-\text{C}=\text{O}$), facilitando seu manuseio e também devido a esta funcionalização há uma maior capacidade de adsorção de moléculas biológicas (FU et al., 2002; SOUZA-FILHO; FAGAN, 2007).

1.6 DETERMINAÇÃO DE ESPIRONOLACTONA

A espirolactona (Figura 6) é um antagonista específico da aldosterona, a qual é utilizada na terapia de hipertensão (diurético de potássio), de insuficiência cardíaca congestiva e, também, de cirrose hepática.

Figura 6 – Fórmula estrutural da espirolactona.



Fonte: o próprio autor.

Para assegurar a qualidade das formulações farmacêuticas que contêm espirolactona, é de extrema importância o controle de qualidade referente a quantidade adequada em cada comprimido desta substância, devido aos perigos do uso impróprio. É importante ainda, que o conteúdo dos comprimidos seja checado e verificado se nestes estão a quantidade adequada conforme estabelecido no rótulo, antes de liberado para o consumo humano, por metodologias simples, precisas e válidas para o controle de qualidade.

Uma variedade de metodologias analíticas tem sido reportada na literatura para a determinação de espirolactona em amostras biológicas e farmacêuticas, incluindo cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) (BACHMAN; STEWART, 1990; VARIN et al., 1992; VLASE et al., 2011), espectrofotometria (PRAJAPATI et al., 2016), fluorescência (LIANG et al., 2006) e métodos eletroanalíticos utilizando eletrodos a base de mercúrio (BELAL, 1992; AL-GHAMDI; AL-GHAMDI; AL-OMAR, 2008; EL-SHAHAWI et al., 2013; SMAJDOR; PIECH; PACZOSA-BATOR, 2018).

Bachman and Stewart (1990) utilizaram CLAE com detecção eletroquímica para a determinação de espirolactona e hidroclorotiazida em

medicamentos usando metanol:tampão fosfato (65:35, v:v) como fase móvel. Para a determinação foi necessário empregar uma etapa de derivatização fotoquímica. CLAE também foi empregada para a determinação de espironolactona e seus metabólitos em fluidos biológicos após extração em fase sólida. A detecção foi UV e os autores usaram metanol:água acidificada com ácido fosfórico (65:35, v:v) como fase móvel (VARIN et al., 1992). Vlase e colaboradores (2011) utilizaram CLAE com detecção por espectrometria de massas para a determinação de espironolactona e cancerona em fluidos biológicos usando uma fase móvel consistindo de 58% de metanol, 42% de solução de acetato de amônio (10 mmol L^{-1}). Espectrofotometria UV por derivadas de primeira e segunda ordem foi empregada por Prajapati e colaboradores (2016) para a determinação de espironolactona em comprimidos usando metanol como solvente. Baseado mudanças na intensidade de luminescência da reação entre *quantum dots* CdSe e espironolactona, Liang e colaboradores (2006) desenvolveram um método analítico para a determinação desse fármaco em formulações comerciais. As amostras, reduzidas a pó foram dissolvidas em solução de clorofórmio:hexano (1:9 (v/v)) e os excipientes insolúveis foram removidos da solução com centrifugação a 12.000 rpm durante 5 minutos. Utilizando as técnicas eletroanalíticas, espironolactona foi determinada polarograficamente em tampão Britton-Robinson contendo 40% de metanol (BELAL, 1992) e voltametricamente utilizando o eletrodo gotejante de mercúrio (AL-GHAMDI; AL-GHAMDI; AL-OMAR, 2008; EL-SHAHAWI et al., 2013) e eletrodo de filme de mercúrio (SMAJDOR; PIECH; PACZOSA-BATOR, 2018).

Os métodos analíticos apresentados para a determinação de espironolactona requerem um pré-tratamento extensivo e/ou instrumentação de alto custo, aumentando o custo e a complexidade das análises. Além disso, no caso dos métodos eletroanalíticos, o uso de eletrodos de mercúrio tem sido evitado, devido a sua toxicidade. Já o emprego de um biossensor pode tornar uma alternativa na determinação de espironolactona, devido análise mais econômica, simples e rápida, sem emprego quantidades excessivas de solventes e uso de metodologias longas de preparo de amostra.

O uso de biossensores na determinação de amostras farmacêuticas ou poluentes ambientais é geralmente baseado em reações de inibição, na qual a taxa inicial da reação enzimática diminui linearmente com o aumento da

concentração de inibidores, oferecendo alta sensibilidade e seletividade (FERNANDES et al., 2011). Contudo, determinações indiretas também podem ser realizadas com o emprego desses dispositivos. Essas determinações indiretas se referem a reações paralelas que ocorrem com o substrato ou produto da reação enzimática. Por exemplo, Fatibello-Filho e Vieira (2000) determinaram ácido ascórbico em formulações farmacêuticas empregando um biossensor baseado em eletrodo de pasta de carbono modificado com extrato bruto de abobrinha como fonte de peroxidase. Nesse caso, quando ácido ascórbico foi adicionado à solução, podendo reduzir quimicamente *p*-quinona para hidroquinona ou ainda o peróxido de hidrogênio, decrescendo a corrente de pico proporcionalmente ao aumento de sua concentração. Em outro trabalho, Sartori, Vicentini e Fatibello-Filho (2011), determinaram indiretamente sulfito em vinhos empregando um biossensor voltamétrico a base de extrato bruto de batata doce como fonte enzimática de polifenoloxidase. Nesse caso, o sulfito pode reagir na reação de redução de *o*-quinona ao catecol e ainda pode reagir com a *o*-quinona pela formação de *o*-quinona-sulfito, uma vez que o sulfito é um nucleófilo forte. A cisteína foi determinada de forma indireta em formulações farmacêuticas empregando um eletrodo de pasta de carbono modificado com lacase. Nesse caso, quando a cisteína é adicionada à solução, a benzoquinona, formada na etapa enzimática, reage por meio de uma adição nucleofílica, formando o composto tiol correspondente (SANTHIAGO; VIEIRA, 2007).

A determinação voltamétrica de espirolactona, seja direta ou indiretamente, ainda não havia sido descrita na literatura com o uso de eletrodos a base de carbono, bem como o uso de biossensores enzimáticos eletroquímicos para a determinação indireta da mesma.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVOS GERAIS

Desenvolver uma nova arquitetura de biossensor enzimático empregando o ECV como transdutor eletroquímico.

Empregar o biossensor proposto no desenvolvimento de um procedimento voltamétrico para a determinação direta de dopamina e indireta de espironolactona.

Determinar a concentração de dopamina em amostras farmacêuticas e fluidos biológicos, bem como de espironolactona em amostras farmacêuticas.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Empregar a botriosferana para imobilizar a enzima lacase no ECV modificado com filme de NTCs.

Estudar a influência da quantidade de botriosferana e de lacase na confecção do biossensor.

Avaliar o biossensor proposto como eletrodo de trabalho para a determinação de dopamina, comparando-o com outros biossensores contendo lacase relatados na literatura.

Investigar o melhor valor de pH para a determinação de dopamina.

Avaliar a técnica voltamétrica de onda quadrada para a construção de curvas analíticas para a determinação de dopamina.

Determinar espironolactona por método indireto, empregando o sinal analítico obtido para dopamina.

Avaliar o efeito dos possíveis interferentes presentes nas amostras analisadas, contendo dopamina ou espironolactona, e determinar os analitos em amostras biológicas, como urina e fluido cerebrospinal, e formulações farmacêuticas.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 REAGENTES E SOLUÇÕES

Todos os reagentes utilizados nos experimentos foram de grau analítico. Dopamina, espironolactona, ácido sulfúrico e NTCs (20-30 mm de diâmetro e 0,5-2 μm de comprimento, pureza: $\geq 95\%$) foram obtidos da Sigma-Aldrich. Ácido ascórbico, ácido úrico e hexacianoferrato (III) de potássio foram obtidos da Synth. Etanol, ácido clorídrico, ácido nítrico, fosfato de potássio monobásico, fosfato de potássio dibásico e N,N-dimetilformamida (DMF) foram obtidos da Anidrol. As formulações farmacêuticas foram adquiridas em uma farmácia local na cidade de Londrina, Estado do Paraná, Brasil.

Todas as soluções foram preparadas com água ultrapura obtida a partir de um sistema Milli-Q (Millipore[®]) com resistividade superior a 18 M Ω cm.

O eletrólito suporte utilizado nos experimentos foi uma solução tampão fosfato 0,1 mol L⁻¹ (pH 6,0). Esta solução é composta de fosfato de potássio monobásico a 0,1 mol L⁻¹ com pH ajustado para 6,0 com solução de fosfato de potássio dibásico a 0,1 mol L⁻¹.

A solução padrão de dopamina foi preparada em solução tampão fosfato (pH 6,0) a cada dia de experimento, em uma concentração de 10,0 mmol L⁻¹. A solução padrão de espironolactona teve seu preparo a uma concentração de 10,0 mmol L⁻¹, conforme o dia de experimento, sendo preparada com solução tampão fosfato (pH 6,0) e adição de 50% de etanol para a solubilização.

Os NTCs foram tratados com solução de ácido clorídrico 2,0 mol L⁻¹ a fim de minimizar possíveis impurezas metálicas presentes e, em seguida foram funcionalizados utilizando uma mistura de ácido nítrico:ácido sulfúrico (3:1, v/v), como descrito na literatura (DATSYUK et al., 2008).

3.2 INSTRUMENTAÇÃO

A voltametria cíclica (VC) e voltametria de onda quadrada (VOQ) foram empregadas no desenvolvimento do método proposto utilizando o biossensor eletroquímico enzimático.

As medidas eletroquímicas foram realizadas em um potenciostato/galvanostato modelo FRA2 μ Autolab tipo III controlado com o software GPES 4.9 e acoplado a um microcomputador para aquisição dos dados. Para os experimentos voltamétricos foi utilizada uma célula eletroquímica de vidro com capacidade para 15 mL, com uma tampa de Teflon[®], com encaixes para eletrodos.

Como eletrodo de trabalho foi utilizado um biossensor enzimático eletroquímico, o eletrodo de referência foi o Ag/AgCl (3,0 mol L⁻¹ KCl) e uma placa de platina (5 mm x 5 mm) foi utilizada como eletrodo auxiliar. Um tempo de agitação de 30 s foi utilizado para homogeneizar ambas as soluções de dopamina e espirolactona na célula eletroquímica.

O pH foi medido a 25,0 \pm 0,5 °C usando um pHmetro ION, modelo pHE500, empregando um eletrodo combinado de vidro com um eletrodo de referência externo de Ag/AgCl (KCl 3,0 mol L⁻¹).

As determinações espectrofotométricas foram realizadas utilizando um espectrofotômetro UV-Vis ThermoSpectronic modelo Genesys, empregando uma cubeta de quartzo de 1 cm, acoplado a um computador.

3.3 OBTENÇÃO DO EXTRATO BRUTO DA LACASE

A enzima lacase foi obtida por fermentação submersa utilizando o fungo *Botryosphaeria rhodina* MAMB-05, como descrito por Barbosa e colaboradores (1996). O fungo foi mantido em meio BDA (batata, dextrose, ágar) a 4 °C e sub-cultivado em intervalos de três meses. Para a produção da lacase, o fungo foi transferido do meio BDA para um meio nutriente líquido contendo meio salino mínimo de Vogel (MSMV) (VOGEL, 1956), ágar (20 g L⁻¹) e glicose (10 g L⁻¹). Frascos Erlenmeyer (2 L) contendo o meio nutriente líquido composto por MSMV, álcool veratrílico como indutor de lacase e glicose (10 g L⁻¹) foram inoculados com 64 tampões de ágar (1,0 cm de diâmetro), retirados de uma placa de ágar colonizada com micélio cultivado por 96 horas. As culturas foram cultivadas por fermentação submersa em agitação (180 rpm) durante 4,5 dias a 28 °C.

Os cultivos foram colhidos por centrifugação (1250 x g / 30 minutos) separando o micélio (descartado) e o sobrenadante (coletado). Em seguida, o sobrenadante foi exaustivamente dialisado por 48 horas contra água destilada a 4

°C, e então liofilizado. O pó seco foi armazenado a -20 °C, e foi utilizado como fonte de lacase. Uma solução a 1% (m/v) do extrato bruto enzimático foi armazenada a $-6,0$ °C, e foi usada para a construção do biossensor.

A lacase foi testada em relação ao ABTS (Sigma-Aldrich; 50 mmol L^{-1}) como substrato em tampão citrato fosfato 120 mmol L^{-1} em pH 3,0 e 50 °C por 5 minutos, e o produto oxidado formado foi medido espectrofotometricamente a 420 nm ($\epsilon = 36.000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

A unidade de atividade enzimática é definida como o número de μmol de ABTS oxidado por minuto sob as condições experimentais (BARBOSA; DEKKER; HARDY, 1996), e no presente trabalho a atividade enzimática medida foi de $27,5 \text{ U mL}^{-1}$, unidade de atividade enzimática (transformação de $1 \mu\text{mol}$ por minuto).

3.4 OBTENÇÃO DA BOTRIOSFERANA

A síntese do exopolissacarídeo foi preparada de acordo com o reportado por Barbosa e colaboradores (2003).

A botriosferana foi produzida em frascos Erlenmeyer (2 L), em meio nutriente líquido (800 mL) contendo MSMV e sacarose (50 g L^{-1}) em condições de agitação (180 rpm) por 72 horas a 28 °C. Em seguida, os cultivos foram colhidos por centrifugação ($1250 \times g / 30$ minutos) separando o micélio (descartado) e o sobrenadante (coletado). O sobrenadante contendo o exopolissacarídeo foi precipitado com três volumes de etanol e o precipitado recolhido por centrifugação. Após este procedimento, o precipitado foi ressolubilizado em água destilada a 60 °C por 2 horas, dialisado contra água destilada por 48 horas, seguido de autoclavagem a 121 °C por 20 minutos para a esterilização da solução do exopolissacarídeo.

A solução obtida foi utilizada para a construção do biossensor, sendo a concentração de botriosferana utilizada neste trabalho de $0,7 \text{ g L}^{-1}$.

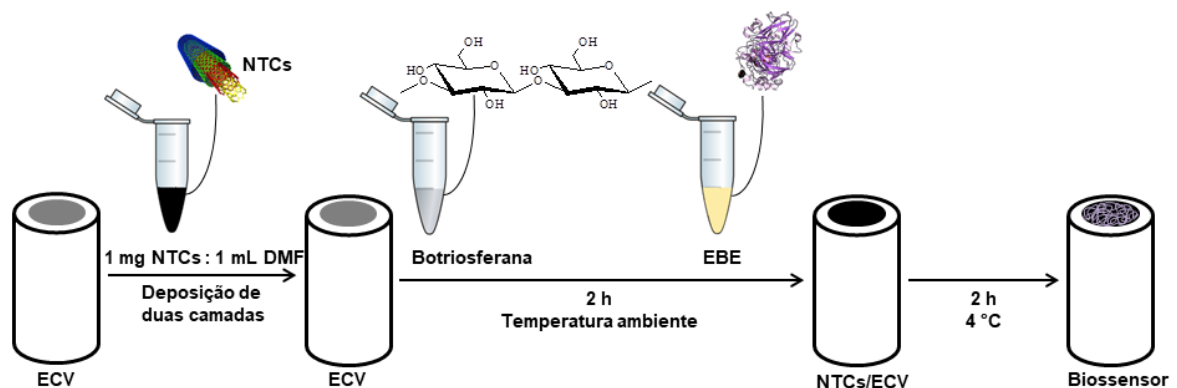
3.5 IMOBILIZAÇÃO DA ENZIMA LACASE EM BOTRIOSFERANA PARA A CONSTRUÇÃO DO BIOSENSOR

A suspensão de $1,0 \text{ mg mL}^{-1}$ de NTCs foi obtida adicionando-se, com o auxílio de uma micropipeta, $1,0 \text{ mL}$ de DMF em $1,0 \text{ mg}$ de NTCs, previamente pesados em uma balança analítica. Posteriormente, a suspensão foi mantida em banho ultrassônico durante 120 minutos. Como eletrodo base, foi utilizado um ECV de 3 mm de diâmetro fabricado pela Tokay Carbon Co., Japão. Antes do uso, o ECV foi polido com suspensão de alumina de $0,3 \text{ mm}$ em um pano de polimento, seguido de lavagem com água ultrapura e seco em temperatura ambiente.

Para a construção do biossensor, a enzima lacase obtida pelo fungo *Botryosphaeria rhodina* MAMB-05 foi utilizada na forma de extrato bruto enzimático (EBE), garantindo menor custo em comparação a sua forma isolada e purificada.

Sobre a superfície do ECV, foi adicionada uma camada de suspensão de $5,0 \text{ }\mu\text{L}$ de NTCs em DMF, e mantido a temperatura ambiente para secagem, e em seguida realizou-se o procedimento novamente. Após a secagem, adicionou-se, $5,0 \text{ }\mu\text{L}$ de botriosferana sobre a superfície do ECV modificado com suspensão de NTCs em DMF, e após adicionou-se $5 \text{ }\mu\text{L}$ do EBE de lacase, deixando-o sob temperatura baixa ($4 \text{ }^\circ\text{C}$), durante o período de 2 h . Para armazenamento do biossensor, este foi mantido mergulhado em um suporte contendo solução tampão fosfato (pH 6,0) a $4 \text{ }^\circ\text{C}$, quando fora de utilização. A Figura 7 representa o esquema do processo de obtenção do biossensor mencionado.

Figura 7 – Representação esquemática do preparo do biossensor proposto.



Fonte: o próprio autor.

3.6 PROCEDIMENTOS ANALÍTICOS

Para obtenção da curva analítica, adicionou-se alíquotas da solução padrão do composto fenólico na célula eletroquímica utilizada, a qual continha 10 mL de solução tampão fosfato (pH 6,0). As análises foram realizadas em triplicata para cada ponto da curva, para uma melhor avaliação da confiabilidade e repetibilidade dos resultados.

Os voltamogramas foram obtidos através de sucessivas adições de dopamina no interior da célula eletroquímica, utilizando a técnica de VOQ num intervalo de potencial de 0,40 – 0,10 V.

O limite de detecção e de quantificação (LQ) foram calculados de acordo com a recomendação da IUPAC, sendo $3 \times S/M$ e $10 \times S/M$, respectivamente, em que S é o desvio padrão obtido para 10 medidas do branco e M o coeficiente angular da curva analítica (LONG; WINEFORDNER, 1983).

Para a obtenção da curva analítica referente a determinação indireta da espirolactona, foi utilizado o mesmo intervalo de potencial empregado para a determinação direta da dopamina. Neste caso, à célula eletroquímica contendo solução de tampão fosfato (pH 6,0), foi adicionado sob agitação, $7,4 \mu\text{mol L}^{-1}$ de dopamina, gerando um pico de corrente catódica para este composto fenólico. Em seguida, adicionou-se alíquotas de espirolactona para avaliar a diminuição do pico de redução da dopamina, obtendo assim, uma curva analítica para a espirolactona.

3.7 PREPARO DAS AMOSTRAS FARMACÊUTICAS E DOS FLUIDOS BIOLÓGICOS SINTÉTICOS PARA A DETERMINAÇÃO DE DOPAMINA

A amostra farmacêutica de dopamina (solução injetável de $5,0 \text{ mg mL}^{-1}$) foi preparada diluindo-se $307 \mu\text{L}$ desta solução em um balão volumétrico calibrado de 10 mL com solução tampão fosfato (pH 6,0). Em seguida, $150 \mu\text{L}$ da solução preparada foi transferida para a célula eletroquímica contendo a solução de tampão fosfato (pH 6,0) para a quantificação.

Os resultados obtidos com o método proposto para a determinação de dopamina em amostras farmacêuticas foi comparado com o método

espectrofotométrico recomendado na Farmacopeia Britânica (BRITISH PHARMACOPOEIA COMMISSION, 2009).

A solução de fluido cerebrospinal sintético foi preparado conforme descrito na literatura (ZHANG et al., 2001; TOLEDO et al., 2005), dissolvendo-se 2,1 g de NaCl, 0,07 g de KCl, 0,08 g de CaCl₂, 0,2 g de glicose, 0,4 g de NaHCO₃ e 0,002 g de uréia em um balão volumétrico calibrado de 250 mL, sendo esta solução usada imediatamente após o preparo, para evitar a hidrólise da uréia. A urina sintética foi preparada dissolvendo-se 0,73 g de NaCl, 0,40 g de KCl, 0,28 g de CaCl₂.2 H₂O, 0,56 g de Na₂SO₄, 0,35 g de KH₂PO₄, 0,25 g de NH₄Cl e 6,25 g de uréia em um balão volumétrico de 250 mL, como previamente descrito na literatura e também utilizada imediatamente após o preparo (LAUBE; MOHR; HESSE, 2001).

Uma alíquota de 100 µL de cada amostra biológica foi adicionada à célula eletroquímica contendo solução tampão fosfato (pH 6,0), juntamente com 3,98 e 7,94 µmol L⁻¹ de dopamina. A análise das amostras foi realizada utilizando o método de adição de padrão.

3.8 PREPARO DAS AMOSTRAS FARMACÊUTICAS PARA A DETERMINAÇÃO DE ESPIRONOLACTONA

Para a preparação das amostras farmacêuticas de espironolactona, um total de 10 comprimidos de cada formulação foram macerados e reduzidos a um pó fino e homogêneo em um almofariz com auxílio de um pistilo.

Em seguida, pesou-se uma quantidade referente à massa de um comprimido e transferiu-se para um balão volumétrico contendo 10 mL de solução tampão fosfato (pH 6,0). Em seguida, alíquotas de 17,0 e 33,0 µL desta solução foram transferidos para a célula eletroquímica contendo 10,0 mL do eletrólito suporte, juntamente com 7,50 µmol L⁻¹ de dopamina e quantificado após sucessivas adições de solução espironolactona. Através deste procedimento pode-se obter os voltamogramas de onda quadrada.

A concentração de espironolactona em cada solução da amostra foi determinado em triplicata pelo método de adição de padrão. O método espectrofotométrico para determinação de espironolactona descrito pela Farmacopeia Brasileira foi usado para comparar os resultados analíticos obtidos

usando o biossensor proposto (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2010).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 IMOBILIZAÇÃO DA ENZIMA LACASE NO ELETRODO DE CARBONO VÍTREO MODIFICADO VIA EXOPOLISSACARÍDEO BOTRIOSFERANA

A imobilização da enzima lacase em uma matriz sólida é um fator chave na preparação do biossensor e esforços têm sido concentrados no controle da atividade enzimática e na estabilidade. A adsorção direta de enzimas em superfícies sólidas pode promover uma imobilização rápida e simples, mantendo a função biológica específica da enzima.

No presente trabalho, a enzima lacase foi imobilizada pelo método de adsorção física sobre a superfície do ECV modificado com NTCs utilizando o exopolissacarídeo botriosferana. Esta imobilização da enzima lacase na botriosferana pode ocorrer devido a formação de pontes de hidrogênio pelos grupamentos hidroxilas e carboxilas da enzima lacase com os grupos hidroxilas presentes na estrutura do exopolissacarídeo. Esta interação é de muita valia devido aos dois materiais biológicos serem originados do mesmo fungo. Sendo assim, a botriosferana é biocompatível com a enzima e proporciona um ambiente natural para esta.

Além das interações com a enzima lacase, há também interação da botriosferana com os NTCs, para que haja a formação de um filme imobilizador da enzima na superfície do ECV. Os grupos carboxilas presentes no filme de NTCs funcionalizados, interagem por ligações de hidrogênio com os grupos hidroxilas do exopolissacarídeo, fornecendo uma maior estabilidade ao sistema.

Este polissacarídeo insolúvel em água é uma matriz muito atrativa para imobilização da enzima e, conseqüentemente, um excelente material para a construção de novas arquiteturas de biossensores.

Vale a pena mencionar que não foi observada uma dispersão homogênea de NTCs preparados diretamente na solução de botriosferana, sendo então este exopolissacarídeo adicionado junto com a enzima diretamente sobre filme NTCs formado na superfície do ECV.

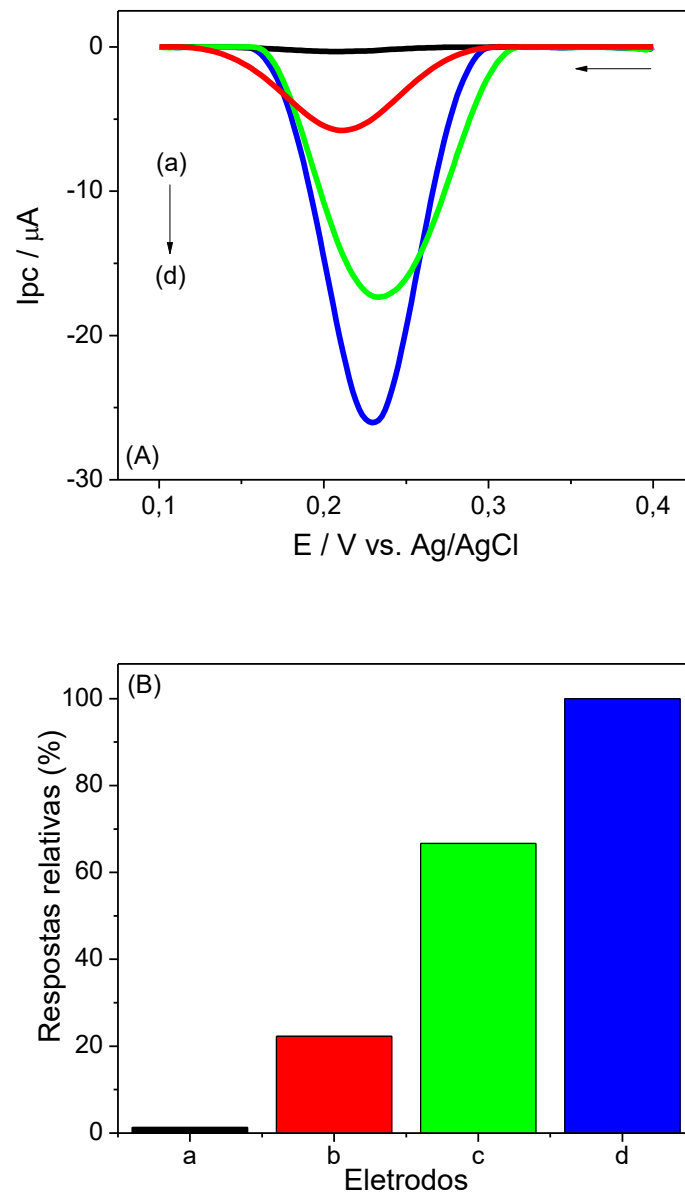
4.2 RESPOSTA ELETROQUÍMICA DO BIOSENSOR PROPOSTO PARA DOPAMINA

Para verificar a habilidade eletrocatalítica do biossensor proposto, a dopamina foi utilizada como analito alvo, devido a esta ser um típico composto fenólico. É conhecido que a dopamina é uma molécula eletroativa e que a enzima lacase catalisa a oxidação de dopamina à dopamina quinona enquanto que o oxigênio molecular em solução é reduzido para água. Subsequentemente, o produto formado é eletroquimicamente reduzido na superfície do biossensor em 0,23 V regenerando a dopamina. O pico de corrente obtido na redução eletroquímica da dopamina quinona no biossensor proposto é proporcional à concentração de dopamina na solução e é usado para determinação do analito em amostras reais.

A Figura 8 exhibe os voltamogramas de onda quadrada obtidos utilizando o ECV, botriosferana/ECV, botriosferana-NTCs/ECV e lacase-botriosferana-NTCs/ECV em solução tampão fosfato (pH 6,0) na presença de 39,8 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de dopamina. Pelos voltamogramas apresentados na Figura 8, observou-se um aumento discreto no pico de corrente catódica do ECV modificado com botriosferana (curva b) comparado ao ECV sem qualquer modificação (curva a). Este resultado sugere que a presença da botriosferana na superfície do ECV promove um acúmulo de espécies na superfície eletródica, possivelmente pelas interações do tipo ligação de hidrogênio entre os grupos hidroxila na estrutura do exopolissacarídeo e grupos amino e hidroxila da molécula de dopamina. Quando o ECV é modificado com NTCs e botriosferana (curva c), um aumento na resposta ocorre devido à alta condutividade eletrônica apresentada pelo nanomaterial.

A presença da lacase no eletrodo (curva d) causou um aumento no pico da corrente catódica para a dopamina, o qual foi quase 81 vezes melhor do que aquele observado para o ECV não modificado. Esta diferença entre os sinais analíticos se deve pela ação catalítica da enzima na reação redox que ocorre na superfície do eletrodo combinado com as propriedades dos NTCs e botriosferana. A curva (d) também indica que a utilização do exopolissacarídeo é adequada para a construção do biossensor proposto, promovendo estabilidade na imobilização da lacase.

Figura 8 – (A) Voltamogramas de onda quadrada obtidos utilizando o ECV (a), botriosferana/ECV (b), botriosferana-NTCs/ECV (c) e lacase-botriosferana-NTCs/ECV (d) em solução tampão fosfato (pH 6,0) contendo $39,8 \mu\text{mol L}^{-1}$ de dopamina. Condições de VOQ: $f = 30 \text{ Hz}$, $a = 50 \text{ mV}$, $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$. (B) Respostas relativas (%) para os respectivos eletrodos.



4.3 OTIMIZAÇÃO DA RESPOSTA DO BIOSENSOR PARA A DOPAMINA E CONDIÇÕES ANALÍTICAS

Os parâmetros relacionados à fabricação do biossensor e as condições experimentais do método proposto foram investigados utilizando a VOQ.

Para melhores resultados durante a análise, foi avaliada a quantidade de NTCs sobre a superfície do ECV, juntamente com a lacase imobilizada na botriosferana, isto é, o biossensor com camadas diferentes de NTCs.

Foram realizadas análises com 3 quantidades diferentes de NTCs. Inicialmente apenas uma camada de 5,0 μL de NTCs foi adicionada sobre a superfície limpa do ECV e mantido à temperatura ambiente para a secagem, durante 2 h. Em seguida, adicionou-se duas camadas de NTCs de 5,0 μL , uma após a secagem da anterior. E por último a adição de 3 camadas, seguindo o mesmo procedimento das análises anteriores. Os resultados obtidos permitiram observar um maior sinal analítico quando duas camadas foram utilizadas, proporcionando um filme relativamente homogêneo e aderente na superfície do ECV.

O efeito da concentração da lacase na preparação do biossensor foi investigado por meio da resposta analítica da dopamina utilizando 3,0 μL , 5,0 μL e 7,0 μL de solução enzimática imobilizada no exopolissacarídeo depositado sobre a superfície do ECV. Uma maior magnitude de sinal analítico (pico de corrente catódica) foi obtida quando se utilizou 5,0 μL da solução de enzima imobilizada na botriosferana, em comparação à utilização de 3,0 μL e 7,0 μL de EBE. O aumento da concentração da lacase pode causar sua aglomeração no filme de botriosferana formado no ECV modificado, reduzindo o número de sítios ativos e, também, diminuindo a condutividade do biossensor. Baseado nos resultados, uma alíquota de 5,0 μL de solução enzimática foi usada como valor ótimo para construção do biossensor.

A influência do pH também foi avaliada para o pico de redução da dopamina, utilizando soluções tampão fosfato em um intervalo de 4,0 – 8,0. O pH do meio pode afetar os grupos ionizáveis da estrutura enzimática e do exopolissacarídeo, influenciando a resposta eletrocatalítica do biossensor. Dos resultados mostrados na Figura 9A, a maior resposta voltamétrica para dopamina foi registrada no pH 7,0; entretanto, o pH 6,0 foi utilizado em estudos posteriores devido a uma melhor repetibilidade dos sinais analíticos. De acordo com a literatura (XU, 1997; CANNATELLI; RAGAUSKAS, 2017), no pH 8,0 o OH^- se liga no sítio ativo da

enzima, diminuindo sua atividade biológica e apresentando menor intensidade e pouca repetibilidade dos sinais analíticos. Em seguida, a Figura 9B mostra que a variação linear entre o potencial de pico e o pH forneceu um coeficiente angular de $-55,8 \text{ mV pH}^{-1}$ ($r = 0,9953$). Este valor é próximo ao esperado para sistemas Nerstianos, indicando que no processo de oxirredução da dopamina estão envolvidos o mesmo número de prótons e elétrons, como reportado na literatura e pode ser observado na Figura 10 (XIANG et al., 2007; KUTLUAY; ASLANOGLU, 2014).

Em seguida, os parâmetros instrumentais relacionados à VOQ foram estudados a fim de se obter um pico definido e de maior magnitude de corrente para determinação da dopamina. Os intervalos estudados para estes parâmetros foram frequência (f) = 10 – 60 Hz, amplitude de pulso (a) = 10 – 100 mV e incremento de varredura (ΔE_s) = 1 – 3 mV. Os valores ótimos selecionados para determinação de dopamina por VOQ foram $f = 20 \text{ Hz}$, $a = 75 \text{ mV}$ e $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$. Sob estas condições, a curva analítica foi obtida em solução tampão fosfato (pH 6,0).

A curva analítica foi construída a partir dos resultados obtidos do pico de corrente catódica *versus* a concentração de dopamina. O tempo de resposta do biossensor para dopamina foi de 2 segundos, o qual indica uma rápida reação do composto fenólico. A redução eletroquímica da dopamina quinona sobre a superfície do biossensor foi obtida em $+0,23 \text{ V}$ (Figura 11A). Uma relação linear entre a corrente (μA) e concentração de dopamina foi obtida em um intervalo de $2,99 - 38,5 \mu\text{mol L}^{-1}$ (Figura 11B), com a seguinte equação de regressão linear $I_{pc} (\mu\text{A}) = -1,60 + 0,639 [c (\mu\text{mol L}^{-1})]$ ($r = 0,9994$); onde I_{pc} é o pico de corrente catódica e c a concentração da dopamina, com um LD e LQ de $0,127 \mu\text{mol L}^{-1}$ e $0,423 \mu\text{mol L}^{-1}$, respectivamente.

Figura 9 – (A) Voltamogramas de onda quadrada obtidos utilizando o biossensor proposto para $0,10 \text{ mmol L}^{-1}$ de dopamina em solução tampão fosfato em diferentes valores de pH: 4,0 até 8,0; (B) Influência do pH no pico de corrente catódica e o pico de potencial do biossensor proposto. Condições de VOQ: $f = 30 \text{ Hz}$, $a = 50 \text{ mV}$ e $\Delta E_s = 2 \text{ mV}$.

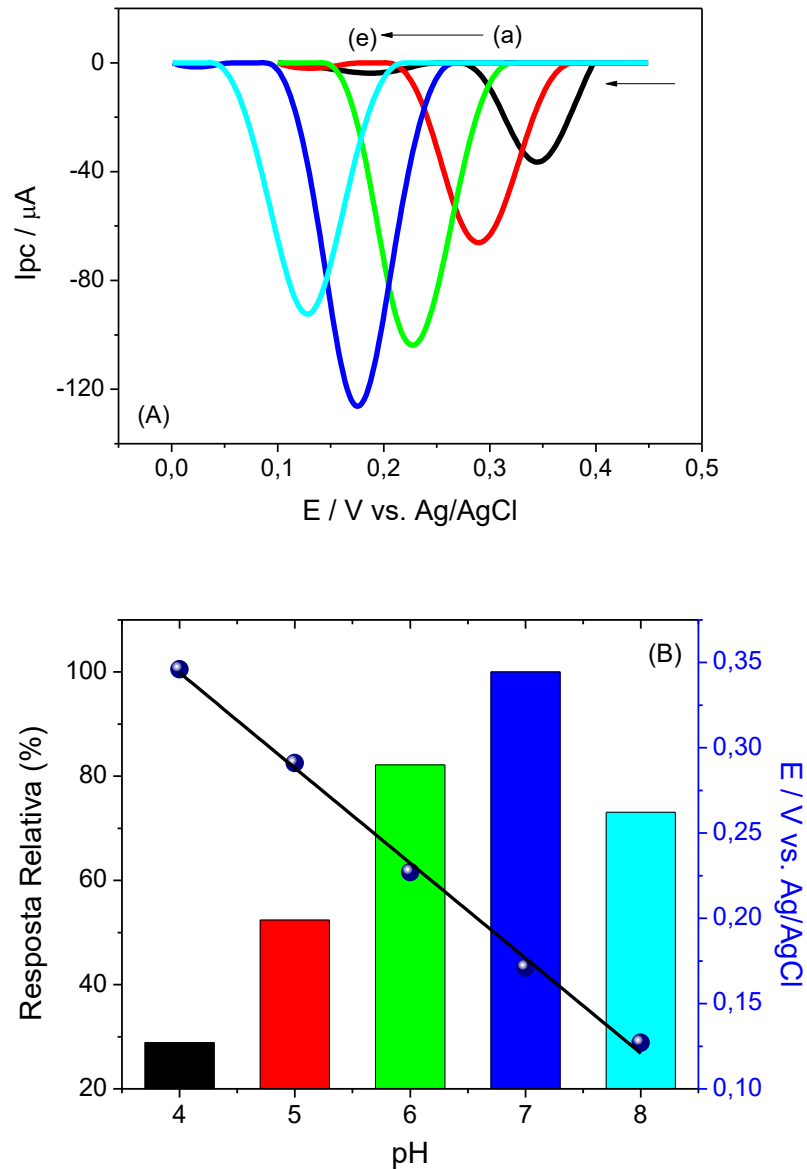


Figura 10 – Mecanismo proposto para o processo de oxirredução da dopamina.

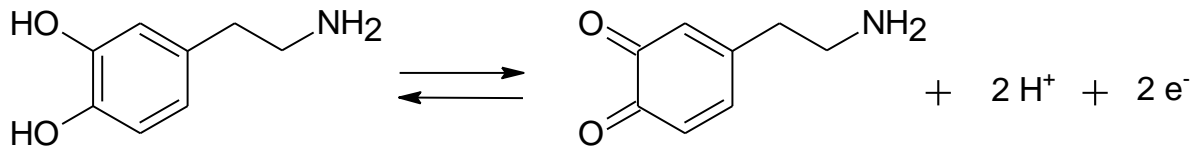
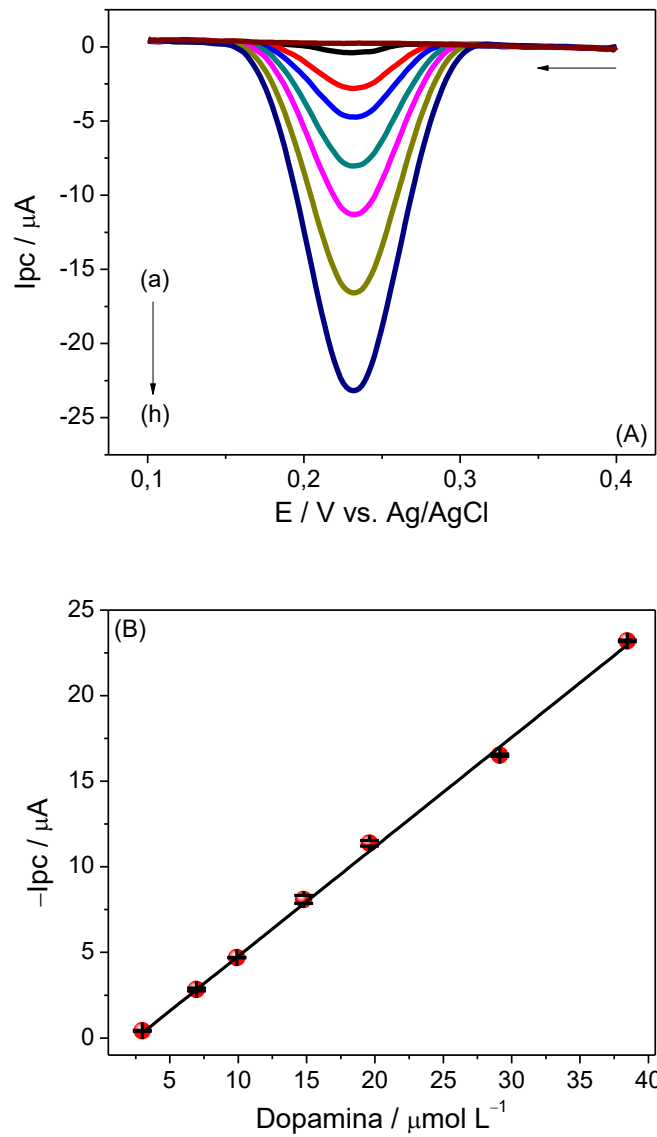


Figura 11 – (A) Voltamogramas de onda quadrada obtidos em solução tampão fosfato (pH 6,0) utilizando o biossensor proposto para as seguintes concentrações de dopamina: (b – h): 2,99 – 38,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$. (B) Curva analítica correspondente.



O desempenho analítico do biossensor proposto foi comparado com outros biossensores previamente reportados baseados em lacase para a determinação de dopamina, como mostrado na Tabela 1.

Os dados comparativos mostraram o excelente desempenho do biossensor proposto em termos de LD relativamente baixo com um intervalo linear mais amplo para dopamina do que os outros. Além disso, o biossensor proposto tem vantagens sobre outros biossensores enzimáticos previamente reportados, no que refere a não necessidade do uso de reagentes de ligações cruzadas, não apresentou lixiviação da enzima para a solução durante uso e não é afetado pelas condições do ambiente externo, devido ao ambiente protetor proporcionado pelo uso da botriosferana. Deste modo, o biossensor proposto é uma alternativa satisfatória para determinação de dopamina em amostras reais.

Tabela 1 – Comparação dos resultados obtidos para determinação da dopamina utilizando o biossensor proposto e outros reportados na literatura.

Biossensor	Técnica	Faixa linear ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	LD ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Referência
NPsAu-PCA-lacase/EPC	VOQ	0,49 – 23,0	0,26	(SILVA; VIEIRA, 2016)
lacase/Si/NTCs/ETI	VPD	1,3 – 85,5	0,42	(LI et al., 2012)
lacase/SiO ₂ /ECV	Amperometria	0,99 – 138,40	0,17	(ZHAO et al., 2014)
lacase-CDBA-OGr/ETI	VPD	0,1 – 70	0,03	(HUA et al., 2015)
lacase-AM/EAu	VPD	0,5 – 13,0 e 47,0 – 430,0	0,029	(SHERVEDANI; AMINI, 2012)
NTCs/PPR/lacase	VPD	0,5 – 4,75	0,14	(CESARINO et al., 2013)
lacase-NPsSiO ₂ -AF	Amperometria	0,99 – 103,10	0,26	(WANG et al., 2014)
lacase-botriosferana-NTCs/ECV	VOQ	2,99 – 38,5	0,127	Este trabalho

A repetibilidade do biossensor proposto foi examinada pela medida de corrente catódica utilizando a VOQ em solução tampão fosfato (pH 6,0) contendo $14,8 \mu\text{mol L}^{-1}$ de dopamina, obtendo um desvio padrão relativo (DPR (%)) de 3,6% para 10 medidas sucessivas utilizando o mesmo biossensor, demonstrando sua viabilidade para repetitivas determinações.

A reprodutibilidade na fabricação do biossensor proposto foi avaliada pela corrente obtida de $14,8 \mu\text{mol L}^{-1}$ de dopamina em solução tampão fosfato (pH 6,0) para três biossensores construídos independentemente. Um valor de DPR de 4,3% foi obtido, confirmando que os resultados são altamente reprodutíveis.

A estabilidade do biossensor lacase-botriosferana-NTCs/ECV, foi avaliada em relação ao armazenamento a longo prazo. O sinal analítico de $0,38 \text{ mmol L}^{-1}$ de dopamina foi monitorado durante um período de 60 dias, e após cada medida, o biossensor foi lavado e armazenado a $4 \text{ }^\circ\text{C}$ em solução tampão fosfato (pH 6,0), sem contato com o meio ambiente.

Destes experimentos, uma diminuição de 13,8% da resposta do pico de corrente catódica da dopamina foi observada depois de 60 dias, com estabilidade de 200 medidas sem perda da atividade enzimática. A boa estabilidade pode ser descrita devido à efetiva imobilização da enzima lacase no ECV via botriosferana. Este exopolissacarídeo provém uma matriz adequada para a imobilização da enzima e construção do biossensor, mantendo a atividade enzimática.

Estudos cinéticos da lacase imobilizada foram realizados para várias concentrações de dopamina em solução tampão fosfato (pH 6,0). A constante aparente de Michaelis-Menten (K_m^{app}) foi calculada a partir de um gráfico de Lineweaver-Burk ($1/I$ vs. $1/\text{concentração}$) (dados não mostrados). A partir destes dados, o valor de K_m^{app} calculado foi de $0,143 \text{ mmol L}^{-1}$. O pequeno valor de K_m^{app} indicou que a lacase imobilizada no exopolissacarídeo botriosferana possui alta atividade enzimática para determinação de dopamina.

4.4 SELETIVIDADE E APLICAÇÃO ANALÍTICA PARA A DETERMINAÇÃO DE DOPAMINA

Com a finalidade de avaliar a seletividade do método analítico proposto, a influência de alguns compostos concomitantes na resposta do biossensor foi investigada. Compostos fenólicos como acetaminofeno, epinefrina,

guaiacol, catecol e hidroquinona foram escolhidos para o estudo. Outros compostos como ácido ascórbico e ácido úrico foram escolhidos do grupo de substâncias comumente encontrados com dopamina em amostras biológicas, consistindo nos principais interferentes na determinação eletroquímica deste composto fenólico nestes tipos de amostras.

A seletividade foi avaliada pela adição destes possíveis interferentes em uma solução padrão contendo $19,6 \mu\text{mol L}^{-1}$ de dopamina, na proporção (solução padrão: interferente) de 1:1 e 1:10, e ainda 1:1000 apenas para o ácido ascórbico. Os sinais de corrente obtidos foram comparados com aqueles obtidos com a solução padrão utilizando medidas VOQ (dados não mostrados).

Os compostos fenólicos investigados apresentaram um potencial de oxidação com valores similares aos obtidos pela dopamina, o qual sugere que o biossensor, lacase-botriosferana-NTCs/ECV não é específico, mas é seletivo. Além do mais, nenhuma mudança significativa foi observada no pico de corrente da dopamina na presença de ácido úrico, indicando que o mesmo não apresenta interferência significativa ($< 1,0\%$) na determinação da dopamina. De acordo com a literatura, ácido ascórbico pode reduzir quimicamente a dopamina quinona em dopamina, resultando em uma diminuição do pico de corrente catódica (BALDRIAN, 2006). Entretanto, o ácido ascórbico pode ser eliminado tratando a solução da amostra com pedaços de pepino (*Cucumis sativus* L.). Deste modo, o biossensor pode ser usado para a determinação de dopamina na presença deste composto sem interferência significativa no sinal analítico.

Para verificar a aplicabilidade do biossensor proposto na determinação de dopamina em amostras reais, amostras farmacêuticas, de urina sintética e de fluido cerebrospinal sintético foram empregadas.

A concentração de dopamina na solução injetável comercial ($5,0 \text{ mg mL}^{-1}$) foi determinada utilizando o biossensor proposto e o método espectrofotométrico, para fins comparativos. As análises foram realizadas em triplicatas e a concentração de dopamina determinada foi $4,92 \pm 0,02 \text{ mg mL}^{-1}$ utilizando o biossensor proposto, e $4,97 \pm 0,03 \text{ mg mL}^{-1}$ utilizando o método espectrofotométrico. A recuperação obtida para dopamina na amostra farmacêutica analisada foi cerca de 101%, indicando que não houve interferência significativa da matriz da amostra na determinação de dopamina.

O biossensor proposto foi também utilizado para a determinação de dopamina em urina sintética e fluido cerebrospinal sintético pelo método de adição padrão (Tabela 2). Em cada amostra foi adicionado duas concentrações de dopamina: 3,98 e 7,94 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Como pode ser visto, o biossensor proposto exibiu recuperações adequadas e, portanto, pode-se concluir que os métodos são potencialmente aplicáveis na determinação de dopamina em amostras biológicas, sem nenhum efeito significativo da matriz da amostra.

Tabela 2 – Resultados obtidos na determinação de dopamina em amostras de urina sintética e fluido cerebrospinal sintético pelo biossensor e método proposto.

Amostras	Adicionado ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Determinado ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Recuperado (%)
Urina			
1	3,98	3,89 \pm 0,04	97,7
2	7,94	7,99 \pm 0,02	101
Fluido cerebrospinal			
1	3,98	4,05 \pm 0,05	102
2	7,94	7,87 \pm 0,07	99,1

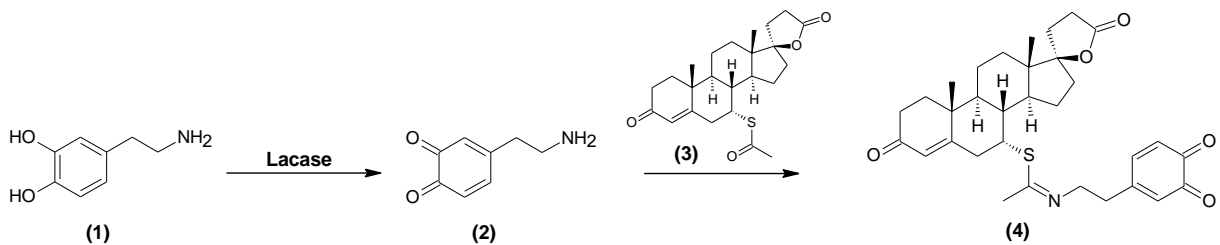
4.5 APLICAÇÃO DO BIOSENSOR PROPOSTO NA DETERMINAÇÃO INDIRETA DE ESPIRONOLACTONA

O biossensor proposto foi utilizado para a determinação indireta de espironolactona. Neste estudo, uma diminuição do pico de corrente catódica proporcional ao aumento da concentração de espironolactona foi observada.

A Figura 12 ilustra o esquema da reação entre a dopamina quinona e espironolactona ocorrendo na superfície do biossensor. A dopamina (composto 1) é oxidada enzimaticamente para dopamina quinona (composto 2) no biossensor. Em seguida, ocorre, provavelmente, um ataque nucleófilo da amina primária da quinona (composto 2) à carbonila ligada ao átomo de enxofre da espironolactona (composto 3) quando adicionada à solução. De acordo com a literatura (CLAYDEN

et al., 2001), as reações de cetonas com aminas pode formar iminas em valores de pH entre 4,0 – 6,0. O pH 6,0 usado no estudo permitiu que a reação ocorresse e resultasse na formação da imina (composto 4). Conseqüentemente, um impedimento do ciclo entre a dopamina quinona e dopamina pode ocorrer, resultando em uma diminuição da corrente de pico catódico proporcional ao aumento da concentração de espironolactona.

Figura 12 – Representação esquemática da oxidação enzimática da dopamina (1) para dopamina quinona (2) no biossensor e a reação com espironolactona (3) para formação de imina (4).



As concentrações de 3,0, 7,4 e 9,9 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de dopamina na curva analítica foram analisadas para a construção da curva de inibição da espironolactona, na qual melhor resposta (sensibilidade e linearidade) foi obtida com concentração de dopamina de 7,4 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Quando a corrente atingiu um estado estacionário, voltamogramas de onda quadrada foram obtidos para cada adição de diferentes concentrações de espironolactona.

Foi observado que o pico de corrente catódica para dopamina quinona diminuiu com o aumento da concentração de espironolactona, como observado na Figura 13. Essa figura retrata a curva analítica obtida para concentração de espironolactona num intervalo de 2,97 a 28,9 $\mu\text{mol L}^{-1}$ para qual é correspondente a equação de regressão $I_{pc}/\mu\text{A} = -0,014 + 0,032 [c (\mu\text{mol L}^{-1})]$ ($r = 0,9951$), onde I_{pc} é o pico de corrente catódica e c a concentração de espironolactona. Os valores de LD e LQ foram de 0,94 $\mu\text{mol L}^{-1}$ e 3,12 $\mu\text{mol L}^{-1}$, respectivamente. Esta curva analítica foi utilizada para a determinação de espironolactona em amostras farmacêuticas com diferentes dosagens.

O resultado da determinação analítica de espironolactona pelo método proposto apresentou um baixo LD, podendo ser utilizado como um método alternativo a outros métodos analíticos descritos na literatura para este propósito

(Tabela 3). Além disso, os métodos analíticos reportados na literatura para a determinação de espirolactona apresentaram algumas desvantagens frente ao método proposto, como alto custo de aquisição e manutenção, metodologias com derivatizações, uso de solventes orgânicos e de alta toxicidade (metanol, acetonitrila, hexano), e ainda, nos casos dos métodos eletroanalíticos, utilização de eletrodos a base de mercúrio. Assim sendo, o biossensor proposto apresenta-se como uma alternativa viável para a determinação de espirolactona, com excelente desempenho, simplicidade de uso, estabilidade, baixo tempo de análise e mínimo uso de quantidades de etanol para a dissolução das amostras/analito.

Figura 13 – (A) Voltamogramas de onda quadrada obtidos em solução tampão fosfato (pH 6,0) utilizando o biossensor proposto para (a) $7,4 \mu\text{mol L}^{-1}$ de dopamina e (b) 2,97, (c) 4,94, (d) 9,83, (e) 14,7, (f) 19,5, (g) 24,2 e (h) $28,9 \mu\text{mol L}^{-1}$ de espironolactona. (B) Curva analítica correspondente.

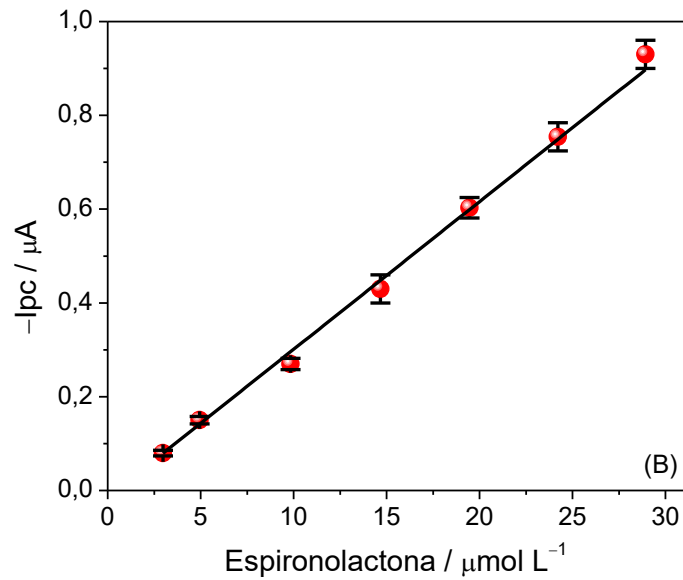
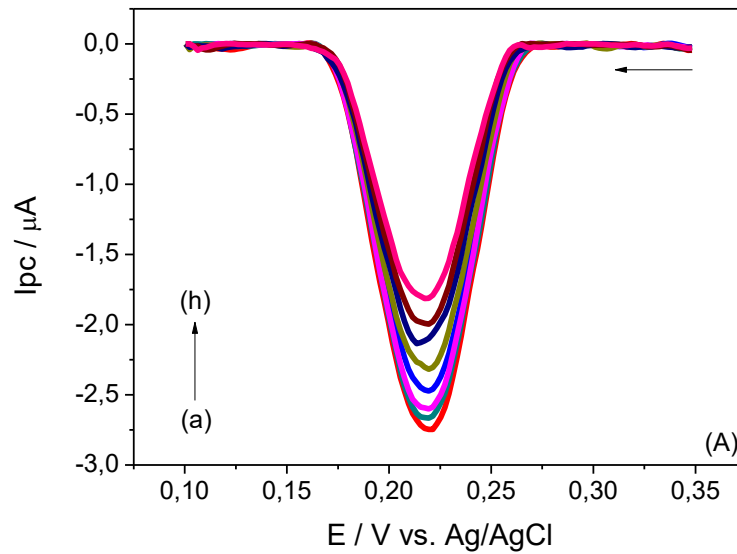


Tabela 3 – Comparação de parâmetros obtidos usando o biossensor proposto e outros métodos analíticos para determinação de espirolactona.

Técnica	Faixa linear ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	LD ($\mu\text{mol L}^{-1}$)	Referência
CLAE – Proteólise – Detecção eletroquímica	10 - 50	0,10	(BACHMAN; STEWART, 1990)
CLAE – Extração em fase-sólida – Detecção UV	0,015 – 0,96 e 0,075 – 4,8	–	(VARIN et al., 1992)
CLAE – Detecção por espectrometria de massas	0,0066 – 0,44	–	(VLASE et al., 2011)
Espectrofotometria derivativa UV	12 – 84	–	(PRAJAPATI et al., 2016)
Fluorescência – Quantum dots de CdSe	6,0 – 1680	0,48	(LIANG et al., 2006)
Polarografia – Eletrodo gotejante de mercúrio	2,5 – 100	0,10	(BELAL, 1992)
VOQ – Reação de inibição enzimática	2,97– 28,9	0,94	Este trabalho

A Tabela 4 apresenta os valores de quantidade de espironolactona determinados em formulações farmacêuticas empregando o biossensor proposto e método espectrofotométrico oficial, descrito pela Farmacopeia Brasileira. Foram realizadas 3 determinações de cada amostra e calculou-se o desvio padrão. Como pode ser visto na tabela, não foram observadas diferenças significativas entre as concentrações de espironolactona encontradas nas amostras farmacêuticas empregando o biossensor proposto juntamente com a VOQ e o método espectrofotométrico.

Aplicando o test-*t* pareado para os resultados obtidos entre ambos os métodos, o valor de *t* calculado (2,38) foi menor do que o valor crítico (4,30, $\alpha = 0,05$), indicando que os resultados obtidos com o procedimento proposto não possuíram diferenças estatísticas com o método comparativo, com um nível de confiança de 95 %. Entretanto, o método eletroquímico apresentou vantagens como menor tempo de análise e mínima geração de resíduos.

Tabela 4 – Determinação de espironolactona em amostras farmacêuticas pelo método de VOQ usando o biossensor proposto e pelo método espectrofotométrico.

Amostras	Espironolactona (mg/comprimido)			Erro relativo ^b (%)
	Rotulado	VOQ ^a	Espectrofotométrico	
A	25,0	26,5 ± 0,02	25,4 ± 0,04	4,3
B	25,0	25,9 ± 0,04	25,6 ± 0,03	1,2
C	50,0	51,9 ± 0,08	52,3 ± 0,06	-0,8

^aMédia de 3 medições. ^bErro Relativo (%) = 100 × (Método VOQ – Método espectrofotométrico/ método espectrofotométrico).

5 CONCLUSÃO

O biossensor proposto foi construído com lacase imobilizada em exopolissacarídeo botriosferana em um ECV modificado com NTCs. Esta nova arquitetura de biossensor foi aplicada com sucesso na determinação de dopamina em amostras farmacêuticas e biológicas. As respostas obtidas para a dopamina (sensibilidade, seletividade, tempo de resposta e estabilidade) foram satisfatórias, demonstrando a viabilidade do novo biossensor proposto. O bom desempenho analítico apresentado pelo biossensor pode ser atribuído a eficiente imobilização da lacase no ECV modificado. O biomaterial botriosferana mostrou ser uma matriz eficiente para a imobilização da enzima lacase, provando ser um ambiente biocompatível pelo aumento da estabilidade, sem afetar a atividade enzimática e sem lixiviar para a solução.

Os resultados obtidos provaram que o método de imobilização proposto foi efetivo, não sendo necessário a utilização de reagentes de ligações cruzadas, mostrando ótimo potencial para fabricação de novos biossensores. Ademais, a espirolactona pode reagir com a dopamina quinona formada pela oxidação enzimática da dopamina no biossensor e a diminuição do pico de corrente catódica foi empregada com sucesso para quantificar este analito em medicamentos.

O resultado obtido para a quantificação de dopamina e espirolactona em medicamentos estão de acordo com aqueles obtidos empregando-se a espectrofotometria. Além disso, o biossensor proposto exibe um excelente desempenho analítico para compostos fenólicos, de forma rápida, simples operação, reutilizável e econômica.

6 REFERÊNCIAS

- ABDULBARI, H. A.; BASHEER, E. A. M. Electrochemical biosensors: electrode development, materials, design, and fabrication. **ChemBioEng Reviews**, n. 2, p. 92–105, 2017.
- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Farmacopeia Brasileira**. 5. ed. v. 2. Brasília: Anvisa, 2010.
- AL-GHAMDI, A. H.; AL-GHAMDI, A. F.; AL-OMAR, M. A. Electrochemical studies and square-wave adsorptive stripping voltammetry of spironolactone drug. **Analytical Letters**, v. 41, n. 1, p. 90–103, 2008.
- BACHMAN, W. J.; STEWART, J. T. HPLC-photolysis-electrochemical detection in pharmaceutical analysis: application to the determination of clofibric acid in human plasma. **Journal of Liquid Chromatography**, v. 12, n. 15, p. 123–128, 1990.
- BALDRIAN, P. Fungal laccases – occurrence and properties. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 30, n. 2, p. 215–242, 2006.
- BARBOSA, A. M.; CUNHA, P. D. T.; PIGATTO, M. M.; CORRADI, L. Produção e Aplicações de Exopolissacarídeos Fúngicos. **Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas**, v. 25, n. 1, p. 29–42, 2004.
- BARBOSA, A. M.; DEKKER, R. F. H.; HARDY, G. E. S. Veratryl alcohol as an inducer of laccase by an ascomycete, *Botryosphaeria* sp., when screened on the polymeric dye poly R-478. **Letters in Applied Microbiology**, v. 23, n. 2, p. 93–96, 1996.
- BARBOSA, A. M.; STELUTI, R. M.; DEKKER, R. F. H.; CARDOSO, M. S.; SILVA, M. L. C. Structural characterization of Botryosphaeran: a (1→3;1→6)-β-d-glucan produced by the ascomyceteous fungus, *Botryosphaeria* sp. **Carbohydrate Research**, v. 338, n. 16, p. 1691–1698, 2003.
- BELAL, F. Polarographic behaviour and determination of spironolactone. **Microchimica Acta**, v. 107, n. 1–2, p. 11–17, 1992.
- BRITISH PHARMACOPOEIA COMMISSION. **British pharmacopoeia**. London: The Stationery Office, 2009.

BRONDANI, D.; DUPONT, J.; SPINELLI, A.; VIEIRA, I. C. Development of biosensor based on ionic liquid and corn peroxidase immobilized on chemically crosslinked chitin. **Sensors and Actuators, B: Chemical**, v. 138, n. 1, p. 236–243, 2009.

CANNATELLI, M. D.; RAGAUSKAS, A. J. Two decades of Laccases: Advancing sustainability in the chemical industry. **The Chemical Record**, v. 17, n. 1, p. 122–140, 2017.

CESARINO, I.; GALESCO, H. V.; MORAES, F. C.; LANZA, M. R. V.; MACHADO, S. A. S. Biosensor based on electrocodeposition of carbon nanotubes/polypyrrole/laccase for neurotransmitter detection. **Electroanalysis**, v. 25, n. 2, p. 394–400, 2013.

CHENG, Y.; FENG, B.; YANG, X.; YANG, P.; DING, Y.; CHEN, Y.; FEI, J. Electrochemical biosensing platform based on carboxymethyl cellulose functionalized reduced graphene oxide and hemoglobin hybrid nanocomposite film. **Sensors and Actuators, B: Chemical**, v. 182, p. 288–293, 2013.

CLARK, L. C.; LYONS, C. Electrode systems for continuous monitoring in cardiovascular surgery. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 102, n. 1, p. 29–45, 1962.

CLAYDEN, J.; GREEVES, N.; WARREN, S. G.; WOTHERS, P. **Organic chemistry**. 2. ed. Oxford: Oxford University Press, 2001.

CORTES, A. P. **Biossensores para dopamina: lacase imobilizada em polissacarídeo**. Dissertação de mestrado. Universidade Estadual de Londrina, 2008.

DATSYUK, V.; KALYVA, M.; PAPAGELIS, K.; PARTHENIOS, J.; TISIS, D.; SIOKOU, A.; KALLITSIS, I.; GALIOTIS, C. Chemical oxidation of multiwalled carbon nanotubes. **Carbon**, v. 46, n. 6, p. 833–840, 2008.

EL-SHAHAWI, M. S.; BASHAMMAKH, A. S.; AL-SIBAALI, A. A.; BAHAI DARAH, E. A. Analysis of spironolactone residues in industrial wastewater and in drug formulations by cathodic stripping voltammetry. **Journal of Pharmaceutical Analysis**, v. 3, p. 137–143, 2013.

FATIBELLO-FILHO, O.; CAPELATO, M. D. Biossensores. **Química Nova**, v. 15, n.

1, p. 28–39, 1992.

FATIBELLO-FILHO, O.; VIEIRA, I. C. L-Ascorbic acid determination in pharmaceutical formulations using a biosensor based on carbon paste modified with crude extract of zucchini (*Cucurbita pepo*). **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 11, n. 4, p. 412–418, 2000.

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

FERNANDES, S. C.; SANTOS, D. M. P. O.; VIEIRA, I. C. Genipin-Cross-Linked Chitosan as a Support for Laccase Biosensor. **Electroanalysis**, v. 25, n. 2, p. 557–566, 2013.

FERNANDES, S. C.; VIEIRA, I. C.; BARBOSA, A. M. J.; FERREIRA, V. S. Methomyl detection by inhibition of laccase using a carbon ceramic biosensor. **Electroanalysis**, v. 23, n. 7, p. 1623–1630, 2011.

FRANÇA, E. **Produção de filmes automontados constituídos por polianilina associados ao polissacarídeo fúngico botriosferana**. Dissertação de mestrado. Universidade Estadual de Londrina, 2007.

FRANZOI, A. C.; VIEIRA, I. C.; DUPONT, J.; SCHEEREN, C. W.; DE OLIVEIRA, L. F. Biosensor for luteolin based on silver or gold nanoparticles in ionic liquid and laccase immobilized in chitosan modified with cyanuric chloride. **The Analyst**, v. 134, n. 11, p. 2320, 2009.

FREIRE, R. S.; DURÁN, N.; KUBOTA, L. T. Effects of fungal laccase immobilization procedures for the development of a biosensor for phenol compounds. **Talanta**, v. 54, n. 4, p. 681–686, 2001.

FU, K.; HUANG, W.; LIN, Y.; ZHANG, D.; HANKS, T. W.; RAO, A. M.; SUNA, Y.P. Functionalization of carbon nanotubes with bovine serum albumin in homogeneous aqueous solution. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v. 2, n. 5, p. 457–461, 2002.

GRIESHABER, D.; MACKENZIE, R.; VÖRÖS, J.; REIMHULT, E. Electrochemical Biosensors - Sensor Principles and Architectures. **Sensors**, v. 8, n. 3, p. 1400–1458, 2008.

GUILBAULT, G. G.; MONTALVO-JUNIOR, J. G. Urea-specific enzyme electrode. **Journal of the American Chemical Society**, v. 91, n. 8, p. 2164–2165, 1969.

HARDMAN, J. G.; LIMBIRD, L. E.; GILMAN, A. G. **Goodman & Gilman's – The pharmacological basis of therapeutics**. 9. ed. New York: McGraw-Hill, 1996.

HUA, Z.; QIN, Q.; BAI, X.; WANG, C.; HUANG, X. β -Cyclodextrin inclusion complex as the immobilization matrix for laccase in the fabrication of a biosensor for dopamine determination. **Sensors and Actuators, B: Chemical**, v. 220, p. 1169–1177, 2015.

JANEGITZ, B. C. **Desenvolvimento de biossensores utilizando nanotubos de carbono e nanopartículas de ouro**. Tese de doutorado. Universidade Federal de São Carlos, 2012.

JONES, S. M.; SOLOMON, E. I. Electron transfer and reaction mechanism of laccases. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 72, n. 5, p. 869–883, 2015.

KUTLUAY, A.; ASLANOGLU, M. An electrochemical sensor prepared by sonochemical one-pot synthesis of multi-walled carbon nanotube-supported cobalt nanoparticles for the simultaneous determination of paracetamol and dopamine. **Analytica Chimica Acta**, v. 839, p. 59–66, 2014.

LAUBE, N.; MOHR, B.; HESSE, A. Laser-probe-based investigation of the evolution of particle size distributions of calcium oxalate particles formed in artificial urines. **Journal of Crystal Growth**, v. 233, n. 1–2, p. 367–374, 2001.

LEE, T. M. H. Over-the-counter biosensors: past, present, and future. **Sensors**, v. 8, n. 9, p. 5535–5559, 2008.

LI, Y.; ZHANG, L.; LI, M.; PAN, Z.; LI, D. A disposable biosensor based on immobilization of laccase with silica spheres on the MWCNTs-doped screen-printed electrode. **Chemistry Central Journal**, v. 6, n. 1, p. 456, 2012.

LIANG, J.; HUANG, S.; ZENG, D.; HE, Z.; JI, X.; AI, X.; YANG, H. CdSe quantum dots as luminescent probes for spironolactone determination. **Talanta**, v. 69, n. 1, p. 126–130, 2006.

LONG, G. L.; WINEFORDNER, J. D. Limit of detection a closer look at the IUPAC definition. **Analytical Chemistry**, v. 55, n. 7, p. 712A–724A, 1983.

MALEKI, H.; COJOCARU, C. D.; BRETT, C. M. A.; JENKINS, G. M.; SELMAN, J. R.

Changes in the electrochemical behavior of polymeric carbon induced by heat-treatment and doping with lithium ions. **Journal of The Electrochemical Society**, v. 145, n. 3, p. 721, 1998.

MARQUES, P. R. B. O.; YAMANAKA, H. Biossensores baseados no processo de inibição enzimática. **Química Nova**, v. 31, n. 7, p. 1791–1799, 2008.

MOHANTY, S. P.; KOUGIANOS, E. Biosensors: a tutorial review. **IEEE Potentials**, v. 25, n. 2, p. 35–40, 2006.

MOROZOVA, O. V.; SHUMAKOVICH, G. P.; SHLEEV, S. V.; YAROLOV, Y. I. Laccase-mediator systems and their applications: A review. **Applied Biochemistry and Microbiology**, v. 43, n. 5, p. 523–535, 2007.

MOSES, P. R.; WIER, L.; MURRAY, R. W.; WIER, L. Chemically modified tin oxide electrode. **Analytical Chemistry**, v. 47, n. 12, p. 1882–1886, 1975.

OLIVEIRA, I. R. W. Z.; FATIBELLO-FILHO, O.; FERNANDES, S. C.; VIEIRA, I. C. Imobilização da lacase em micropartículas de quitosana obtidas por spray drying e usadas na construção de biossensores. **Química Nova**, v. 32, n. 5, p. 1195–1201, 2009.

OLIVEIRA, I. R. W. Z.; VIEIRA, I. C. Immobilization procedures for the development of a biosensor for determination of hydroquinone using chitosan and gilo (*Solanum gilo*). **Enzyme and Microbial Technology**, v. 38, n. 3–4, p. 449–456, 2006.

PRAJAPATI, P.; CHANDARANA, C.; MODI, V.; BASURI, T. Quantification of spironolactone by first and second order UV derivative spectrophotometry in bulk and tablet dosage form. **International Journal of Pharmaceutical Chemistry and Analysis**, v. 3, n. 3, p. 168–173, 2016.

RODRÍGUEZ-DELGADO, M. M.; ALEMÁN-NAVA, G. S.; RODRÍGUEZ-DELGADO, J. M.; DIECK-ASSAD, G.; MARTÍNEZ-CHAPA, S. O.; BARCELÓ, D.; PARRA, R. Laccase-based biosensors for detection of phenolic compounds. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 74, p. 21–45, 2015.

ROSATTO, S. S.; FREIRE, R. S.; DURÁN, N.; KUBOTA, L. T. Biossensores Amperométricos para determinação de compostos fenólicos em amostras de interesse ambiental. **Química Nova**, v. 24, p. 77–86, 2001.

SANTHIAGO, M.; VIEIRA, I. C. L-Cysteine determination in pharmaceutical formulations using a biosensor based on laccase from *Aspergillus oryzae*. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 128, n. 1, p. 279–285, 2007.

SARTORI, E. R.; VICENTINI, F. C.; FATIBELLO-FILHO, O. Indirect determination of sulfite using a polyphenol oxidase biosensor based on a glassy carbon electrode modified with multi-walled carbon nanotubes and gold nanoparticles within a poly(allylamine hydrochloride) film. **Talanta**, v. 87, p. 235–242, 2011.

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

SHERVEDANI, R. K.; AMINI, A. Direct electrochemistry of dopamine on gold-*Agaricus bisporus* laccase enzyme electrode: Characterization and quantitative detection. **Bioelectrochemistry**, v. 84, p. 25–31, 2012.

SHICHIRI, M.; YAMASAKI, Y.; KAWAMORI, R.; HAKUI, N.; ABE, H. Wearable artificial endocrine pancreas with needle-type glucose sensor. **The Lancet**, v. 320, n. 8308, p. 1129–1131, 1982.

SILVA, T. R.; VIEIRA, I. C. A biosensor based on gold nanoparticles stabilized in poly(allylamine hydrochloride) and decorated with laccase for determination of dopamine. **The Analyst**, v. 141, n. 1, p. 216–224, 2016.

SMAJDOR, J.; PIECH, R.; PACZOSA-BATOR, B. Spironolactone voltammetric determination on renewable amalgam film electrode. **Steroids**, v. 130, p. 1–6, 2018.

SOUZA-FILHO, A.; FAGAN, S. B. Funcionalização de nanotubos de carbono. **Química Nova**, v. 30, n. 7, p. 1695–1703, 2007.

TOLEDO, R. A.; SANTOS, M. C.; CAVALHEIRO, E. T. G.; MAZO, L. H. Determination of dopamine in synthetic cerebrospinal fluid by SWV with a graphite-polyurethane composite electrode. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 381, p. 1161–1166, 2005.

VARIN, F.; TU, T. M.; BENOÎT, F.; VILLENEUVE, J.P.; THÉORËT, Y. High-performance liquid chromatographic determination of spironolactone and its metabolites in human biological fluids after solid-phase extraction. **Journal of**

Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications, v. 574, n. 1, p. 57–64, 1992.

VLASE, L.; IMRE, S.; MUNTEAN, D.; ACHIM, M.; MUNTEAN, D.L. Determination of spironolactone and canrenone in human plasma by high-performance liquid chromatography with mass spectrometry detection. **Croatica Chemica Acta**, v. 84, n. 3, p. 361–366, 2011.

VOGEL, J. H. A convenient growth medium for *Neurospora* (Medium N). **Microbial Genetics Bulletin**, v. 13, p. 42–43, 1956.

WANG, J. Glucose biosensors: 40 years of advances and challenges. **Electroanalysis**, v. 13, p. 983–988, 2001.

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

XIANG, L.; LIN, Y.; YU, P.; SU, L.; MAO, L. Laccase-catalyzed oxidation and intramolecular cyclization of dopamine: A new method for selective determination of dopamine with laccase/carbon nanotube-based electrochemical biosensors. **Electrochimica Acta**, v. 52, n. 12, p. 4144–4152, 2007.

XU, F. Effects of redox potential and hydroxide inhibition on the pH activity profile of fungal laccases. **The Journal of biological chemistry**, v. 272, n. 2, p. 924–928, 1997.

XU, Q.; MAO, C.; LIU, N. N.; ZHU, J. J.; SHENG, J. Direct electrochemistry of horseradish peroxidase based on biocompatible carboxymethyl chitosan–gold nanoparticle nanocomposite. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 22, n. 5, p. 768–773, 2006.

YANG, G.; CAO, J.; LI, L.; RANA, R. K.; ZHU, J. J. Carboxymethyl chitosan-functionalized graphene for label-free electrochemical cytosensing. **Carbon**, v. 51, p. 124–133, 2013.

ZHANG, F.; YANG, L.; BI, S.; LIU, J.; LIU, F.; WANG, X.; YANG, X.; GAN, N.; YU, T.; HU, J.; LI, H.; YANG, T. Neurotransmitter dopamine applied in electrochemical

determination of aluminum in drinking waters and biological samples. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 87, n. 1–2, p. 105–113, 2001.

ZHAO, W.; WANG, K.; WEI, Y.; MA, Y.; LIU, L.; HUANG, X. Laccase Biosensor Based on Phytic Acid Modification of Nanostructured SiO₂ Surface for Sensitive Detection of Dopamine. **Langmuir**, v. 30, n. 37, p. 11131–11137, 2014.