

**PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DE CAMPINAS  
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS, AMBIENTAIS E DE TECNOLOGIAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO *STRICTO SENSU* EM SISTEMAS DE  
INFRAESTRUTURA URBANA**

**THAINÁ GODOY BEATTO**

**DESENVOLVIMENTO DE UM BIOSSENSOR A BASE DE CORE-SHELL  
PARA MONITORAMENTO DE DOENÇA DEGENERATIVA EM ÁREAS URBANAS**

**CAMPINAS**

**2022**

**THAINÁ GODOY BEATTO**

**DESENVOLVIMENTO DE UM BIOSSENSOR A BASE DE CORE-SHELL  
PARA MONITORAMENTO DE DOENÇA DEGENERATIVA EM ÁREAS URBANAS**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado em Sistemas de Infraestrutura Urbana do Centro de Ciências Exatas, Ambientais e de Tecnologias, Pontifícia Universidade Católica de Campinas, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Sistemas de Infraestrutura Urbana. Área de concentração: Sistemas de Infraestrutura Urbana.

Mestranda: Thainá Godoy Beatto.

Orientador: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Renata Kelly Mendes Valente.

Ficha catalográfica elaborada por Fabiana Rizzioli Pires CRB 8/6920  
Sistema de Bibliotecas e Informação - SBI -PUC-Campinas

628.53  
B369d

Beatto, Thainá Godoy

Desenvolvimento de um biossensor a base de core-shell para monitoramento de doença degenerativa em áreas urbanas / Thainá Godoy Beatto. - Campinas: PUC- Campinas, 2022.

68 f.: il.

Orientador: Renata Kelly Mendes Valente.

Dissertação (Mestrado em Sistemas de Infraestrutura Urbano) - Programa de Pós-Graduação em Sistemas de Infraestrutura Urbano, Centro de Ciências Exatas, Ambientais e de Tecnologia, Pontifícia Universidade Católica de Campinas, Campinas, 2022.

Inclui bibliografia.

1. Ar - Poluição. 2. Parkinson, Doença de. 3. Biossensores. I. Valente, Renata Kelly Mendes. II. Pontifícia Universidade Católica de Campinas. Centro de Ciências Exatas, Ambientais e de Tecnologia. Programa de Pós-Graduação em Sistemas de Infraestrutura Urbano. III. Título.

CDD - 22. ed. 628.53

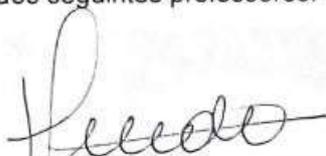
**THAINÁ GODOY BEATTO**

**DESENVOLVIMENTO DE UM BIOSSENSOR A BASE DE CORE-SHELL  
PARA MONITORAMENTO DE DOENÇA DEGENERATIVA EM ÁREAS URBANAS**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado em Sistemas de Infraestrutura Urbana do Centro de Ciências Exatas, Ambientais e de Tecnologias, Pontifícia Universidade Católica de Campinas, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Sistemas de Infraestrutura Urbana. Área de concentração: Sistemas de Infraestrutura Urbana.

Orientador: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Renata Kelly Mendes Valente.

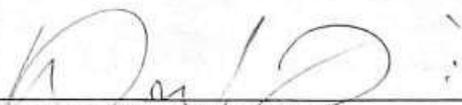
Dissertação defendida e aprovada em 27 de junho de 2022 pela Comissão Examinadora constituída dos seguintes professores:



Prof<sup>ª</sup>. Dra. Renata Kelly Mendes Valente  
Orientadora da Dissertação e Presidente da Comissão Examinadora  
Pontifícia Universidade Católica de Campinas



Prof<sup>ª</sup>. Dra. Betânia Hoss Lunelli  
Pontifícia Universidade Católica de Campinas



Prof. Dr. David Mendez Soares  
Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço meus pais Paulo e Angélica, pelo amor, incentivo financeiro e emocional, principalmente durante a pandemia.

Agradeço à Renata, minha orientadora, que confiou em mim desde a iniciação científica, me passou seu conhecimento e participou assiduamente no meu crescimento como profissional, que mesmo durante a pandemia, quando queria desistir, me incentivou. Renata sempre tinha esperança de dar certo, mesmo quando não parecia ter solução e deixava tudo mais leve.

Agradeço ao meu namorado Miguel, por comemorar comigo todos os dias quando havia bons resultados e me motivou a continuar quando não dava certo.

Agradeço aos professores do mestrado, por me mostrarem as diversas e mais remotas áreas onde um Químico pode atuar.

Agradeço à minha amiga Jhenifer, que esteve comigo desde a graduação até o mestrado, que sempre me apoiou e passou pelas dificuldades junto comigo.

Agradeço ao Wyllerson, que me auxiliou nas medidas de microscopia de força atômica e explicou toda a técnica.

Agradeço ao técnico do laboratório Ricardo, por sempre me auxiliar e estar disponível para ajudar.

Agradeço a todos que fizeram parte da minha formação e me ajudaram a chegar até aqui.

Agradeço à PUC-Campinas, pela oportunidade e bolsa concedida.

## RESUMO

A constante evolução da vida urbana, que acarreta no aumento do uso de automóveis e no crescimento das indústrias, pode ocasionar efeitos deletérios ao meio ambiente e à saúde dos seres vivos. A poluição do ar, a partir da emissão de gases, como monóxido de carbono, dióxido de nitrogênio, ozônio e materiais particulados, entre outros, estão associados ao desenvolvimento de diversos tipos de doenças, como câncer e doenças neurodegenerativas crônicas, tendo como exemplo, a doença de Parkinson. Os poluentes, após sua infiltração pelo sistema respiratório, podem causar neuroinflamação e acúmulo da alfa-sinucleína, o principal gene causador do mal de Parkinson, e degeneração de neurônios dopaminérgicos. O nível de dopamina encontrado no sistema nervoso, se insuficiente, é o causador dos principais sintomas motores relacionados à doença. Portanto, o desenvolvimento de métodos mais seletivos de detecção da dopamina tornou-se importante para a comunidade médica, para facilitar não só o tratamento, mas também o diagnóstico dessa doença. Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi o desenvolvimento de um biossensor eletroquímico a base de core-shell para o monitoramento de dopamina em amostras. Para isso, foram sintetizadas nanopartículas de óxido de zinco que, posteriormente, foram recobertas por nanopartículas de ouro formando o core-shell de ZnO@Au. Após a imobilização da enzima tirosinase sobre a nanoestrutura e adsorção sobre um eletrodo miniaturizado de carbono, o dispositivo foi usado na quantificação da dopamina. Com relação a otimização das condições experimentais, o biossensor apresentou uma faixa linear entre as concentrações 0,1 e 500  $\mu\text{mol.L}^{-1}$  de dopamina, com limite de detecção de 0,0855  $\mu\text{mol.L}^{-1}$ . Quando aplicado em amostra de urina sintética o biossensor apresentou um erro relativo de 3,772%. Além disso, o dispositivo mostrou uma alta seletividade apresentando uma alteração abaixo de 7%, na presença dos interferentes estudados. A partir dos resultados obtidos, constatou-se que o dispositivo apresentou desempenho satisfatório e é promissor para ser usado no acompanhamento da doença de Parkinson.

**Palavras-chave:** Poluição atmosférica; Poluição urbana; Doença de Parkinson; Biossensores; Core-shell.

## ABSTRACT

The constant evolution of urban life, leading to an increase in the use of automobiles and the growth of industries, can have harmful effects on the environment and the health of living beings. Air pollution, from the emission of gases, such as carbon monoxide, nitrogen dioxide, ozone and particulate materials, among others, can be associated with the development of several types of diseases, including cancer and chronic neurodegenerative diseases, being the Parkinson's disease the most frequent. Pollutants, after infiltrating the respiratory system, can cause neuroinflammation and the accumulation of alpha-synuclein, the main causative agent of Parkinson's disease, and degeneration of dopaminergic neurons. The level of dopamine found in the nervous system, if insufficient, it is the cause of the main motor symptoms related to the disease. Therefore, the development of more selective methods for dopamine detection becomes important for the medical community, facilitating early treatment aimed at diagnostic of these diseases. In this context, the objective of this work was the development of an electrochemical biosensor based on core-shell nanostructure for dopamine monitoring. For this, zinc oxide nanoparticles were synthesized and covered by gold nanoparticles, forming the core-shell of ZnO@Au. After immobilization of the enzyme tyrosinase on the nanostructure and adsorption on a miniaturized carbon electrode, the device was used to quantify dopamine. After optimizing the experimental conditions, the biosensor showed a linear range between concentrations of 0.1 and 500  $\mu\text{mol.L}^{-1}$  of dopamine, with a detection limit of 0.0855  $\mu\text{mol.L}^{-1}$ . When applied to a synthetic urine sample, the biosensor presented a relative error of 3.772%. In addition, the device showed a high selectivity presenting an alteration below 7%, in the presence of the studied interferents. From the results obtained, it was found that the device presented satisfactory performance and is promising to be used in the monitoring of Parkinson's disease.

**Keywords:** Atmospheric pollution; Urban pollution; Parkinson's Disease; Biosensors; Core-shell.

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO .....	6
1.1	DOENÇAS RELACIONADAS À POLUIÇÃO ATMOSFÉRICA URBANA .....	7
1.2	A DOENÇA DE PARKINSON E SEUS SINTOMAS .....	8
1.3	O TRATAMENTO PARA A DOENÇA DE PARKINSON .....	9
1.4	TÉCNICAS DE QUANTIFICAÇÃO DE DOPAMINA E EXAMES LABORATORIAIS .....	11
1.5	BIOSSENSORES .....	12
1.6	VOLTAMETRIA DE PULSO DIFERENCIAL .....	14
1.7	BIOSSENSOR PARA A DOPAMINA .....	16
2	OBJETIVO GERAL .....	20
3	PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL .....	21
3.1	Equipamentos e reagentes .....	21
3.2	Preparo das soluções .....	22
3.2.1	Solução de tampão fosfato 0,1 mol.L <sup>-1</sup> pH 7 .....	22
3.2.2	Solução de dopamina 0,0025 mol.L <sup>-1</sup> .....	22
3.2.3	Urina sintética .....	22
3.3	Obtenção do extrato enzimático .....	23
3.4	Síntese das nanopartículas de ZnO .....	23
3.5	Produção do core-shell ZnO@Au .....	24
3.6	Caracterização do core-shell .....	25
3.7	Imobilização da tirosinase sobre o core-shell .....	26
3.8	Construção do biossensor .....	27
3.9	Testes iniciais e otimização das condições experimentais usando o biossensor proposto .....	29
3.9.1	Tempo de contato ZnO@Au/enzima .....	30
3.9.2	Seleção do pH do tampão de lavagem .....	30

3.10	Obtenção dos parâmetros analíticos com o biossensor proposto .....	30
3.10.1	Obtenção da curva de calibração .....	31
3.10.2	Limite de detecção.....	31
3.10.3	Exatidão do biossensor proposto.....	31
3.10.4	Reprodutibilidade de construção do biossensor proposto .....	32
3.10.5	Teste de seletividade do biossensor.....	32
3.10.6	Teste de estabilidade do biossensor. ....	32
3.10.7	Teste de efeito de memória .....	33
3.10.8	Análise em urina sintética.....	33
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	34
4.1	Caracterização do core-shell.....	34
4.1.1	Espectroscopia Ultravioleta/Visível.....	34
4.1.2	Microscopia de Força Atômica.....	35
4.2	Testes iniciais com o biossensor.....	40
4.3	Otimização das condições experimentais.....	41
4.3.1	Estudo do tempo de interação entre o core-shell ZnO@Au e a enzima tirosinase.....	41
4.3.2	Estudo de pH do tampão fosfato de lavagem após a etapa de imobilização enzimática .....	43
4.4	Parâmetros analíticos.....	44
4.4.1	Curva de calibração.....	44
4.4.2	Limite de detecção.....	46
4.4.3	Exatidão do biossensor em solução tampão de pH fisiológico.....	48
4.4.4	Estudo da reprodutibilidade de construção do biossensor.....	49
4.4.5	Estudo da seletividade do biossensor.....	49
4.4.6	Estudo da estabilidade do biossensor.....	51
4.4.7	Estudo do efeito de memória do biossensor.....	52

4.4.8	Aplicação do biossensor em amostra de urina sintética.....	53
5	CONCLUSÃO .....	55
	REFERENCIAS.....	56

## 1 INTRODUÇÃO

Com o constante desenvolvimento das áreas urbanas, há o aparecimento de efeitos negativos ao meio ambiente e a sociedade que ali habita. Estes efeitos surgem a partir das modificações feitas no espaço urbano, decorrentes de sua falta de planejamento e aumento populacional (YANG, *et al.*, 2019). Essas consequências podem ser observadas no decaimento da qualidade do ar, solo e da água, que causa grande impacto na saúde pública.

A poluição atmosférica é uma das problemáticas causadas pelo adensamento populacional, pelo aumento do tráfego de automóveis, queima de combustíveis e indústrias de centros urbanos. Algumas características que tornam a poluição do ar de maior risco para a saúde e ao meio ambiente, é a dificuldade em sua remediação. Além disso, para a medição dos poluentes atmosféricos são necessários equipamentos de alto custo e que utilizam um grande espaço para a sua estrutura (DAPPER, 2016; SCHRAUFNAGEL, *et al.*, 2019a).

Um acontecimento histórico, que comprovou a importância da qualidade do ar para o bem-estar da sociedade, foi chamado de “o nevoeiro de Londres”. Esta fumaça opaca que tomou a cidade inglesa no século XX, no mês de dezembro no ano de 1952, causada pela evolução industrial e a queima de carvão, continha dióxido de enxofre e partículas de fumaça, as quais provocaram cerca de 12.000 mortes até o mês de fevereiro de 1953. O caso não foi bem entendido na época, porém, sua letalidade e mortalidade foram reconhecidas (ANDERSON, 2012).

Os poluentes do setor do transporte, lançados pelos veículos automotores necessitam de atenção, pois liberam diversos tipos de contaminantes no ar. O monóxido de carbono (CO) provém de instalações industriais e da queima de combustível em veículos automotores, enquanto o aumento da emissão de dióxido de enxofre (SO<sub>2</sub>) ocorre pelo emprego de combustível de baixa qualidade. Ozônio (O<sub>3</sub>) se forma a partir da reação dos óxidos de nitrogênio (NO<sub>x</sub>) com compostos orgânicos voláteis ou oxigênio (em ambientes quentes e com incidência de luz). O dióxido de nitrogênio (NO<sub>2</sub>) pode ser emitido por empresas de energia, em processos de combustão e até na criação de aves de corte (COSTA, *et al.*, 2020; WEI, 2019).

Outro importante poluente é o material particulado (MP), constituído de uma mistura de partículas, em escala microscópica, de compostos orgânicos, metais,

ácidos e partículas de poeira ou solo. Podem ser gerados por meios naturais, a partir de vulcões e incêndios, ou como consequência das atividades humanas como fumaça de cigarro, veículos e processos de combustão industriais (ANDERSON, 2012).

Portanto, as atividades dos centros urbanos e megacidades estão altamente relacionadas com a qualidade do ar e à saúde das pessoas expostas aos poluentes, podendo causar diversos tipos de problemas respiratórios, tumores e até doenças neurodegenerativas crônicas (CALDERON-GARCIDUENAS, *et al.*, 2019).

## 1.1 DOENÇAS RELACIONADAS À POLUIÇÃO ATMOSFÉRICA URBANA

É considerado ar poluído aquele que contém substâncias que possam causar danos aos seres humanos ou ao meio ambiente. A gravidade dos danos causados aos tecidos, pelos gases, dependerá de diversos fatores como a concentração com que foram absorvidos pelo sistema, seu poder de oxidação, solubilidade e a sensibilidade a doenças que o organismo de cada pessoa possui. Podem conter, conforme descrito anteriormente, níveis altos de diferentes poluentes, compostos orgânicos voláteis, materiais particulados ou poluentes gasosos, como SO<sub>2</sub> que facilmente se solubiliza em água e causa muitos danos às vias respiratórias e a pele. O CO é fortemente solúvel e é simples de adentrar na corrente sanguínea, onde compete com o oxigênio para se ligar à hemoglobina, sendo muito tóxico. O O<sub>3</sub> e NO<sub>x</sub> podem ser mais absorvidos pelo pulmão por serem menos solúveis. Os poluentes encontrados dependerão da condição em que foram formados e fonte emissora (DAPPER, 2016; HAN, *et al.*, 2020; SCHRAUFNAGEL, *et al.*, 2019a).

O material particulado, por possuir partículas menores que 2,5 µm e estar suspenso no ar, está associado ao quinto fator de risco de morte mundial. O MP causa o surgimento de sintomas como tosse, dificuldade respiratória, lacrimejamento, angina, agravamento de problemas respiratórios, alérgicos e cardíacos preexistentes, em curto prazo (DAPPER, 2016; HAN, *et al.*, 2020; SCHRAUFNAGEL, *et al.*, 2019a).

Porém, as exposições a longo prazo podem causar danos ainda piores, por danificar os tecidos dos órgãos e estar associada a diversos tipos de câncer, como leucemia e de pulmão e gatilho para doenças neurodegenerativas, como o Alzheimer e a doença de Parkinson (HAN, *et al.*, 2020; PÉREZ, *et al.*, 2015; RIBEIRO, *et al.*, 2019).

O desenvolvimento de doenças não transmissíveis pelo ar poluído ocorre através de sua infiltração pelos pulmões. Na doença de Parkinson, que se trata do segundo distúrbio neurodegenerativo mais típico, seguido do Alzheimer, os poluentes ao longo do tempo podem inflamar o sistema respiratório, transcendendo o tecido epitelial gástrico e até romper a barreira hematoencefálica conduzindo à neuroinflamação, que acarreta efeitos deletérios ao cérebro. São causados primeiramente pelo estresse oxidativo (afetando outros órgãos), seguidos de neuroinflamação, neurotoxicidade dopaminérgica (degenerando neurônios) e aglomeração da  $\alpha$ -sinucleína (principal gene que causa a mutação referente a doença de Parkinson). Há estudos que relatam potencial intensificação do aparecimento desta doença pelos poluentes mais presentes nas áreas urbanas (HU *et al.*, 2019; SCHRAUFNAGEL *et al.*, 2019b).

Outros artigos encontrados na literatura, têm registrado na última década, possível correlação entre a poluição do ar ao desenvolvimento da doença de Parkinson, sendo que diferentes cidades ao redor do mundo vêm fazendo estudos para confirmar essa associação. Lee *et al.* (2022), na Coreia do Sul, sugerem que a longa exposição aos materiais particulados é um fator de risco para a incidência do Parkinson. Em outro trabalho, Lee *et al.* (2016), descrevem um estudo de Taiwan, em que os autores sugerem a relação entre a exposição à poluição do ar e o risco do desenvolvimento da doença. Portanto, essa longa exposição à particulados e outros gases não pode ser negligenciada, mas novos estudos que delimitam e comprovam as sequelas causadas diretamente e indiretamente, pela inalação de MP, ainda necessitam de estudos complementares (NEJM *et al.*, 2020).

## **1.2 A DOENÇA DE PARKINSON E SEUS SINTOMAS**

A doença de Parkinson é incurável e se refere a um distúrbio progressivo patológico no sistema nervoso, que está diretamente envolvida com a deficiência do neurotransmissor dopamina (DA), que acarretará o aparecimento da maior parte dos amplos sintomas da enfermidade (VILLELA, 2019). Esses processos patogênicos produzem efeitos de deterioração do sistema nervoso central (SNC), que são traduzidos em problemas físicos motores como tremores, distúrbios de equilíbrio (postura), inflexibilidade muscular e lentidão dos movimentos voluntários (acinesia e bradicinesia). Adultos mais expostos ao ar poluído possuem maiores riscos do

desenvolvimento da doença, que pode acelerar o envelhecimento cerebral, diminuindo a função cognitiva decorrida de demência (SCHRAUFNAGEL *et al.*, 2019b; SOUZA *et al.*, 2011).

Além do distúrbio motor, a doença também irá apresentar sintomas não motores, como perda do sono, comprometimento do raciocínio, diminuição do olfato e, geralmente, exibe indícios de sintomas psicológicos incluindo depressão, alterações de humor, alucinações, ansiedade e impassibilidade. O conhecimento destes sintomas pode facilitar a prever a doença e obter um diagnóstico no estágio inicial, de forma a possibilitar o início de um tratamento precoce (HASSAN *et al.*, 2019; VILLELA, 2019).

A doença de Parkinson se manifesta geralmente em pessoas de idade mais avançada, com maior ocorrência a partir dos 60 anos, onde há mais agilidade na perda dos neurônios dopaminérgicos, afetando o sistema nervoso. Com o aumento da expectativa de vida e, portanto, com o envelhecimento da sociedade, a incidência dessa doença crônica tem tendência a aumentar. A estimativa para 2030 é que o número de casos dobre, ou seja, cerca de 3% das pessoas com mais de 60 anos no Brasil, aproximadamente 630 mil brasileiros poderão ser afetados (VILLELA, 2019). Como consequência, ocorrerá um aumento da carga médica e econômica necessária para o tratamento.

### **1.3 O TRATAMENTO PARA A DOENÇA DE PARKINSON**

Mesmo não havendo tratamento que elimine completamente o avanço da doença no SNC, há meios para diminuir os sintomas. Com o sucessivo progresso da pesquisa de fármacos, surgem medicamentos para melhorar as manifestações motoras e não motoras da doença. Sabe-se que a principal causa dos distúrbios motores neurodegenerativos é causada por baixos níveis de DA, neurotransmissor da família das catecolaminas, que é produzida na substância negra do cérebro e funciona como neurotransmissor no corpo estriado (POEWE; MAHLKNECHT, 2020).

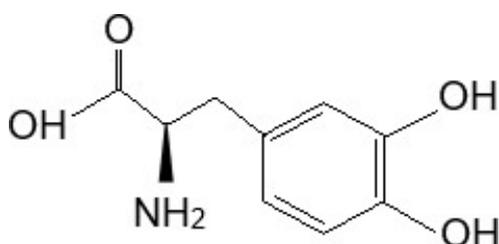
Com o acúmulo da proteína pré-sináptica  $\alpha$ -sinucleína, devido à neuroinflamação no SNC, há a formação de estruturas nos neurônios, os *corpos de Lewy*, que por sua vez possuem um núcleo composto por proteínas com um halo de neurofilamentos de  $\alpha$ -sinucleína. Estas estruturas estão associadas à morte de células

neurais dopaminérgicas na substância negra, que se refere a uma região de cor escura do cérebro localizada no mesencéfalo, coloração essa causada por neurônios pigmentados, onde a dopamina é sintetizada. A neurodegeneração também afetará outros sistemas além do dopaminérgico, como o colinérgico, noradrenérgica e serotoninérgica, os quais podem se relacionar com a DA (ALHO, 2011; GALASKO, 2017; MEDER, 2019).

Um dos sistemas que está diretamente ligado aos sintomas motores é o sistema colinérgico, onde a DA e a acetilcolina estão em constante equilíbrio. No corpo estriado a DA tem função inibitória para balancear a função excitatória colinérgica. Com a diminuição da primeira substância, o equilíbrio se rompe e os níveis de acetilcolina prevalecem causando hiperatividade e outros sintomas motores. Portanto, há o surgimento de medicamentos que aumentam a concentração de DA e reduzem a abundância de acetilcolina (HOEBEL; AVENA; RADA, 2007).

A Levodopa, cuja estrutura química está apresentada na Figura 1, é um dos medicamentos mais utilizados para o tratamento da doença, que possui em sua estrutura aminoácidos aromáticos, presentes também na DA, que ultrapassam a barreira hematoencefálica e, a partir do aminoácido dopa descarboxilase, é transformada em DA, que restabelecerá sua disponibilidade no corpo estriado (POEWE; MAHLKNECHT, 2020).

**Figura 1** - Estrutura molecular da levodopa.



Fonte: Própria.

No estudo clínico feito por Abbassi *et al.* (2020), foi colocado em pauta os efeitos colaterais da Levodopa, listados como alguns movimentos musculares involuntários, diarreia e desregulamento na função hepática. Portanto, a prescrição do medicamento Pramipexol, por ser de baixo custo, foi comum para o início do

tratamento. Este fármaco é conhecido por sua eficácia ao controlar os sintomas motores, variação de humor e retardar os efeitos colaterais gerados pela Levodopa. No entanto, se ingerido em conjunto com a Levodopa, como um medicamento complementar em uma terapia combinada, foram relatados o aumento de psicose, sonolência ou insônia pelos pacientes. Após o final do estudo, o grupo de pacientes que foi medicado com Levodopa e o outro grupo que consumia o conjunto de Levodopa mais Pramixol foram avaliados. Os níveis de psicose, alucinações e depressão nos pacientes que ingeriam os medicamentos combinados aumentou significativamente, por efeitos colaterais do Pramipexol, em relação ao outro grupo que consumia a monoterapia com Levodopa (ABBASSI *et al.*, 2020). Desta forma, o tratamento com Levodopa, segundo os autores, continua proporcionando menos efeitos secundários e mais vantagens para o tratamento do Parkinson.

Portanto, o acompanhamento da doença e, possivelmente, até mesmo o diagnóstico, tão essenciais, podem ser facilitados com a quantificação de DA nos pacientes.

#### **1.4 TÉCNICAS DE QUANTIFICAÇÃO DE DOPAMINA E EXAMES LABORATORIAIS**

Segundo Marc *et al.* (2011), o processo de excreção da DA se inicia na barreira hematoencefálica, que é a responsável em determinar a passagem de substâncias que saem e entram no SNC seletivamente, para justamente defender o SNC de moléculas não desejadas ou prejudiciais e levar outras que são essenciais, como os aminoácidos. Essa barreira corresponde a uma camada composta por células endoteliais especializadas (CEE), constituídas por transportadores, que controlarão a passagem dos neurotransmissores no SNC. OS neurotransmissores que saem do sistema, ficam disponíveis na corrente sanguínea e, para ajustar sua concentração no sangue, são filtrados através dos néfrons, uma unidade funcional dos rins, passam então para estes órgãos e são excretados na urina. A alta relevância da quantificação dos neurotransmissores, se dá por sua fundamental função no sistema nervoso e diversas outras funções, como no sistema endócrino, imunológico e servirem como biomarcadores para doenças específicas. Neste contexto, sua medição pode facilitar o diagnóstico de doenças bem como a escolha do tratamento mais adequado. Desta forma, a urina se trata do fluido mais comum para a análise de

dopamina, já que não se refere a um exame evasivo e apresenta-se em um ambiente estável (MARC, *et al.*, 2011).

No entanto, mesmo que a DA excretada possa vir de outros lugares do corpo, além do SNC diretamente, acredita-se que a diminuição da concentração dos neurotransmissores na urina está associada a redução do desempenho do sistema dopaminérgico, o que ocorre nos casos da doença de Parkinson e nos casos de esquizofrenia. A partir de testes em animais também foi comprovado a ligação entre a disponibilidade de DA no corpo estriado e os níveis de DA excretados na urina (COHRS *et al.*, 2004).

Segundo o relatório da Chromsystems Instruments & Chemicals GmbH (CICG, 2012), a concentração máxima de dopamina na urina seria de até 3,24  $\mu\text{mol}/24\text{h}$  ou até 500  $\mu\text{g}/24\text{h}$ . Para obter uma faixa de concentração comumente utilizada neste tipo de exame, foi considerado o valor de referência do Haoma By Dnaclinic (2019), que foi de 80,0 a 500  $\mu\text{g}/24\text{h}$ . Portanto, uma medida abaixo de 80,0  $\mu\text{g}/24\text{h}$  seria associada a diminuição do desempenho do sistema dopaminérgico.

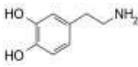
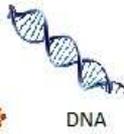
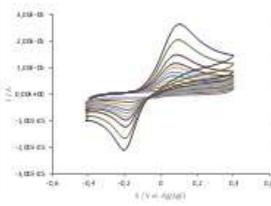
As técnicas mais utilizadas para a quantificação de dopamina em fluidos corporais e composição de fármacos são espectrofotometria, cromatografia, quimioluminescência e eletroforese. Porém, o alto custo destes equipamentos, necessidade de analista treinado, tempo elevado de análise e necessidade de pré-tratamento das amostras, de alguns desses métodos, inviabilizam sua utilização. Os biosensores eletroquímicos podem ser uma alternativa viável e destacam-se por sua alta especificidade, sensibilidade, baixo custo de execução, rapidez nas análises e capacidade de ser miniaturizado, permitindo análises em campo e em tempo real (SILVA, 2018).

## 1.5 BIOSSENSORES

Os biossensores são um subgrupo dos sensores químicos e consistem em dispositivos analíticos que possuem como reconhecedor um componente biológico, que garante a especificidade, e produzem respostas com manipulação mínima do sistema estudado, sendo possível a quantificação do analito de interesse de acordo com sua concentração. Sua estrutura é formada também por um transdutor e um sistema de saída do sinal. Dentre os transdutores utilizados, destacam-se os

eletroquímicos, devido a sua simplicidade de manipulação e menor custo relativo. O esquema geral de um biossensor eletroquímico é demonstrado na Figura 2. Os elementos de reconhecimento usados nos biossensores podem ser DNA, enzimas, anticorpos, entre outros, que são responsáveis por gerar a seletividade e a sensibilidade necessária ao aparato, tendo a capacidade de distinguir diferentes substâncias e impedir possíveis interferentes. A partir do potencial aplicado pelo transdutor eletroquímico, há uma interação entre o bioreconhecedor e o analito, resultando em mudanças físico-químicas no sistema. Essa variação é detectada pelo transdutor e este sinal é convertido em um sinal elétrico, que é processado e enviado pelo sistema de saída até o computador (SECCHI, 2017).

**Figura 2** - Esquema geral de um biossensor.

ANALITO	MOLÉCULA BIOLÓGICA	TRANSDUTOR	SINAL ELÉTRICO
 <p>Dopamina</p>  <p>Composto fenólico</p>	 <p>DNA</p>  <p>Enzima</p>	<p>Elétrico Óptico Térmico Acústico Piezoelétricos Eletroquímico</p> <p>Amperométrico Conduítmétrico Potenciométrico</p>	

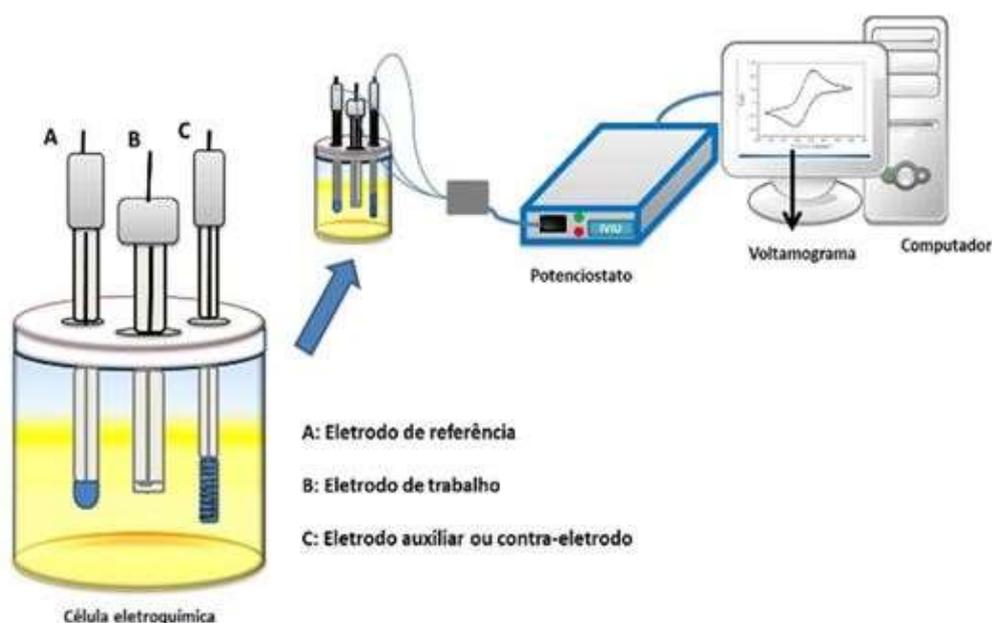
Fonte: Própria. (Figuras do DNA e enzima encontradas em PNGWING, 2022).

As detecções eletroquímicas mais comuns são as voltamétricas, as reações de oxi-redução ocorrem dentro de uma célula, onde são conectados três diferentes eletrodos, sendo estes, os eletrodos de trabalho, referência e contra-eletrodo, seguindo o esquema da Figura 3. Assim que o potencial é aplicado pelo transdutor, a substância eletroquimicamente ativa irá se oxidar ou reduzir, o que decorre da liberação ou ganho de elétrons que gerarão uma corrente elétrica (CICG, 2012), proporcional à concentração do analito.

Quando se trata da aplicação de enzimas como elemento bioreconhecedor no dispositivo, essa alternativa pode acarretar no aumento da seletividade e sensibilidade do biossensor. No entanto, para que essas características sejam preservadas, o processo de imobilização da biomolécula deve ser realizado de forma efetiva. A essência desta estratégia consiste em prender as moléculas proteicas da enzima na

superfície do sensor, preservando suas propriedades catalíticas, que tem como vantagem, dificultar a contaminação do produto de interesse e aumentar as possibilidades de reutilização do sistema. Os materiais usados como suporte para essa imobilização devem oferecer uma grande área superficial, não serem tóxicos e, preferencialmente, contribuir com a aumento da transferência de elétrons, melhorando, assim, a sensibilidade do dispositivo. Essa última propriedade é de suma importância, uma vez que baixas concentrações de dopamina na urina já podem indicar alterações relacionadas à doença de Parkinson (FRITZEN, 2010; JÚNIOR, 2014).

**Figura 3** – Esquema da conexão entre a célula eletroquímica, transdutor e o computador.



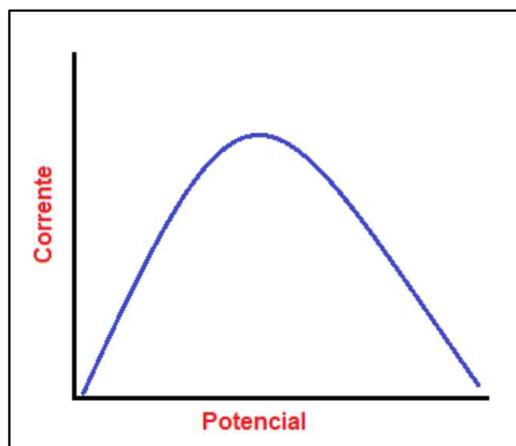
Fonte: (SILVA, 2015).

## 1.6 VOLTAMETRIA DE PULSO DIFERENCIAL

O voltamograma, gerado através da voltametria, é o resultado adquirido a partir da corrente gerada pela transferência de elétrons, ou seja, a atividade eletroquímica entre as substâncias presentes na solução e a superfície do eletrodo. Na voltametria de pulso diferencial um pulso de potencial controlado é aplicado, em função do tempo, registrando somente seu pico de oxidação, representado na Figura 4, ou de redução. Esse tipo de técnica, com potencial definido, tem sido comumente realizada para

medir concentrações baixíssimas de até  $10^{-12}$  mol.L<sup>-1</sup> de substâncias específicas (SANTOS, 2003; SILVA, 2021).

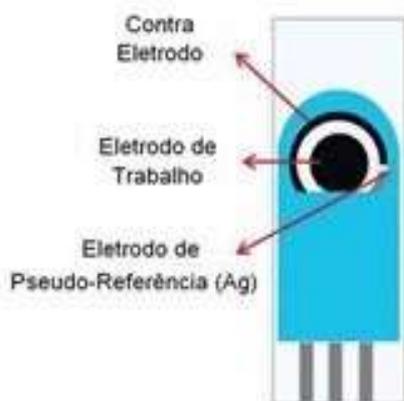
**Figura 4** - Modelo de um voltamograma de pulso diferencial de Potencial vs Corrente.



Fonte: (SILVA, 2021).

Neste trabalho, pretende-se realizar as medidas de corrente elétrica usando um dispositivo miniaturizado, que possui a vantagem de permitir análise em campo, uso de pequena quantidade de amostra (em torno de  $\mu$ L) com conseqüente baixa geração de resíduos. Neste sentido, a proposta é se utilizar um eletrodo impresso de carbono, como o mostrado na Figura 5, para a produção dos biossensores para a determinação de dopamina por meio do sinal obtido em voltamogramas de pulso diferencial.

**Figura 5** - Eletrodo miniaturizado de carbono.

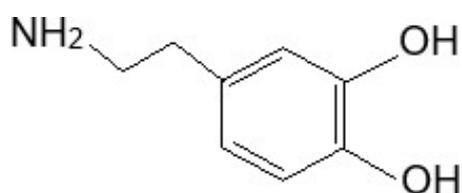


Fonte: Adaptado de (SILVA, 2019).

## 1.7 BIOSSENSOR PARA A DOPAMINA

Os neurotransmissores, como a DA, são substâncias adequadas para a análise eletroquímica, já que são facilmente oxidáveis, por conter em sua estrutura um benzeno com dois grupos de hidroxilas e um grupo amina, fazendo parte da classe das catecolaminas (SILVA, 2018), assim como demonstra a Figura 6.

**Figura 6** - Estrutura molecular da dopamina.



Fonte: Própria.

Há diversos métodos de desenvolvimento de biossensores eletroquímicos modificados para aplicação na detecção deste neurotransmissor, como o uso de metais, óxidos metálicos, compostos de carbono e nanopartículas (NPs). Porém, a sua determinação é dificultada pela coexistência de interferentes, como o ácido úrico e ácido ascórbico em amostras reais de urina, via por onde a DA é excretada. Durante a análise, estes compostos possuem potenciais de oxidação próximos, o que torna importante a investigação da possibilidade de sobreposição das suas curvas de oxidação. Desta forma, torna-se de extrema importância a validação de métodos mais exatos e seletivos para determinação da DA em amostras reais (SAJID; BAIG; ALHOOSHANI, 2019; SILVA, 2018).

Atualmente, tem aumentado o número de biossensores eletroquímicos baseados em nanomateriais na literatura, como suporte para a imobilização da biomolécula, devido aos benefícios que apresentam, como a possibilidade de amplificação do sinal, com consequente aumento da sensibilidade, além de apresentarem ótimas propriedades mecânicas, catalíticas, elétricas e ópticas. No entanto, a combinação de nanomateriais com outros compostos pode aumentar ainda mais a sensibilidade dos biossensores, especialmente em transdutores

eletroquímicos. A síntese desses nanomateriais compósitos, normalmente, pode ser realizada por diferentes métodos, que envolvem etapas simples e fornecem versatilidade no desenvolvimento dos dispositivos, principalmente com relação ao seu tamanho final (SHETTI *et al.*, 2019). Dentre esses compósitos, usados como suporte para a imobilização de biomoléculas, tem sido dada grande atenção aos nanomateriais do tipo “core-shell”, que são compostos por um núcleo (que se refere ao core) recoberto com uma casca (denominada de shell) e são representados como X@Y, onde X é o núcleo e Y a casca (THATAI *et al.*, 2014).

Diversos nanomateriais têm sido utilizados na produção dos core-shell, principalmente aqueles envolvendo o uso de nanopartículas de óxidos metálicos (MOHTAR *et al.*, 2019; GERBREDERS *et al.*, 2019). Os óxidos metálicos possuem muita aplicação no desenvolvimento de biossensores, especialmente como suporte para a biomolécula, devido às suas interessantes características, tais como o baixo custo, propriedades elétricas e catalíticas, melhorando a cinética de transferência de elétrons, e relativa estabilidade, o que é considerando extremamente relevante em se tratando deste tipo de dispositivo (FU *et al.*, 2021).

Dentre as nanopartículas de óxidos metálicos, destacam-se as de ZnO. Estes óxidos são semicondutores com energia de gap de 3,37 eV a temperatura ambiente e boa condutividade elétrica, que são consideradas de grande importância em aparatos eletroquímicos (SRIVASTAVA; GUSAIN; SHARMA, 2013). Além disso, apresentam baixa toxicidade, são biodegradáveis e são facilmente sintetizadas (MENDES *et al.*, 2017).

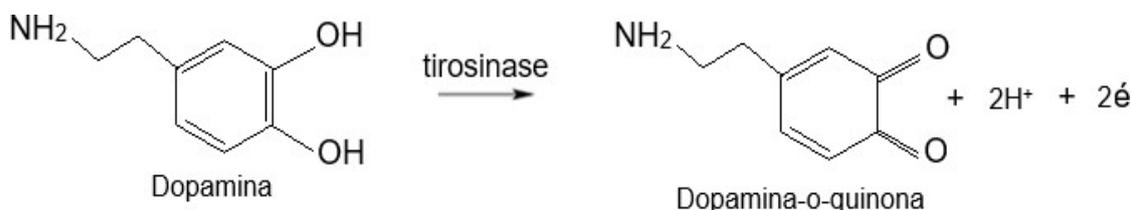
Recentemente, a associação de outros materiais a essas nanopartículas metálicas tem sido aplicada, formando nanoestruturas com propriedades mais vantajosas. Neste contexto, o recobrimento das nanopartículas de ZnO com nanopartículas de ouro permite aumento da estabilidade do processo de imobilização do bioreconhecedor, pois além de apresentarem excelentes propriedades eletrônicas são também facilmente funcionalizadas, permitindo ligações químicas com o suporte. Adicionalmente, são biocompatíveis e, portanto, não nocivas às biomoléculas, permitindo que mantenham sua atividade (SAJID; BAIG; ALHOOSHANI, 2019; SILVA, 2018; YUE *et al.*, 2020).

Desta forma, a combinação das propriedades destes nanomateriais, com expectativa de contribuir no desenvolvimento de biossensores mais sensíveis, com menores limites de detecção, não somente para dopamina, mas para outros tipos de

analitos tem sido descrita recentemente na literatura. Qiu, Peng e Liang (2007), obtiveram uma faixa linear de 10 a 4000  $\mu\text{mol.L}^{-1}$  para glicose com um limite de detecção de 3,2  $\mu\text{mol.L}^{-1}$ , desenvolvendo um biossensor a base de core-shell formado por nanopartículas de ferro revestidas com sílica para imobilização de enzimas oxidases. Tan *et al.* (2009), que também produziram um biossensor de core-shell com nanopartículas magnéticas de ferro, porém, revestidas com quitosana para a imobilização de hemoglobina, detectaram peróxido de hidrogênio, com uma faixa linear de 50 a 1800  $\mu\text{mol.L}^{-1}$  e limite de detecção de 4  $\mu\text{mol.L}^{-1}$ . A utilização de nanomateriais estruturados pode ser extremamente vantajosa, visto que, conforme descrito anteriormente, é necessário que os dispositivos alcancem baixo limite de detecção, devido a pequena quantidade encontrada de DA em amostras reais.

Dentre as biomoléculas mais usadas para a detecção de DA, pode-se encontrar utilização de enzimas como a laccase e tirosinase, que catalisam a oxidação das catecolaminas, incluindo a DA. A tirosinase foi selecionada para a construção dos biossensores em questão, pois possui a vantagem adicional de possuir baixo custo relativo, além de poder ser adquirida a partir de extratos vegetais (LETE, 2017; ROYCHOUDHURY; BASU; JHA, 2016; WARDAK; PACZOSA-BATOR; MALINOWSKI, 2020), minimizando ainda mais o valor do dispositivo. A enzima age catalisando a reação de oxidação de um o-difenol em o-quinona, no caso da DA, para o-dopaquinona (dopamina-o-quinona), cujo processo pode ser acompanhado usando técnicas eletroquímicas, como demonstrado na Figura 7 (SAJID; BAIG; ALHOOSHANI, 2019).

**Figura 7** - Reação química de catálise da oxidação da dopamina pela tirosinase.



Fonte: Própria.

Além disso, conforme descrito anteriormente, nas amostras reais, os ácidos úrico e ascórbico podem interferir no sinal eletroquímico do DA. No entanto, um estudo mostrou que medir a redução direta de dopamina-o-quinona, durante a detecção da DA, pode minimizar esta interferência. Contudo, para isso, a enzima deve estar efetivamente imobilizada sobre o biossensor. Neste sentido, o core-shell visa, ainda, contribuir também na diminuição da interferência (ROYCHOUDHURY; BASU; JHA, 2016).

E considerando que o desenvolvimento da doença de Parkinson pode estar associado a poluição do ar e seus materiais particulados, uma situação que é agravada continuamente nas áreas urbanas, se torna de alta relevância facilitar o acompanhamento da doença. Portanto, por auxiliar na escolha do método de tratamento, a construção de biossensores mais seletivos e eficientes, para a detecção de DA, terá um papel importante para a saúde pública.

## 2 OBJETIVO GERAL

Desenvolver um biossensor formado pelo core-shell ZnO@Au, para imobilização da enzima tirosinase em um eletrodo miniaturizado de carbono, para aplicação no acompanhamento da doença de Parkinson.

Para a realização do objetivo proposto, as seguintes etapas foram desenvolvidas:

- Sintetizar nanopartículas de óxido de zinco (ZnO);
- Sintetizar as nanopartículas de ouro (Au) para recobrimento das nanopartículas de óxido de zinco (ZnO) para formação do core-shell (ZnO@Au);
- Caracterizar os nanomateriais por espectroscopia UV-Vis e microscopia de força atômica;
- Imobilizar de forma efetiva a enzima tirosinase sobre o core-shell;
- Construir o biossensor a partir do core-shell modificado usando eletrodo impresso de carbono;
- Otimizar as as condições experimentais;
- Obter os parâmetros analíticos relevantes, como repetibilidade das medidas, reprodutibilidade de construção do biossensor, seletividade limite de detecção do dispositivo e sua faixa de operação;
- Aplicar o dispositivo em amostras de urina sintética fortificada com dopamina.

### 3 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

As técnicas eletroquímicas são bastante utilizadas no desenvolvimento de biossensores devido à simplicidade de utilização e monitoramento do sinal, integrando um sistema de baixo custo. No entanto, para que o aumento do sinal seja linearmente dependente da quantidade de espécies em solução do elemento de reconhecimento, a enzima deverá estar devidamente imobilizada sobre a superfície sensora. Assim, o uso das nanoestruturas do tipo core-shell possibilitará a imobilização da biomolécula de forma mais efetiva e com maior estabilidade, evitando que ocorra lixiviação da enzima durante as medidas. Para as medidas eletroquímicas, foi utilizado voltametria de pulso diferencial, devido a sua sensibilidade, permitindo que pequenas concentrações possam ser detectadas com sucesso.

#### 3.1 Equipamentos e reagentes

Equipamentos utilizados: balança de precisão AW 220 (Shimadzu), pHmetro DM 22 (Digimed), micropotenciostato AUTOLAB PGSTAT (Metrohm), espectrofotometro UV-1800 (Shimadzu), Thermo Microscope AutoProbe CP-Research, Adaptador de eletrodo DropSens (Metrohm), Centrífuga 206 MP (Fanem).

Materiais utilizados: balões volumétricos (25 mL, 50 mL e 1000 mL), pipeta de Pasteur, micropipetas (50 $\mu$ L, 200  $\mu$ L e 1000 $\mu$ L), béqueres (25 mL, 50 mL, 100 mL e 1000 mL), Falcon®, eletrodo impresso de carbono (Metrohm), gaze, Eppendorf®, termômetro, cubeta de quartzo, triturador, sistema de refluxo, chapa aquecedora.

Reagentes utilizados: fosfato de sódio bibásico P.A (Synth), fosfato de potássio monobásico anidro P.A (Êxodo), sulfato de sódio anidro P.A. (Nuclear), cloreto de potássio P.A. (Êxodo), cloreto de amônio P.A. (Êxodo), cloreto de sódio P.A. (Dinâmica), uréia P.A. (Neon), cloreto de cálcio di-hidratado P.A. (Nuclear), ácido tetracloroáurico(III) tri-hidratado ACS (Sigma Aldrich), sódio citrato di-hidratado P.A.-RO (Ecibra), hidróxido de sódio P.A (Êxodo), ácido clorídrico 37% P.A./ACS (Neon), cloreto de zinco P.A. (Êxodo).

## **3.2 Preparo das soluções**

### **3.2.1 Solução de tampão fosfato 0,1 mol L<sup>-1</sup> pH 7**

A solução de tampão fosfato 0,1 mol.L<sup>-1</sup> pH 7,0 foi preparada a partir de 3,446g fosfato de potássio monobásico e 3,522g de fosfato de sódio dibásico; pesados adequadamente em balança de precisão; os quais foram dissolvidos separadamente com água deionizada. Sucessivamente as duas soluções foram colocadas em um balão volumétrico de 1000mL e o menisco foi acertado com água deionizada. Após isso, utilizou-se um pHmetro para ajustar o pH para 7,0, com o uso de ácido clorídrico 1 mol.L<sup>-1</sup> e hidróxido de sódio 1 mol.L<sup>-1</sup>. Posteriormente, a solução foi colocada em um frasco âmbar e conservada em geladeira.

### **3.2.2 Solução de dopamina 0,0025 mol.L<sup>-1</sup>**

As soluções estoque de dopamina 0,0025 mol.L<sup>-1</sup> ou 2500 µmol.L<sup>-1</sup>, foram preparadas diariamente em balões volumétricos de 10 mL (para pouca geração de resíduos) e o volume completado com solução tampão fosfato 0,1 mol.L<sup>-1</sup> em pH 7. Após a seleção das melhores condições experimentais, a curva de calibração, a solução de dopamina foi feita com solução tampão fosfato 0,1 mol.L<sup>-1</sup> em pH 7,4, simulando o pH fisiológico como descrito por Barbanti *et al.* (2006).

### **3.2.3 Urina sintética**

Para determinação de dopamina em amostras reais, foi utilizado urina sintética fortificada com uma concentração conhecida do neurotransmissor. A preparação e composição da urina foi feita como descrito por Silva, Lourenco e Fatibello-Filho (2015), composta por: 0,73 g NaCl; 0,40 g KCl; 0,27 g CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O; 0,56 g Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>; 0,35 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 0,25 g NH<sub>4</sub>Cl e 6,25 g ureia, dissolvidos e avolumados com água deionizada em um balão volumétrico de 250 mL.

### 3.3 Obtenção do extrato enzimático

O inhame, tubérculo rico em tirosinase, foi utilizado para a extração da enzima. Após lavagem e secagem, 25 g do vegetal descascado foram picados e homogeneizados em um triturador com 100 mL do tampão fosfato  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  (pH 7,0). Em seguida, filtrou-se o extrato em quatro camadas de tecido (gaze), e em tubos falcon foi centrifugado a 1800 rpm durante 20 minutos como é representado na Figura 8. A solução sobrenadante foi então separada e dividida em diversas alíquotas de 250  $\mu\text{L}$ , armazenadas em refrigerador a  $4^\circ\text{C}$  e utilizadas posteriormente como fonte enzimática de tirosinase (SIGNORI, FATIBELLO-FILHO, 1994).

**Figura 8** - Extrato enzimático.



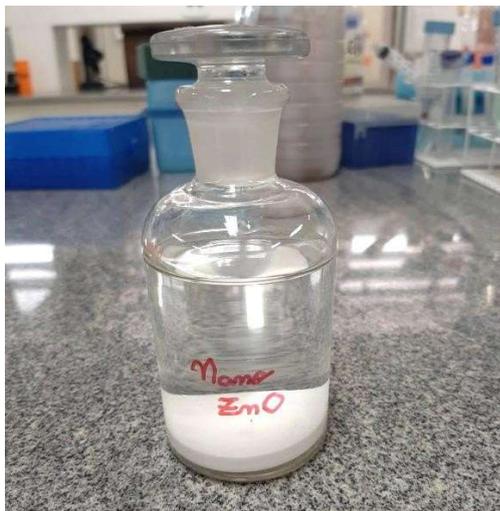
Fonte: Própria.

### 3.4 Síntese das nanopartículas de ZnO

Para a síntese das nanopartículas de ZnO, o artigo de Savi *et al.* (2011) foi utilizado como base, com algumas modificações. Primeiramente, foi dissolvido NaOH em água destilada, obtendo-se uma solução de concentração  $1,0 \text{ mol.L}^{-1}$ , a qual foi aquecida sob constante agitação à uma temperatura de  $85^\circ\text{C}$ . Em seguida, uma solução  $0,5 \text{ mol.L}^{-1}$  de  $\text{ZnCl}_2$  foi adicionada lentamente ao sistema, de forma a precipitar o ZnO. Mantendo-se a temperatura, a solução permaneceu sob agitação por mais 1 hora. Depois de filtrada, foi lavada 5 vezes com água deionizada até que chegasse ao pH 7 e armazenada em água deionizada em um frasco, de acordo com

a Figura 9. Como descrito por Savi *et al.* (2011) foi considerado a rota mais adequada de síntese para as nanopartículas de ZnO, por obter um menor tamanho de cristalito. Estas nanopartículas serão o núcleo do core-shell.

**Figura 9** - Nanopartículas de óxido de zinco (ZnO).



Fonte: Própria.

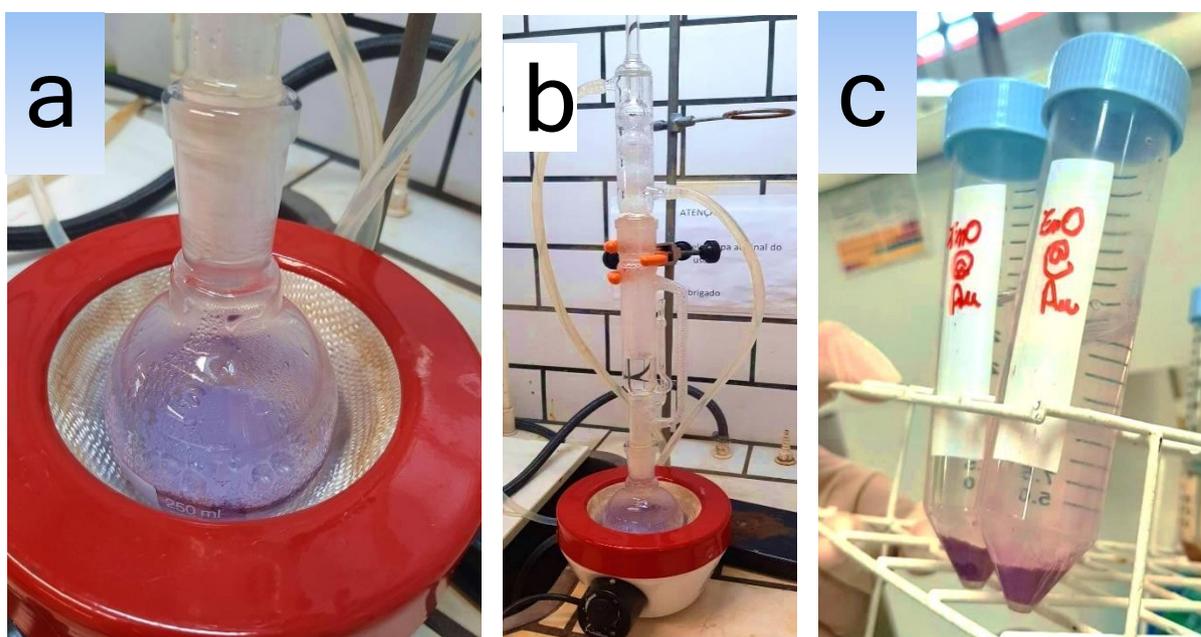
### 3.5 Produção do core-shell ZnO@Au

Primeiramente, foi testado o método de síntese adaptado de Riahifar *et al.* (2021), onde as nanopartículas de ZnO (já sintetizadas) foram revestidas com ouro, pela redução ácido tetracloroáurico(III) tri-hidratado ( $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ ), causado pelo agente redutor citrato de sódio.

Para a montagem do sistema, 20 mL da suspensão agitada de nanopartículas de ZnO foram transferidos para um balão de fundo redondo, com capacidade de 250mL, e mantidos em aquecimento até entrar em ebulição. Logo em seguida, foram adicionadas duas soluções, previamente preparadas em água deionizada: de 10 mL de  $\text{HAuCl}_4$  (0,1%) e 5 mL de citrato de sódio (1%) (RIAHIFAR *et al.*, 2021). O sistema foi fechado e mantido em refluxo. Instantaneamente, a cor original da suspensão das nanopartículas de ZnO foi alterada de branca para roxa, como mostram as Figuras 10a e 10b. A mistura se manteve sob refluxo durante 30 minutos. Posteriormente, o aquecimento foi interrompido e, naturalmente, a solução foi resfriada até atingir a temperatura ambiente. Após, as nanopartículas de ZnO@Au foram lavadas com água

deionizada, e então, a nova suspensão foi centrifugada a 1800 rpm por 10 min. O sobrenadante foi descartado, para retirar as nanopartículas de ouro possivelmente em excesso e, este processo de lavagem, foi repetido algumas vezes até que a suspensão atingisse o pH 7 (adaptado de RIAHIFAR *et al.*, 2021). Em seguida, o sistema foi armazenado em água deionizada em tubos Falcon®, demonstrado na Figura 10c.

**Figura 10** - Síntese do core-shell formado pelas nanopartículas de ZnO recobertas com ouro: (a) durante o aquecimento, (b) sistema fechado e (c) após a lavagem.



Fonte: Própria.

### 3.6 Caracterização do core-shell

Após síntese do ZnO@Au, há necessidade de caracterização química para comprovação da eficiência do método usado para sua produção. Desta forma, foram obtidos espectros no ultravioleta-visível usando um espectrofotômetro: (i) das nanopartículas de ZnO puras e (ii) após conversão em nanoestruturas de ZnO@Au.

Para a obtenção dos espectros de ultravioleta dos nanomateriais, foi utilizada uma cubeta de quartzo, de 1 cm de caminho óptico, que foi lavada e ambientada com água deionizada. Primeiramente o equipamento foi calibrado utilizando-se um branco (água deionizada pura). As soluções contendo os nanomateriais foram diluídas

usando a proporção de 200  $\mu\text{L}$  para 1800  $\mu\text{L}$  de água. Após serem levemente agitadas, foram analisadas numa faixa de 200 a 800 nm de comprimento de onda, procedimento válido para ambas as nanopartículas (Adaptado de ABDELHALIM *et al.*, 2012).

Para a caracterização morfológica do nanomaterial, foram realizadas medidas usando microscopia de força atômica (AFM), somente das nanopartículas de ZnO e após formação do core-shell. Para isso, as suspensões dos nanomateriais (ZnO e ZnO@Au), foram inseridas em uma superfície de silício (20 x 20 mm), que anteriormente ao uso, foi submersa em ácido fluorídrico 50% m/m e limpas com água deionizada. Para a análise, 10  $\mu\text{L}$  do sobrenadante da suspensão das nanopartículas ZnO foram introduzidos na placa. Já a suspensão do core-shell, como se encontrava muito concentrada, foi necessário retirar 10  $\mu\text{L}$  do sobrenadante, diluir em 1 mL de água deionizada e utilizar 10  $\mu\text{L}$  da solução diluída. Após o processo de lavagem e transferência da suspensão para a placa, a mesma, foi seca ao ar ambiente com 60% de umidade, por 2 horas. A ponta de pequena curvatura (raio de 5mm), localizada na extremidade do *cantilever* de nitreto de silício, e com uma faixa de varredura de 1 a 4 Hz, proporcionam um escaneamento sem contato, o qual não gera qualquer dano à estrutura das nanopartículas ou à sua imagem de resolução nanométrica (Adaptado de MENDES *et al.*, 2017).

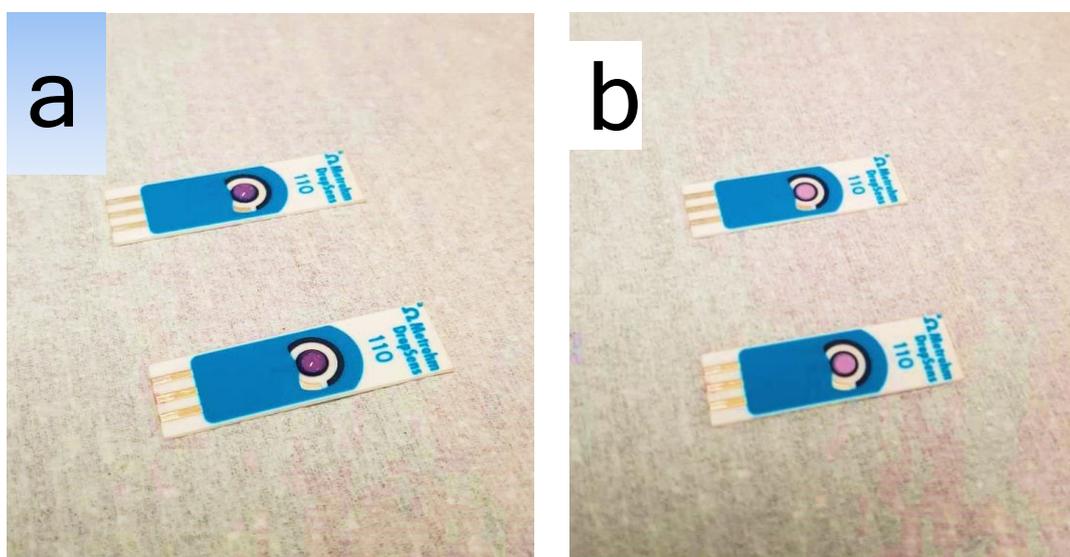
### **3.7 Imobilização da tirosinase sobre o core-shell**

Para a imobilização da enzima sobre o eletrodo, 40  $\mu\text{L}$  da solução de core-shell foram transferidas para um frasco Eppendorf® e adicionou-se 200  $\mu\text{L}$  do extrato contendo tirosinase por um determinado tempo (inicialmente 20 minutos), posteriormente, foi determinado que o melhor tempo de interação foi de 45 minutos. Após o tempo de contato determinado, o sobrenadante foi retirado e o sistema foi lavado com 20  $\mu\text{L}$  da solução tampão fosfato 0,1 mol L<sup>-1</sup> (pH inicialmente 7,0), posteriormente, foi determinado que o pH de lavagem mais adequado foi o pH 8,0, para retirar as biomoléculas fracamente ligadas. Então, o sobrenadante foi retirado novamente para ser gotejado sobre o eletrodo.

### 3.8 Construção do biossensor

Após imobilização da enzima sobre o core-shell, 5  $\mu\text{L}$  do  $\text{ZnO@Au}$ /tirosinase foram gotejados sobre um eletrodo impresso de carbono (Metrohm) para produção do biossensor. A gota foi mantida até secar naturalmente, a  $22^\circ\text{C}$ . O processo de construção do dispositivo está demonstrado nas Figuras 11a e 11b.

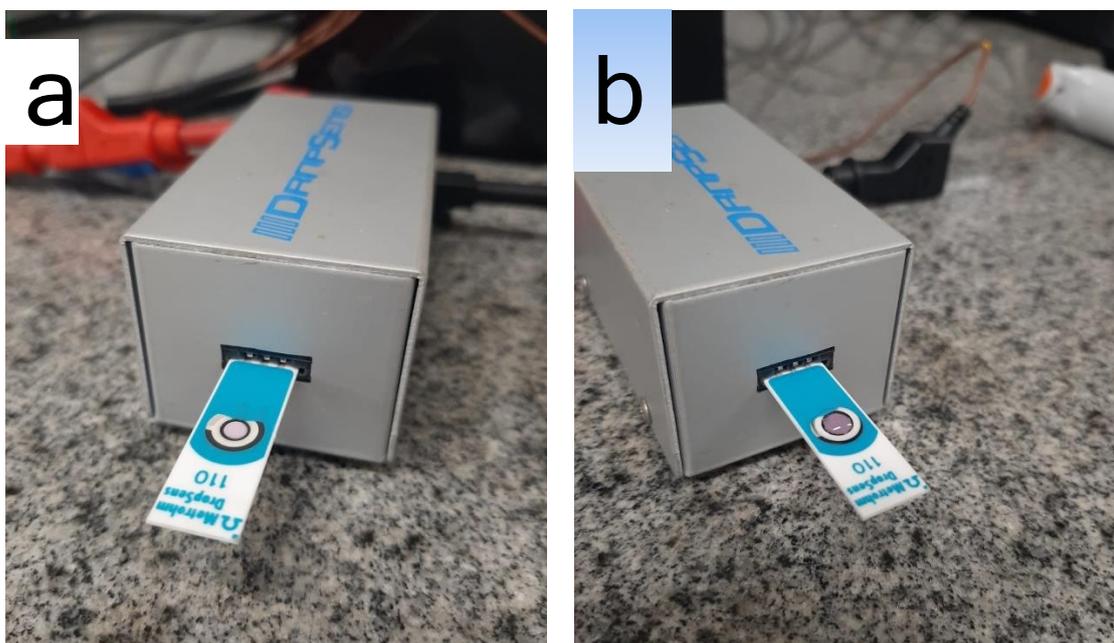
**Figura 11** – Modificação do eletrodo de trabalho com  $\text{ZnO@Au}$ /tirosinase: (a) logo após o gotejamento (b) após a etapa de secagem.



Fonte: Própria.

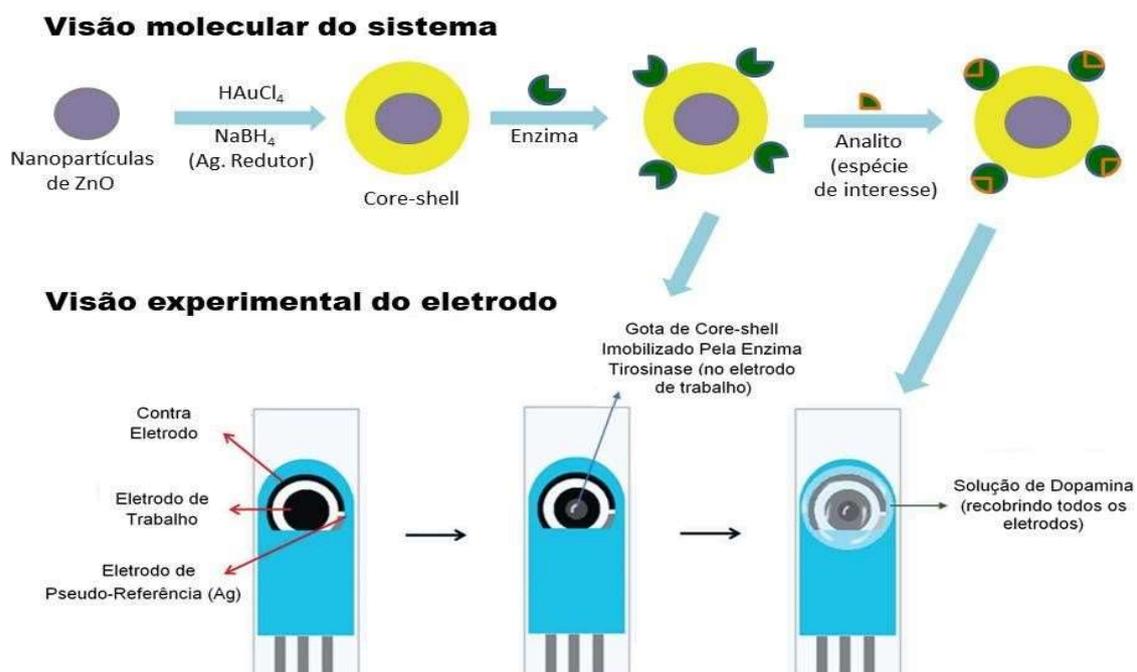
Então, após inserir o eletrodo no adaptador DropSens, foram gotejados sobre os três eletrodos (trabalho, referência e contra-eletrodo) 50  $\mu\text{L}$  de uma solução de dopamina recém preparada. As Figuras 12a e 12b apresentam esta etapa do processo de leitura da dopamina. Na Figura 13 é apresentado um esquema do sistema completo do procedimento, desde a síntese do core-shell até sua leitura final no dispositivo.

**Figura 12** – Conexão ao adaptador com: (a) biossensor proposto construído e (b) após gotejamento da solução de dopamina sobre os três eletrodos.



Fonte: Própria.

**Figura 13** - Esquema geral do procedimento de construção do biossensor proposto.



Fonte: Adaptado de (SILVA, 2019).

### 3.9 Testes iniciais e otimização das condições experimentais usando o biossensor proposto

Como teste inicial, para comprovar que a produção do core-shell contendo a enzima tirosinase imobilizada proporciona melhores resultados na quantificação de dopamina, comparado à modificação do eletrodo somente com as nanopartículas de ZnO, foram preparados 4 tipos de configurações diferentes para a modificação do eletrodo de carbono miniaturizado.

A primeira análise foi feita somente com a nanopartícula de ZnO (sem enzima), em que 5  $\mu\text{L}$  da suspensão agitada da mesma foi gotejada diretamente sobre o eletrodo. Com a gota já seca, adicionou-se 50  $\mu\text{L}$  da solução de dopamina 2500  $\mu\text{mol.L}^{-1}$  seguido da leitura do sinal.

A segunda análise foi feita com a nanopartícula de ZnO contendo a enzima imobilizada, após um tempo de contato, na qual 40  $\mu\text{L}$  da suspensão da nanopartícula foi transferida para um Eppendorf® e foram adicionados 200  $\mu\text{L}$  do extrato enzimático. Esse sistema permaneceu em repouso por 20 minutos. Após, o sobrenadante foi retirado e o sistema lavado com 20  $\mu\text{L}$  da solução tampão fosfato 0,1 mol  $\text{L}^{-1}$  pH 7,0. O sobrenadante foi novamente retirado, e então 5  $\mu\text{L}$  da suspensão agitada foi gotejada sobre o eletrodo. Com a secagem da gota, adicionou-se 50  $\mu\text{L}$  da solução de dopamina 2500  $\mu\text{mol.L}^{-1}$  para leitura de sinal.

A terceira foi feita somente com o core-shell ZnO@Au (sem enzima), usando a mesma metodologia descrita na primeira análise.

E, por fim, a quarta medida foi realizada com o core-shell ZnO@Au contendo a tirosinase imobilizada, com a mesma metodologia descrita na segunda análise. Em todos os casos foram obtidos voltamogramas de pulso diferencial, entre os potenciais -0,4 e 0,6 V com 25mV de amplitude de pulso a 80  $\text{mV.s}^{-1}$ .

Após a constatação de que o método proposto foi eficiente, iniciou-se os estudos para otimização das condições experimentais, ou seja, a seleção daquelas em que a resposta do biossensor é máxima. Segue abaixo a descrição do procedimento envolvido nos estudos realizados.

### 3.9.1 Tempo de contato ZnO@Au/enzima

Em um frasco Eppendorf® foram adicionadas 40µL de suspensão de ZnO@Au. Então, adicionou-se 200 µL de extrato enzimático de tirosinase. Os tempos testados de interação entre o core shell e a tirosinase foram: 20 minutos, 45 minutos, 2 horas e 24 horas. Após, o sistema foi lavado com 20 µL da solução tampão fosfato 0,1 mol.L<sup>-1</sup> pH 7,0, para retirar as biomoléculas fracamente ligadas. Então, 5 µL do core shell modificado foram gotejados sobre um eletrodo impresso de carbono. Após secagem da gota, adicionou-se 50 µL da solução de dopamina 2500 µmol.L<sup>-1</sup> e foi realizada as leituras usando voltamogramas de pulso diferencial, entre os potenciais -0,4 e 0,6 V com 25mV de amplitude de pulso a 80 mV.s<sup>-1</sup>.

### 3.9.2 Seleção do pH do tampão de lavagem

O core shell foi modificado com a enzima tirosinase conforme descrito no item 3.9.1. No entanto, o melhor tempo de contato de 45 minutos foi empregado e na etapa de lavagem para a retirada das biomoléculas fracamente ligadas, foi utilizado tampão fosfato 0,1 mol.L<sup>-1</sup> em diferentes pHs: 5,0; 6,0; 7,0; 8,0 e 9,0, já que pHs mais extremos podem prejudicar a atividade da enzima. Então, 5 µL do core shell modificado foram gotejados sobre um eletrodo impresso de carbono. Após secagem da gota, adicionou-se 50 µL da solução de dopamina 2500 µmol.L<sup>-1</sup> e foi realizada as leituras usando voltamogramas de pulso diferencial, entre os potenciais -0,4 e 0,6 V com 25mV de amplitude de pulso a 80 mV.s<sup>-1</sup>.

## 3.10 Obtenção dos parâmetros analíticos com o biossensor proposto

Após otimização das condições experimentais, foram obtidos os parâmetros analíticos com o biossensor proposto, tais como região linear, limite de detecção, reprodutibilidade, seletividade, exatidão, estabilidade, efeito de memória e exatidão em urina sintética.

### 3.10.1 Obtenção da curva de calibração

Para que o biossensor possa ser aplicado na determinação de dopamina em amostras, é necessário que seja obtida uma curva de calibração. Para isso, foram construídos biossensores utilizando-se as melhores condições otimizadas: pH de lavagem igual a 8,0 e tempo de contato de 45 minutos. Os biossensores foram aplicados em diferentes concentrações de dopamina: 0,1; 50; 100; 200; 300 e 500  $\mu\text{mol.L}^{-1}$ , em tampão fosfato 0,1  $\text{mol.L}^{-1}$ , pH 7,4, simulando o pH fisiológico como descrito por Barbanti *et al.* (2006). As medidas foram realizadas usando voltamogramas de pulso diferencial, entre os potenciais -0,4 e 0,6 V com 25mV de amplitude de pulso a 80  $\text{mV.s}^{-1}$ .

### 3.10.2 Limite de detecção

O limite de detecção foi determinado a partir de dez leituras da solução do branco (tampão fosfato 0,1  $\text{mol.L}^{-1}$ , pH 7,4). Para o cálculo utilizou-se a seguinte relação:  $3,3 s_d/a$ , sendo “ $s_d$ ” o desvio padrão de 10 medidas do branco e “ $a$ ” o coeficiente angular da curva de calibração. As medidas foram realizadas usando voltamogramas de pulso diferencial, entre os potenciais -0,4 e 0,6 V com 25mV de amplitude de pulso a 80  $\text{mV.s}^{-1}$ .

### 3.10.3 Exatidão do biossensor proposto

Para verificar a exatidão das respostas obtidas com o biossensor proposto, foram construídos três biossensores nas mesmas condições experimentais. Então, fortificou-se uma solução de tampão fosfato 0,1  $\text{mol.L}^{-1}$ , pH 7,4, com uma concentração conhecida de 250  $\mu\text{mol.L}^{-1}$  de dopamina. Então, os biossensores foram aplicados para leitura desta solução. A média das medidas de corrente foram substituídas na equação da reta gerada pela curva de calibração e o resultado correspondente de concentração obtida foi analisado. As medidas foram realizadas usando voltamogramas de pulso diferencial, entre os potenciais -0,4 e 0,6 V com 25mV de amplitude de pulso a 80  $\text{mV.s}^{-1}$ .

### **3.10.4 Reprodutibilidade de construção do biossensor proposto**

A determinação da reprodutibilidade de construção do biossensor é um parâmetro muito importante que indica se o método usado na confecção fornece leituras com valores próximos, quando se utiliza mais de um dispositivo.

Para este, foram construídos três biossensores nas mesmas condições experimentais. Foram realizadas as medidas de corrente elétrica usando solução de dopamina  $2500 \mu\text{mol.L}^{-1}$ , em tampão fosfato  $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ , pH 7,4, em todos os casos. As medidas foram realizadas usando voltamogramas de pulso diferencial, entre os potenciais -0,4 e 0,6 V com 25mV de amplitude de pulso a  $80 \text{ mV.s}^{-1}$ . A partir das correntes obtidas, foi calculado o coeficiente de variação.

### **3.10.5 Teste de seletividade do biossensor**

Foram realizadas cinco medidas de corrente elétrica nas mesmas condições experimentais no biossensor proposto e preparadas em solução de tampão fosfato  $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ , pH 7,4. A primeira continha somente  $250 \mu\text{mol.L}^{-1}$  da solução de dopamina. A segunda,  $250 \mu\text{mol.L}^{-1}$  de glicose e de dopamina. A terceira, continha  $250 \mu\text{mol.L}^{-1}$  de ácido ascórbico e de dopamina. A quarta,  $250 \mu\text{mol.L}^{-1}$  de oxalato de sódio e de dopamina. A quinta, por fim, continha uma mistura de  $250 \mu\text{mol.L}^{-1}$  de cada substância: dopamina, glicose, ácido ascórbico e oxalato de sódio. As medidas foram realizadas usando voltamogramas de pulso diferencial, entre os potenciais -0,4 e 0,6 V com 25mV de amplitude de pulso a  $80 \text{ mV.s}^{-1}$ .

### **3.10.6 Teste de estabilidade do biossensor**

Para este teste, foi construído um único biossensor que foi utilizado em diferentes dias, para verificar se a resposta do dispositivo se mantém estável. Foram realizadas as medidas de corrente elétrica usando solução de dopamina  $250 \mu\text{mol.L}^{-1}$  em tampão fosfato  $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ , pH 7,4. Após a medida do primeiro dia, a gota de dopamina no eletrodo, foi seca com papel, sendo absorvida por capilaridade, sem retirar da superfície a camada contendo core-shell/tirosinase. Após cada medida, o biossensor foi armazenado na geladeira. O biossensor foi testado por 15 dias. As

medidas foram realizadas usando voltamogramas de pulso diferencial, entre os potenciais -0,4 e 0,6 V com 25mV de amplitude de pulso a 80 mV.s<sup>-1</sup>.

### **3.10.7 Teste de efeito de memória**

O efeito de memória foi verificado por meio da realização de quatro medidas consecutivas usando duas concentrações distintas de dopamina: 100 e 250 µmol.L<sup>-1</sup> em tampão fosfato 0,1 mol.L<sup>-1</sup>, pH 7,4. A sequência das medidas foram: 100, 250, 100 e 250 µmol.L<sup>-1</sup>. As medidas foram realizadas usando voltamogramas de pulso diferencial, entre os potenciais -0,4 e 0,6 V com 25mV de amplitude de pulso a 80 mV.s<sup>-1</sup>.

### **3.10.8 Análise em urina sintética**

Para verificar a exatidão das respostas obtidas em urina sintética, foram construídos três biossensores nas mesmas condições experimentais. Então, fortificou-se a solução de urina sintética, com uma concentração conhecida de 250 µmol.L<sup>-1</sup> de dopamina. O estudo foi realizado em triplicata e a média dos valores obtidos foi substituída na equação da reta da curva de calibração. As medidas foram realizadas usando voltamogramas de pulso diferencial, entre os potenciais -0,4 e 0,6 V com 25mV de amplitude de pulso a 80 mV.s<sup>-1</sup>.

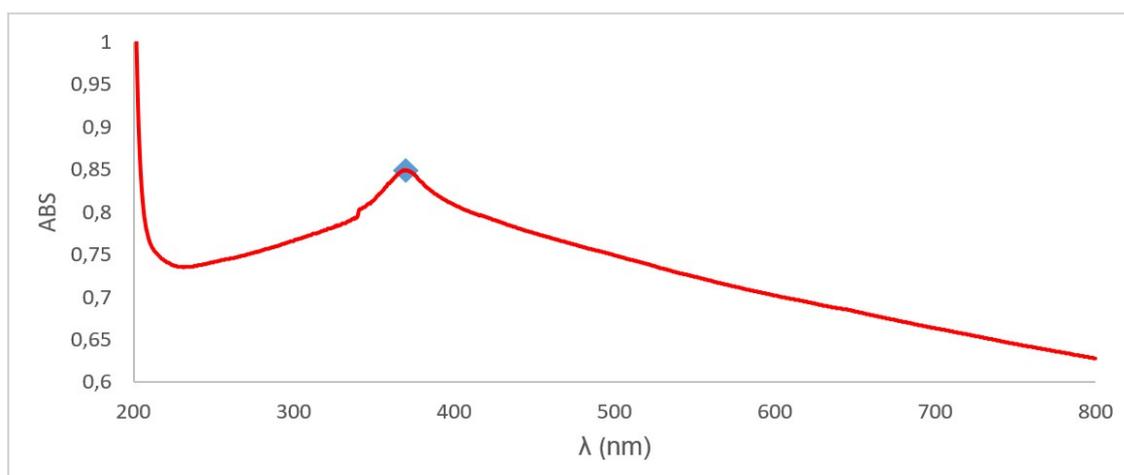
## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Caracterização do core-shell

#### 4.1.1 Espectroscopia no Ultravioleta/Visível

A fim de verificar se houve formação do core-shell de ZnO@Au, foram obtidos espectros na região do ultravioleta-visível, tanto das nanopartículas de ZnO puras quanto após o recobrimento com as nanopartículas de ouro. As Figuras 14 e 15 apresentam os resultados obtidos, respectivamente.

**Figura 14** - Espectro UV-Vis das nanopartículas de ZnO.

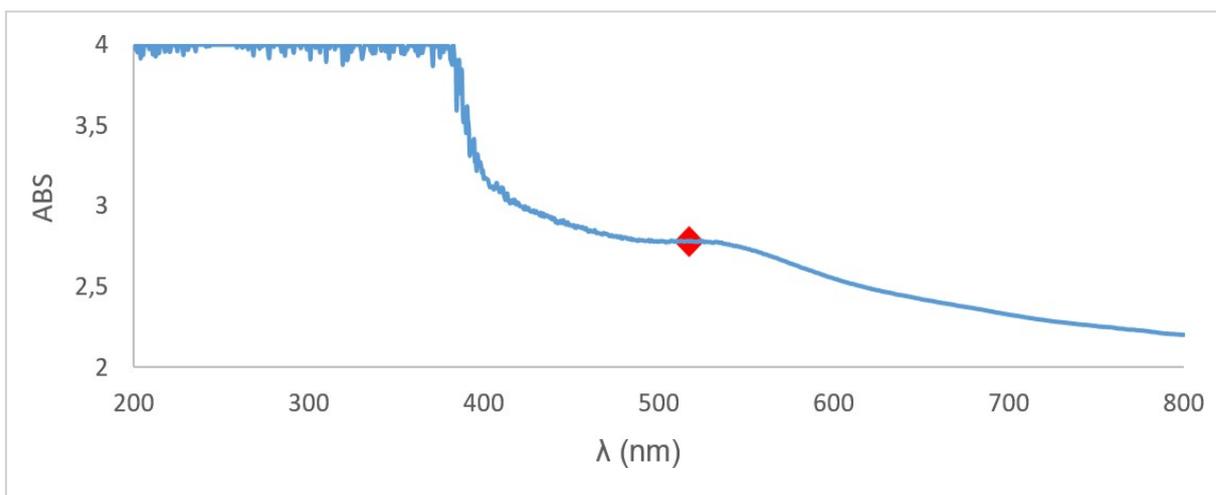


Fonte: Própria.

Conforme é possível verificar na Figura 14, em 371 nm de comprimento de onda, observa-se uma banda referente a absorção de óxido de zinco, que está de acordo com o apresentado por Bhushan *et al.* (2022). Assim, pode-se afirmar que a síntese destas nanopartículas foi bem-sucedida.

Já observando o espectro referente as nanoestruturas de ZnO@Au (Figura 15), há uma banda em 523 nm, que coincide com o comprimento de onda de absorção do ouro, de acordo com o avaliado por Abdelhalim *et al.* (2012) e Rahman (2016). Para que a banda relativa ao ouro ficasse evidente, foi necessário realizar um aumento da imagem nesta região, ocasionando uma saturação na região do óxido de zinco. Assim, há evidências de que houve conversão das nanopartículas do óxido metálico no core-shell proposto.

**Figura 15** - Espectro UV-Vis da nanoestrutura de ZnO@Au.

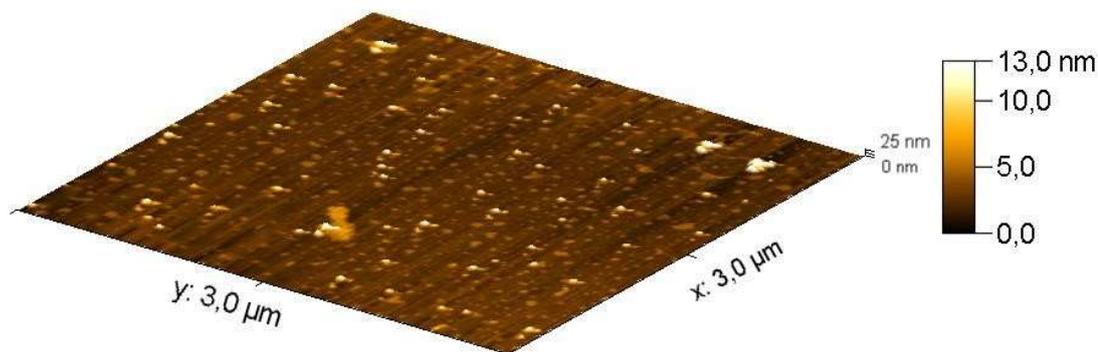


Fonte: Própria.

#### 4.1.2 Microscopia de Força Atômica

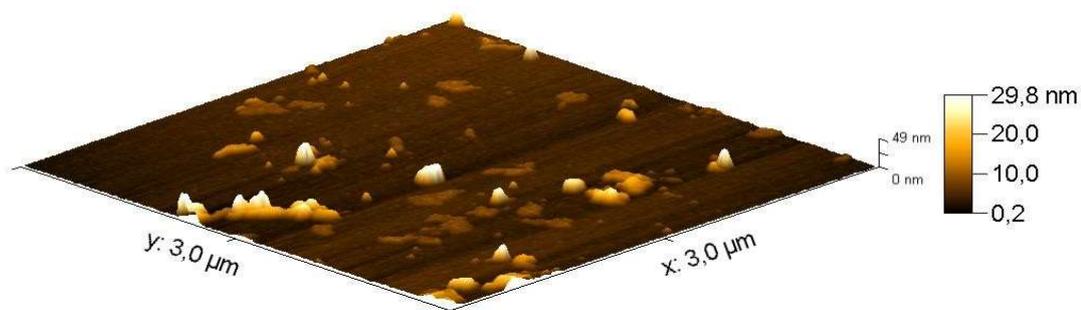
Após a caracterização espectroscópica, foram realizadas medidas utilizando-se microscopia de força atômica (MFA) visando estimar o tamanho e a morfologia do core-shell de ZnO@Au. A técnica possibilitou obter imagens 3D (Figuras 16 e 17) e 2D (Figuras 18a, 18b, 19a e 19b) tanto das nanopartículas de ZnO, quanto após recobrimento com as nanopartículas de ouro. Assim, foi possível observar a forma e topografia da nanoestrutura, além de proporcionar a leitura de perfil das nanopartículas (Figuras 21 e 23), para a medição de suas reais dimensões atômicas e poder analisar a variedade de tamanhos de nanopartículas geradas antes e após a formação do core-shell. Assim como realizado no artigo de Mendes *et al.* (2017) que, a partir das imagens obtidas por microscopia, também definiu o tamanho e morfologia das nanopartículas de ZnO e constatou o aumento de diâmetro após a imobilização enzimática e funcionalização com quitosana.

**Figura 16** – Imagem 3D das nanopartículas de ZnO com  $3\mu\text{m} \times 3\mu\text{m} \times 25\text{nm}$  de dimensão, apresentando a topografia da amostra.



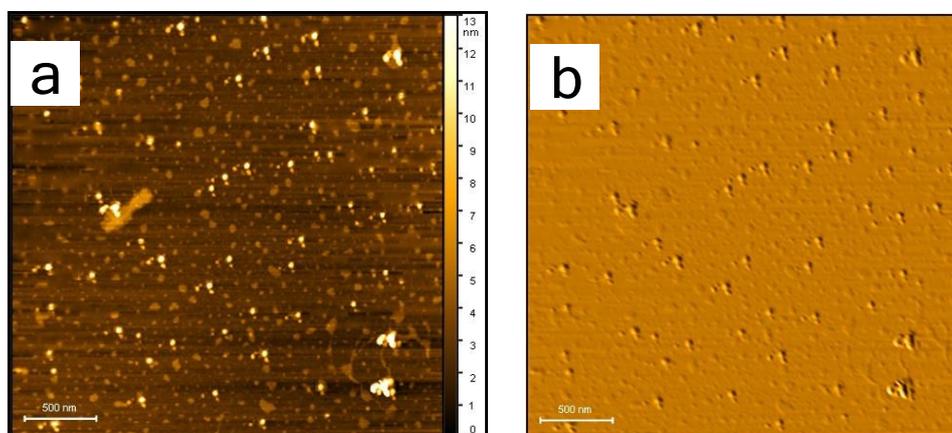
Fonte: Própria.

**Figura 17** – Imagem 3D da nanoestrutura core-shell ( $\text{ZnO@Au}$ ) com  $3\mu\text{m} \times 3\mu\text{m} \times 49\text{nm}$  de dimensão, apresentando a topografia da amostra.



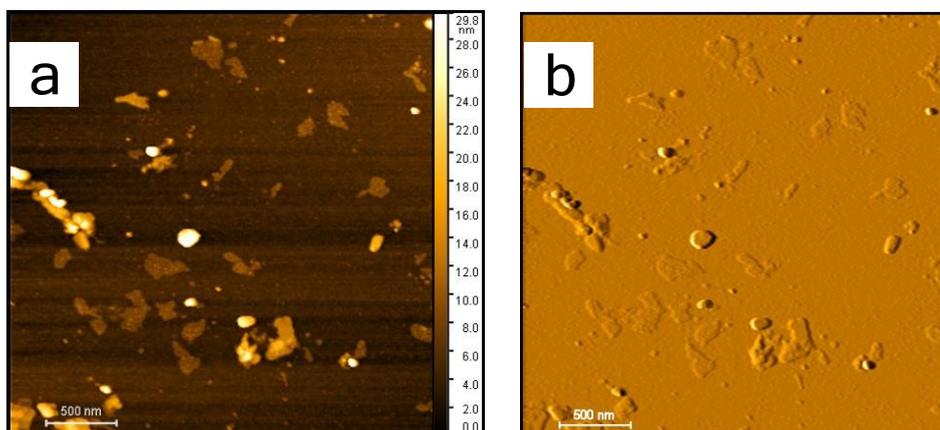
Fonte: Própria.

**Figura 18** - Imagens 2D das nanopartículas ZnO com  $3\mu\text{m} \times 3\mu\text{m}$  de dimensão: (a) topografia (b) mudança de ângulo de iluminação para destaque.



Fonte: Própria.

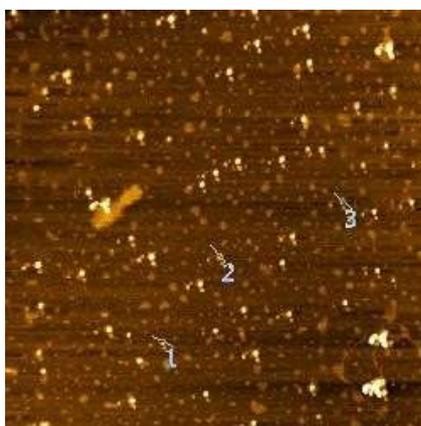
**Figura 19** - Imagens 2D da nanoestrutura core-shell (ZnO@Au) com 3 $\mu$ m x 3 $\mu$ m de dimensão: (a) topografia (b) mudança de ângulo de iluminação para destaque.



Fonte: Própria.

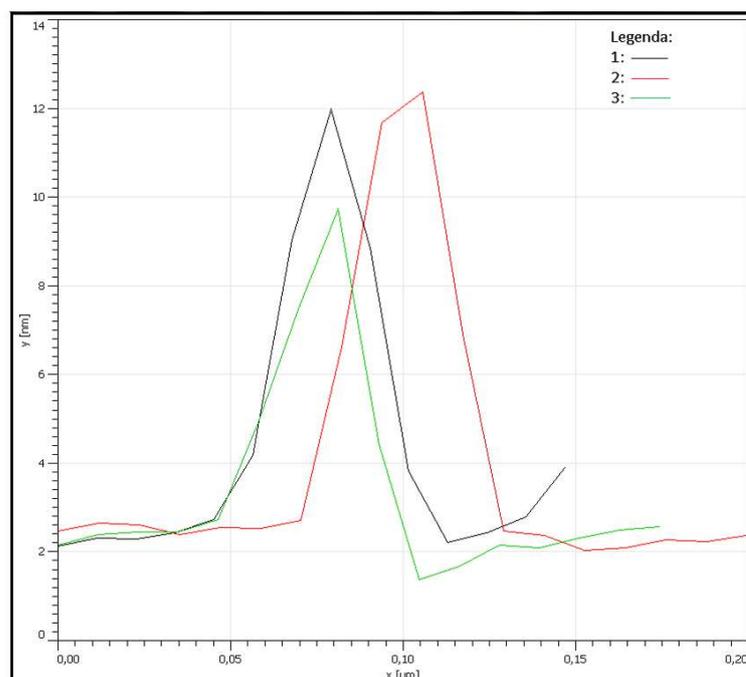
Analisando as Figuras 16 e 18 (das nanopartículas de ZnO) e, comparando com as Figuras 17 e 19 (referentes ao core-shell), é possível verificar que ocorreu um aumento do tamanho do nanomaterial recoberto com as nanopartículas de ouro, indicando eficiência na produção das nanoestruturas de ZnO@Au. Segundo as Figuras descritas, foi possível supor que o tamanho das nanopartículas ZnO e ZnO@Au, respectivamente, estariam em torno de 13nm e 29 nm, dados que só podem ser calculados com mais exatidão a partir da análise das linhas de perfil. Visando, portanto, maior precisão destes valores, primeiramente, foram selecionadas aleatoriamente três nanopartículas de ZnO para serem analisadas e gerarem suas respectivas linhas de perfil e dados de dimensão, apresentadas nas Figuras 20 e 21, bem como um resumo dos dados obtidos na Tabela 1.

**Figura 20** - Nanopartículas de ZnO selecionadas na varredura para análise.



Fonte: Própria.

**Figura 21** - Linha de perfil das nanopartículas de ZnO selecionadas.



Fonte: Própria.

**Tabela 1** - Dados de dimensão das nanopartículas de ZnO.

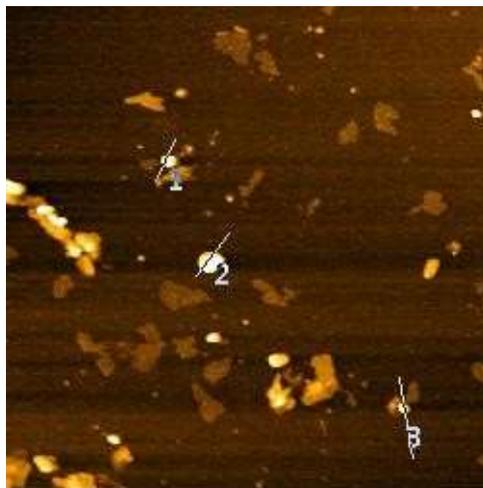
n	X <sub>1</sub> (nm)	Y <sub>1</sub> (nm)	X <sub>2</sub> (nm)	Y <sub>2</sub> (nm)	Y <sub>2</sub> - Y <sub>1</sub> (nm)
1	195	89	201	100	11
2	141	123	154	134	11
3	110	196	120	207	11

Fonte: Própria.

Para estimar a dimensão das partículas é necessário calcular a diferença entre  $Y_2$  e  $Y_1$ , apresentados na Tabela 1, cujo valor representa sua “altura”. Portanto, o valor calculado da dimensão das nanopartículas de ZnO é de 11nm e, de acordo com as imagens topográficas, a rota de síntese resultou em partículas simétricas e bem distribuídas, sendo consideradas excelentes.

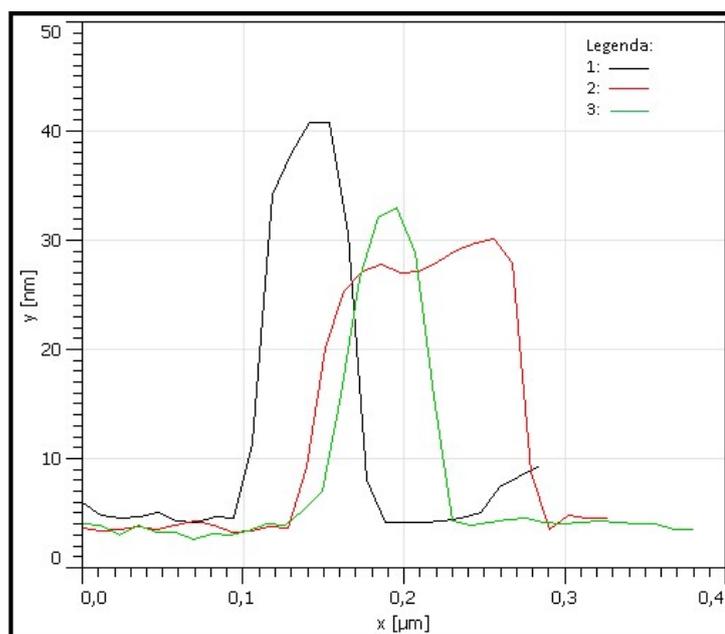
Após esta análise, o core-shell passou pelo mesmo procedimento de estudo, para o qual foram selecionadas três nanopartículas de ZnO@Au, aparentemente de tamanhos semelhantes, já que não houve muita simetria entre as partículas encontradas nas Figuras de topografia, a fim de serem analisadas para geração de suas respectivas linhas de perfil e dados de dimensão, conforme apresentado nas Figuras 22 e 23, bem como na Tabela 2.

**Figura 22** - Nanoestrutura de ZnO@Au selecionadas na varredura para análise de suas linhas de perfil.



Fonte: Própria.

**Figura 23** - Linha de perfil das nanoestruturas de ZnO@Au selecionadas.



Fonte: Própria.

**Tabela 2** - Dados de dimensão das nanoestruturas de ZnO@Au.

n	X <sub>1</sub> (nm)	Y <sub>1</sub> (nm)	X <sub>2</sub> (nm)	Y <sub>2</sub> (nm)	Y <sub>2</sub> - Y <sub>1</sub> (nm)
1	79	72	89	94	22
2	100	121	117	143	22
3	196	205	210	228	23

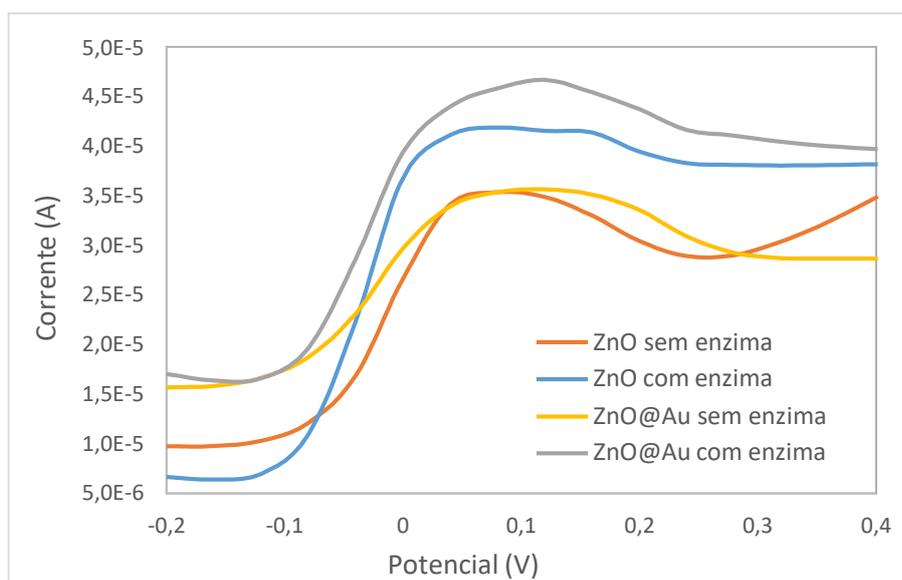
Fonte: Própria.

Assim como descrito anteriormente, calculou-se a diferença entre  $Y_2$  e  $Y_1$ , apresentados na Tabela 2. O valor calculado da dimensão da nanoestrutura de ZnO@Au é de aproximadamente 22 nm, o que confirma o recobrimento com as nanopartículas ouro, já que a dimensão da nanoestrutura dobrou de tamanho. Dessa forma, pode-se concluir que houve a produção satisfatória do core-shell. Assim, prosseguiu-se com o desenvolvimento do biossensor

## 4.2 Testes iniciais com o biossensor

O objetivo deste teste foi comprovar que o uso do core-shell (ZnO@Au), de fato, contribui na imobilização da biomolécula, em comparação à utilização somente das nanopartículas de ZnO. Para isso, foram analisados o comportamento do dispositivo a base de nanopartículas de ZnO, com e sem a imobilização enzimática, bem como aquele baseado na nanoestrutura de ZnO@Au, com e sem tirosinase. Para isso, foram realizados voltamogramas de pulso diferencial em solução de dopamina  $2500 \mu\text{mol.L}^{-1}$ , em tampão fosfato  $0,1 \text{ mol. L}^{-1}$ , pH 7,0. Os voltamogramas obtidos estão apresentados na Figura 24.

**Figura 24** – Voltamogramas de pulso diferencial obtidos para avaliação do core-shell ZnO@Au como suporte de imobilização para a enzima tirosinase em solução de dopamina  $2500 \mu\text{mol.L}^{-1}$ , em tampão fosfato  $0,1 \text{ mol. L}^{-1}$ , pH 7,0. Amplitude de pulso de 25 mV e  $80 \text{ mV.s}^{-1}$  de velocidade de varredura.



Fonte: Própria.

De acordo com os dados apresentados na Figura 24, é possível observar que as menores correntes são obtidas para os dispositivos que não contém a enzima tirosinase imobilizada, indicando que a mesma seja importante no comportamento do processo de análise (catálise). Já quando se compara as correntes obtidas com os biossensores, observa-se que aquele que foi construído usando o core-shell ZnO@Au, como suporte para a imobilização enzimática, há um incremento no sinal de aproximadamente 11%, indicativo que o recobrimento das nanopartículas de ZnO pelas nanopartículas de ouro apresenta efeito sinérgico, além de favorecer a atividade da enzima, devido a biocompatibilidade do material inerte, que está de acordo com os dados obtidos por Thamilselvan et al. (2019). Desta forma, é possível concluir que a plataforma foi eficiente na imobilização da tirosinase para a construção do biossensor. Para aumentar ainda mais este incremento de corrente pelo uso do core-shell, foram estudadas as melhores condições experimentais, a fim de selecionar aquelas com maiores sinais eletroquímicos, visando aumentar a sensibilidade do dispositivo.

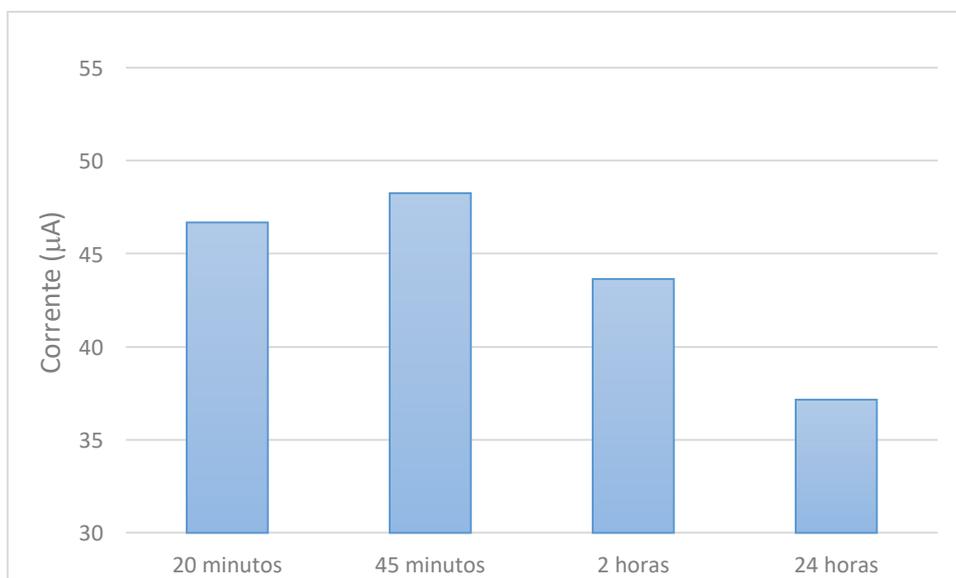
### **4.3 Otimização das condições experimentais**

Após definir o método mais adequado para a imobilização da enzima tirosinase, foram realizados estudos para definição das melhores condições experimentais. Este estudo é de extrema importância e impacta na sensibilidade do dispositivo. Abaixo, os resultados serão melhor discutidos.

#### **4.3.1 Estudo do tempo de interação entre o core-shell ZnO@Au e a enzima tirosinase**

Para este estudo, foram testados quatro tempos distintos de interação entre o core-shell sintetizado e a enzima tirosinase. Para cada tempo estudado, foram obtidos voltamogramas de pulso diferencial em solução de dopamina  $2500 \mu\text{mol.L}^{-1}$ , em tampão fosfato  $0,1 \text{ mol. L}^{-1}$ , pH 7,0. Os voltamogramas obtidos estão apresentados na Figura 25. Para melhor visualização dos dados, as correntes elétricas obtidas em cada tempo do estudo estão apresentadas na Tabela 3.

**Figura 25** – Resultados da variação de corrente elétrica obtidos em cada tempo de estudo de interação entre o core-shell e a tirosinase, em solução de dopamina 2500  $\mu\text{mol.L}^{-1}$ , em tampão fosfato 0,1 mol.  $\text{L}^{-1}$ , pH 7,0. Amplitude de pulso de 25 mV e 80  $\text{mV.s}^{-1}$  de velocidade de varredura.



Fonte: Própria.

**Tabela 3** - Correntes obtidas com os biossensores construídos em diferentes tempos de interação entre o core-shell e a tirosinase.

Tempo de interação $\text{ZnO@Au/Enzima}$	Corrente ( $\mu\text{A}$ )
20 minutos	46,70
45 minutos	48,25
2 horas	43,64
24 horas	37,14

Fonte: Própria.

Analisando a Tabela 3, é possível verificar que o máximo de corrente foi obtido no tempo de 45 minutos de interação entre o core-shell e a biomolécula, mesmo que este aumento seja de 3,5%, pode ser significativo para análises em baixa concentração do analito, quando comparado com o biossensor construído em 20 minutos. Em tempos superiores, observa-se uma diminuição da resposta. Isso pode estar ocorrendo pois, em tempos maiores, uma maior quantidade de enzima pode permanecer imobilizada, acarretando uma biocamada mais espessa (SIGNORI;

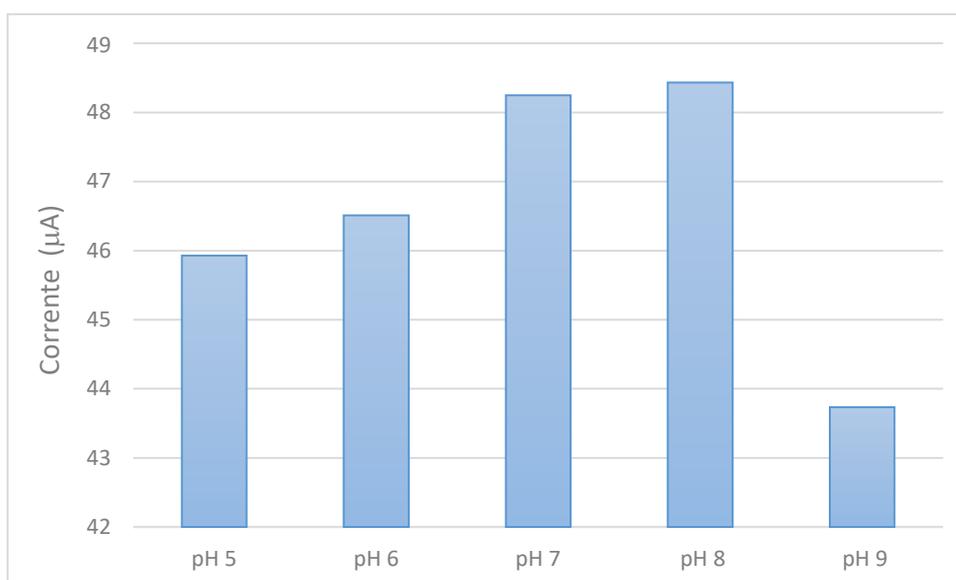
FATIBELLO-FILHO, 1994), que prejudica a transferência de elétrons na superfície do eletrodo, com conseqüente diminuição no valor da corrente elétrica.

Desta forma, o tempo de 45 minutos foi selecionado para os experimentos subsequentes.

#### 4.3.2 Estudo de pH do tampão fosfato de lavagem após a etapa de imobilização enzimática

Para este estudo, foram construídos cinco biossensores que variaram apenas no pH da solução tampão usada para lavagem do core-shell após a imobilização enzimática. Como a enzima possui aminoácidos em sua estrutura, a variação do pH pode protonar ou desprotonar os grupos terminais, podendo interferir no processo de imobilização. Os pHs foram variados entre 5 e 9. Então, foram obtidos voltamogramas de pulso diferencial em solução de dopamina  $2500 \mu\text{mol.L}^{-1}$ , em tampão fosfato  $0,1 \text{ mol. L}^{-1}$ , pH 7,0. Amplitude de pulso de 25 mV e  $80 \text{ mV.s}^{-1}$  de velocidade de varredura. A Figura 27 apresenta as correntes obtidas.

**Figura 27** – Resultados da variação de corrente elétrica obtidos em cada pH de lavagem após a imobilização enzimática, em solução de dopamina  $2500 \mu\text{mol.L}^{-1}$ , em tampão fosfato  $0,1 \text{ mol. L}^{-1}$ , pH 7,0. Amplitude de pulso de 25 mV e  $80 \text{ mV.s}^{-1}$  de velocidade de varredura.



Fonte: Própria.

Para melhor visualização dos dados, as correntes elétricas obtidas em cada tempo do estudo estão apresentadas na Tabela 4.

**Tabela 4** - Correntes obtidas com os biossensores construídos usando soluções com diferentes pHs usadas nas lavagens envolvidas após a etapa de imobilização da enzima.

<b>pH</b>	<b>Corrente (<math>\mu\text{A}</math>)</b>
5	45,93
6	46,51
7	48,25
8	48,43
9	43,73

Fonte: Própria.

Analisando a Tabela 4 e a Figura 27, é possível observar que o maior sinal de resposta, está muito próximo ao obtido no pH 7, que foi registrado no pH 8, é um valor ótimo de pH para a enzima, e está de acordo com o trabalho de Canbay e Akyilmaz (2014).

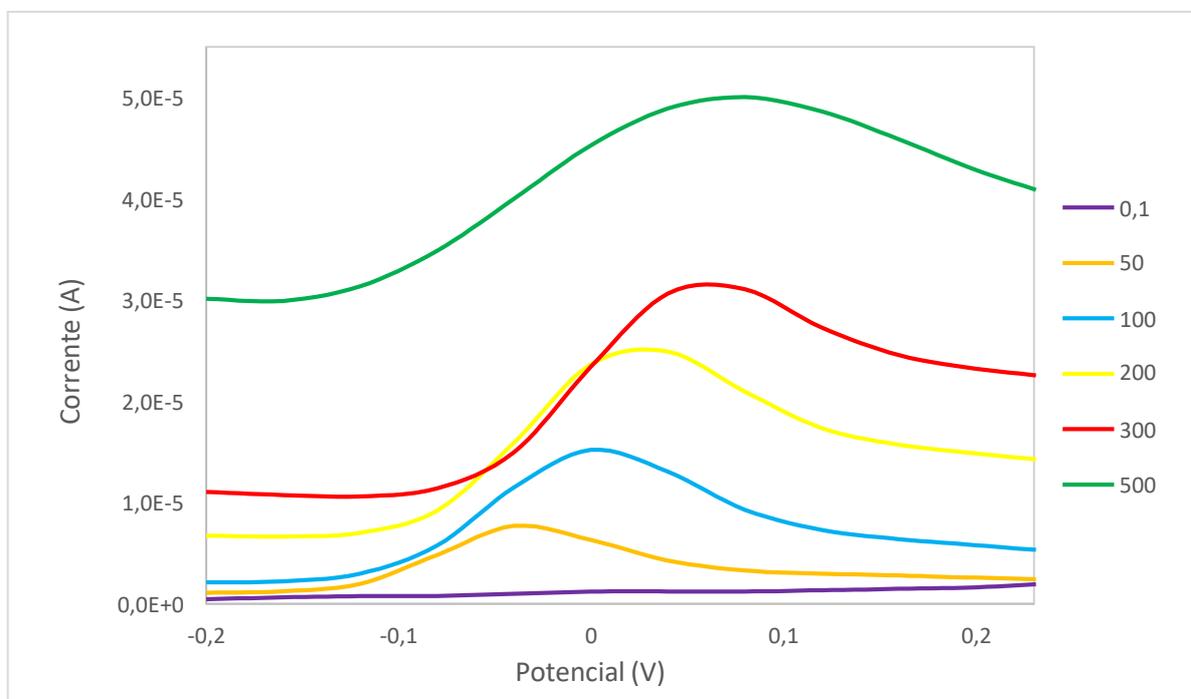
#### **4.4 Parâmetros analíticos**

##### **4.4.1 Curva de calibração**

Após a otimização das condições experimentais, foi possível obter a curva analítica, que é extremamente relevante para, posteriormente, aplicar o biossensor proposto para a determinação de dopamina em amostras de interesse.

Para isso, foram construídos biossensores nas mesmas condições experimentais, que variaram na concentração de dopamina que foi gotejada sobre os mesmos ( $n=6$ ). Como pretende-se aplicar o biossensor em amostras fisiológicas, optou-se por preparar as soluções de dopamina em solução tampão pH 7,4 ao invés de pH 7,0. As medidas foram realizadas usando voltametria de pulso diferencial, com amplitude de 25 mV e velocidade de varredura de 80  $\text{mV}\cdot\text{s}^{-1}$ . Os respectivos voltamogramas estão apresentados na Figura 28.

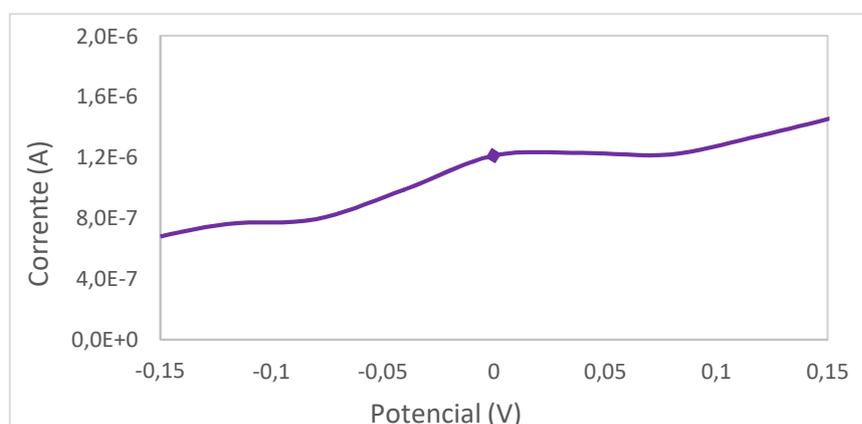
**Figura 28** – Voltamogramas de pulso diferencial obtidos com o biossensor proposto em diferentes concentrações de dopamina em tampão fosfato 0,1 mol L<sup>-1</sup> pH 7,4: 0,1; 50; 100; 200; 300; 500 μmol.L<sup>-1</sup>. Amplitude de pulso de 25 mV e velocidade de varredura de 80 mV s<sup>-1</sup>.



Fonte: Própria.

Para melhor visualização, o voltamograma referente a concentração de 0,1 μmol L<sup>-1</sup> de dopamina está apresentado na Figura 29, de forma ampliada.

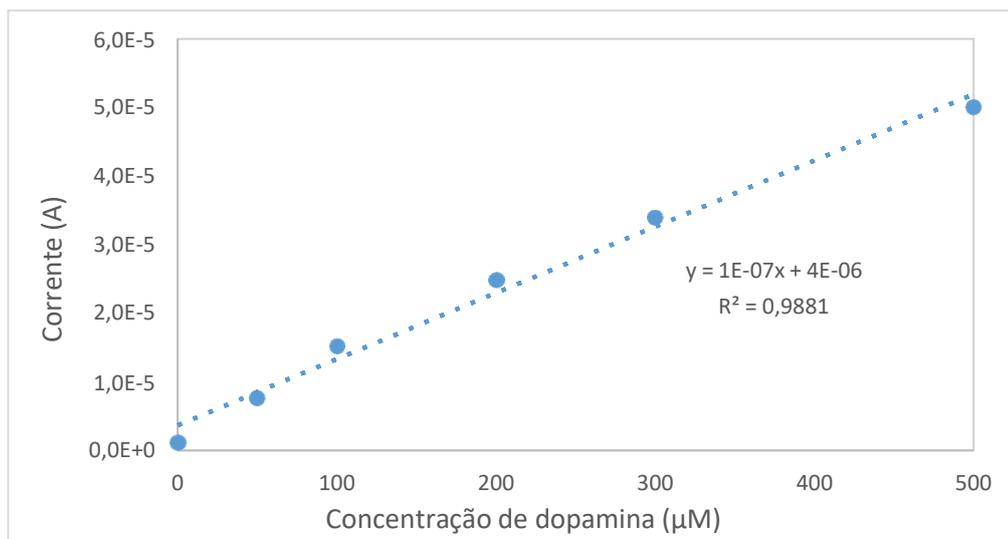
**Figura 29** – Voltamograma de pulso diferencial obtidos com o biossensor proposto em tampão fosfato 0,1 mol L<sup>-1</sup> pH 7,4 contendo 0,1 μmol.L<sup>-1</sup> de dopamina. Amplitude de pulso de 25 mV e velocidade de varredura de 80 mV s<sup>-1</sup>.



Fonte: Própria.

A partir dos valores de corrente obtidos nos voltanogramas de pulso diferencial em cada concentração de dopamina, foi possível obter a curva analítica, que está apresentada na Figura 30.

**Figura 30** – Curva analítica obtida com o biossensor proposto em diferentes concentrações de dopamina, em tampão fosfato 0,1 mol L<sup>-1</sup> pH 7,4. Amplitude de pulso de 25 mV e velocidade de varredura de 80 mV s<sup>-1</sup>.



Fonte: Própria.

Analisando a curva analítica da Figura 30, é possível verificar que biossensor proposto apresentou resposta satisfatória em diferentes concentrações de dopamina, apresentando uma região linear entre 0,1 e 500 µmol.L<sup>-1</sup>. Pode ser observado que, já na última concentração o biossensor apresentou leve queda de sinal. Em concentrações maiores a corrente foi se mantendo praticamente constante, indicando saturação do sistema. A equação da reta correspondente da curva analítica é verificada na Equação 1.

$$y(A) = 1.10^{-7} x (\mu\text{mol.L}^{-1}) + 4.10^{-6} (R^2 = 0,9881) \quad \text{Eq. 1}$$

#### 4.4.2 Limite de detecção

A partir da curva analítica calculou-se também o limite de detecção do biossensor para o analito dopamina. Para isso, utilizou-se o valor do desvio padrão de

dez medidas no biossensor no branco de tampão fosfato 0,1 mol L<sup>-1</sup> pH 7,4 (sd) e o coeficiente angular da reta (a). O valor obtido foi de 0,0855 µmol.L<sup>-1</sup>, segundo a Equação 2.

$$LD = \frac{3,3 \cdot \bar{y}}{a} = \frac{3,3 \cdot 2,9 \cdot 10^{-9}}{1 \cdot 10^{-7}} = 0,0855 \mu\text{mol.L}^{-1} \quad \text{Eq. 2}$$

A Tabela 5, apresenta uma relação do limite de detecção e da região linear de outros biossensores encontrados na literatura envolvendo a determinação de dopamina.

**Tabela 5** - Comparação de limite de detecção e faixa linear de outros biossensores baseados em core-shell com nanopartículas de ouro, na determinação de DA.

Método de detecção	Limite de detecção (µmol.L <sup>-1</sup> )	Faixa linear (µmol.L <sup>-1</sup> )	Referências
AuNPs@SiO <sub>2</sub> / polímeros impressos molecularmente / eletrodo de carbono vítreo	0,02	0,048 a 50	YU <i>et al.</i> (2012)
Ag@C / AuNPs / eletrodo de carbono vítreo	0,21	0,5 a 4278	LIU <i>et al.</i> (2019)
AuNPs @ polianilina / quitosana / eletrodo de carbono vítreo	5	10 a 1700	YANG <i>et al.</i> (2012)
AuNPs @ ZnONPs / nanocone / espuma de grafeno	0,04	0 a 80	YUE <i>et al.</i> (2020)
AuNPs@Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> / eletrodo de carbono vítreo	0,0027	0 a 0,8	THAMILSELVAN <i>et al.</i> (2019)
AuNPs@ polímeros impressos molecularmente Au	0,0078	0,02 a 0,54	XUE <i>et al.</i> (2013)
ZnO@Au/ eletrodo impresso de carbono	0,0855	0,1 a 500	Este trabalho

Fonte: Própria.

Como descrito anteriormente, no relatório da Chromsystems Instruments & Chemicals GmbH (CICG, 2012), a concentração máxima ideal de dopamina na urina seria de até 3,24 µmol/24h, equivalente a 500 µg/24h. O valor de referência do Haoma By Dnaclinic (2019) para o exame em urina, tem uma faixa de 80,0 a 500 µg/24h, ou seja, de 3,24 a 0,52 µmol/24h. Segundo este dado, concentrações de dopamina abaixo de 0,52 µmol/24h poderiam estar associadas a diminuição do desempenho do sistema dopaminérgico. Portanto, observando a Tabela 5, verifica-se que o biossensor proposto tem uma ampla região linear que abrange a faixa de concentração que se

busca em um exame de urina. Alguns dos trabalhos da literatura citados na Tabela 5, não compreendem a faixa que deve ser investigada, por não detectarem os níveis normais ou a falta de dopamina excretada.

Realizou-se um breve levantamento bibliográfico, na base de dados *Science Direct (Elsevier)*, onde foi possível encontrar outros tipos de métodos de detecção da dopamina com core-shell, composto por outras nanopartículas e outros tipos de estrutura, como, estruturas em nanocone com espuma de grafeno (YUE *et al.*, 2020) e core-shell (nanopétala) associado a um eletrodo de carbono vítreo, de tamanho convencional (XIANG *et al.*, 2019). Porém, na base de dados analisada não foi encontrado nenhum método de detecção da dopamina usando core-shell ZnO@Au, sobre eletrodos impressos de carbono, destacando-se a inovação do dispositivo proposto.

#### 4.4.3 Exatidão do biossensor em solução tampão de pH fisiológico

A fim de verificar se o biossensor apresentava exatidão, o mesmo foi aplicado em um amostra de tampão fosfato 0,1 mol L<sup>-1</sup>, pH 7,4, que foi fortificada com 250 µmol.L<sup>-1</sup> de dopamina. Este estudo foi feito em triplicata. As medidas foram realizadas usando voltametria de pulso diferencial com amplitude de 25 mV e velocidade de varredura de 80 mV s<sup>-1</sup>. A Tabela 6 apresenta as correntes elétricas obtidas.

**Tabela 6** - Correntes obtidas com os biossensores construídos usando soluções com 250 µmol.L<sup>-1</sup> de dopamina em tampão fosfato 0,1 mol L<sup>-1</sup>, pH 7,4.

Triplicata	Corrente (µA)
1	29,633
2	30,923
3	28,519
Média	29,692

Fonte: Própria.

O valor médio obtido de corrente foi 29,692 µA. Este valor foi substituído na equação da reta da curva analítica, obtendo-se uma concentração de 256,92 µmol.L<sup>-1</sup> de dopamina. Usando a Equação 3, foi calculado o erro relativo das medidas,

obtendo-se um valor de aproximadamente 2,77 %, considerado excelente.

$$\% \text{Erro} = \frac{260 - 250}{250} \times 100 = 2,77\% \quad \text{Eq. 3}$$

Após apresentar valor satisfatório em solução de pH fisiológico, o mesmo estudo também foi realizado em urina sintética.

#### 4.4.4 Estudo da reprodutibilidade de construção do biossensor

A fim de verificar se o método usado na construção do biossensor era adequado, foram obtidos três biossensores nas mesmas condições experimentais. Os mesmos foram aplicados em um amostra de tampão fosfato 0,1 mol L<sup>-1</sup>, pH 7,4, que foi fortificada com 2500 μmol.L<sup>-1</sup> de dopamina. As medidas foram realizadas usando voltametria de pulso diferencial com amplitude de 25 mV e velocidade de varredura de 80 mV s<sup>-1</sup>. A Tabela 7 apresenta as correntes elétricas obtidas.

**Tabela 7** - Correntes obtidas com os biossensores construídos usando soluções com 2500 μmol.L<sup>-1</sup> de dopamina em tampão fosfato 0,1 mol L<sup>-1</sup>, pH 7,4.

Triplicata	Corrente (μA)
1	48,248
2	47,241
3	47,729

Fonte: Própria

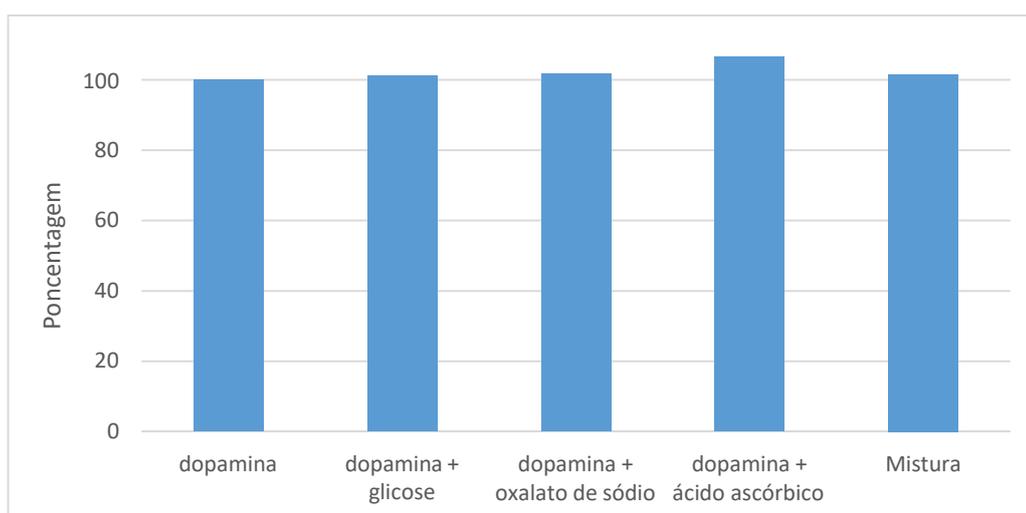
A partir dos dados obtidos, calculou-se o coeficiente de variação obtendo-se um valor de 1,05%, considerado muito bom em se tratando de um dispositivo contendo biomolécula. Dessa forma, podemos admitir que o método para a construção dos biossensores fornece dispositivos com respostas confiáveis.

#### 4.4.5 Estudo da seletividade do biossensor

Para comprovar a seletividade do biossensor à dopamina, na presença de substâncias comumente encontradas em amostras fisiológicas, foram construídos cinco biossensores nas mesmas condições experimentais, todos aplicados em um

amostra fortificada com  $250 \mu\text{mol.L}^{-1}$  de dopamina em tampão fosfato  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 7,4. A resposta de dopamina foi analisada na presença concomitante de glicose, ácido ascórbico, oxalato de sódio e a mistura de todas essas substâncias. O estudo foi avaliado usando voltamogramas de pulso diferencial, com amplitude de pulso de 25 mV e velocidade de varredura de  $80 \text{ mV s}^{-1}$ . Na Figura 31 há o comparativo das correntes elétricas obtidas em cada caso, considerando a corrente somente da dopamina  $250 \mu\text{mol.L}^{-1}$  como 100%. Para melhor visualização dos dados, os resultados estão também apresentados na Tabela 8.

**Figura 31** - Variação de corrente elétrica obtida com o biossensor, na presença dos interferentes em solução de dopamina  $250 \mu\text{mol.L}^{-1}$ , em tampão fosfato  $0,1 \text{ mol. L}^{-1}$ , pH 7,4. Amplitude de pulso de 25 mV e  $80 \text{ mV.s}^{-1}$  de velocidade de varredura.



Fonte: Própria.

**Tabela 8** - Porcentagens obtidas com os biossensores construídos usando soluções com  $250 \mu\text{mol.L}^{-1}$  de dopamina em tampão fosfato  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 7,4 na presença de interferentes.

Amostra	Varição (%)
Dopamina	100
Dopamina + Glicose	101,27
Dopamina + Oxalato de sódio	101,86
Dopamina + Ácido ascórbico	106,51
Mistura	101,67

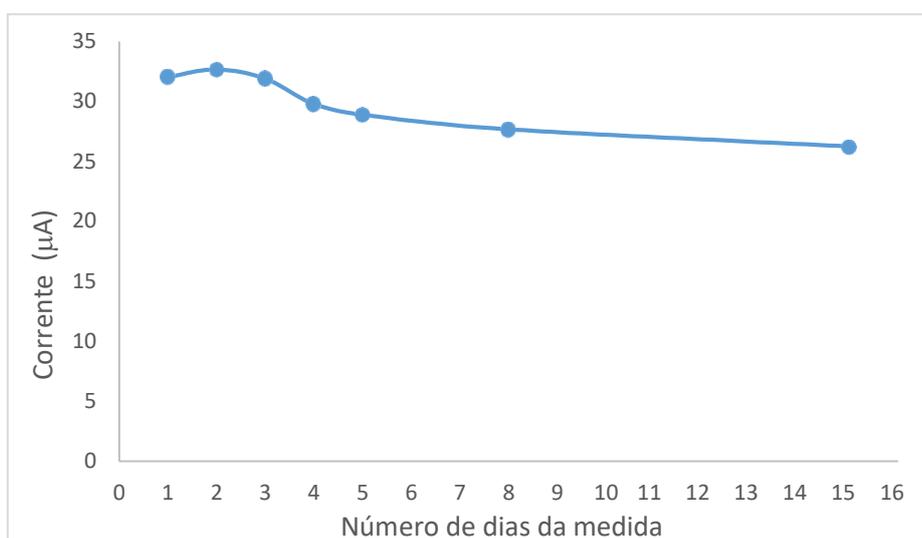
Fonte: Própria.

Conforme observado na Figura 31 e na Tabela 8, é possível verificar que a resposta de dopamina, na presença dos interferentes estudados, não alterou de forma significativa. O dispositivo mostrou uma alta seletividade apresentando uma alteração abaixo de 7% na presença dos interferentes estudados. Este resultado é extremamente relevante, uma vez, em amostras de urina, o ácido ascórbico é um interferente em potencial, conforme descrito por Sajid, Baig e Alhooshani (2019) e Silva (2018). Ácido úrico não foi testado por já haver ureia na composição da urina sintética preparada.

#### 4.4.6 Estudo da estabilidade do biossensor

A fim de verificar por quanto tempo um mesmo biossensor pode ser usado sem que haja perda significativa de sua resposta, foi feito um estudo para avaliar a estabilidade do dispositivo proposto. Para isso, foi construído um biossensor nas condições otimizadas e, diariamente, foi aplicado em solução tampão fosfato 0,1 mol.L<sup>-1</sup>, contendo 250 µmol.L<sup>-1</sup> de dopamina. Após leitura, a gota de dopamina foi retirada com papel, por capilaridade, e o biossensor foi armazenado sob refrigeração para a seguinte medida. Entre as medidas, a solução de dopamina foi removida do biossensor usando um papel limpo. As respostas de corrente obtidas nos dias avaliados estão apresentadas na Figura 32.

**Figura 32** – Corrente elétrica obtida com o mesmo biossensor durante 15 dias, em solução de dopamina 250 µmol.L<sup>-1</sup>, em tampão fosfato 0,1 mol. L<sup>-1</sup>, pH 7,4. Amplitude de pulso de 25 mV e 80 mV.s<sup>-1</sup> de velocidade de varredura.



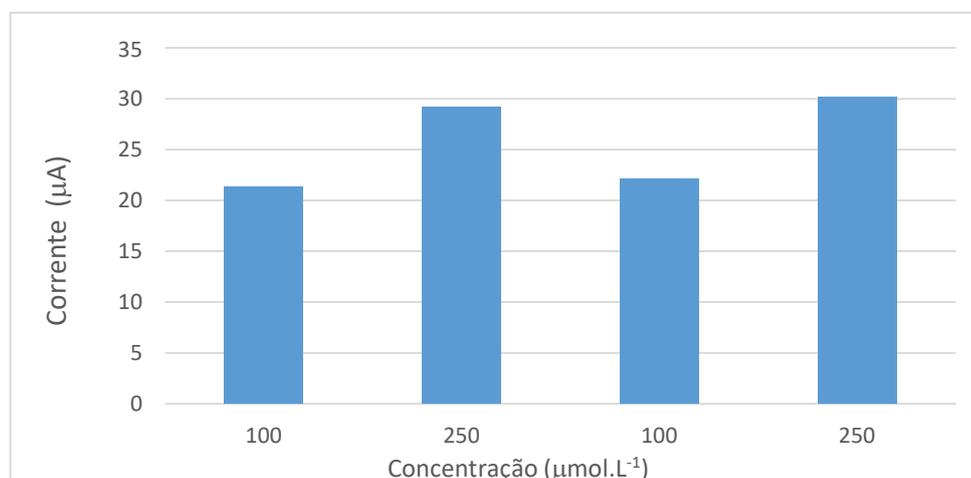
Fonte: Própria.

Analisando a Figura 32, verifica-se que, após 15 dias, a corrente do biossensor diminui em torno de 20%, considerada significativa uma vez que pretende-se avaliar baixas concentrações de dopamina na amostra. Durante os primeiros cinco dias de estudo, a resposta do biossensor variou em torno de 11%. Desta forma, acredita-se que este seja o prazo limite para que biossensor pode ser reutilizado com eficácia. Ressalta-se que, a proposta deste trabalho, se refere a construção de um biossensor miniaturizado e descartável.

#### 4.4.7 Estudo do efeito de memória do biossensor

É comum que no uso de biomoléculas para o desenvolvimento de dispositivos analíticos possam ocorrer efeito de memória na resposta de corrente. Para averiguar se este efeito poderia interferir no sinal obtido com o biossensor, o mesmo foi testado, sucessivamente, em duas concentrações de dopamina: uma maior e outra mais baixa. A intenção, foi verificar se após a medida na concentração maior, a corrente era reduzida quando se diminui a quantidade do analito. Foram realizadas quatro medidas em um amostra de tampão fosfato  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 7,4, fortificada com 100 e 250  $\mu\text{mol.L}^{-1}$  de dopamina. As medidas foram realizadas usando voltametria de pulso diferencial com amplitude de 25 mV e velocidade de varredura de  $80 \text{ mV s}^{-1}$ . A Figura 33 e a Tabela 9 apresentam as correntes elétricas obtidas.

**Figura 33** - Corrente elétrica obtida com o biossensor proposto em solução de dopamina 100 e 250  $\mu\text{mol.L}^{-1}$ , em tampão fosfato  $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ , pH 7,4. Amplitude de pulso de 25 mV e  $80 \text{ mV.s}^{-1}$  de velocidade de varredura.



Fonte: Própria.

**Tabela 9** – Correntes obtidas com o biossensor usando soluções com 100 e 250  $\mu\text{mol.L}^{-1}$  de dopamina em tampão fosfato 0,1 mol  $\text{L}^{-1}$ , pH 7,4.

Amostra	Corrente ( $\mu\text{A}$ )
100	21,295
250	29,135
100	22,073
250	30,176

Fonte: Própria.

Observando a Figura 33 e a Tabela 9, verifica-se que as correntes obtidas em concentração menor variaram em torno de 4% entre elas e, em maiores concentrações, a variação foi de 4% também. Dessa forma, verifica-se que a medida em maiores quantidades de dopamina não influencia o comportamento do biossensor. Em alguns casos, o analito oxidado pode permanecer incrustado na superfície do eletrodo, interferindo negativamente em seu desempenho. Esta característica não foi observada no biossensor proposto.

#### 4.4.8 Aplicação do biossensor em amostra de urina sintética

A fim de verificar se o biossensor apresentava exatidão em urina sintética, o mesmo foi aplicado em um amostra de urina sintética fortificada com 250  $\mu\text{mol.L}^{-1}$  de dopamina. Este estudo foi feito em triplicata. As medidas foram realizadas usando voltametria de pulso diferencial com amplitude de 25 mV e velocidade de varredura de 80  $\text{mV s}^{-1}$ . A Tabela 6 apresenta as correntes elétricas obtidas.

**Tabela 6** - Correntes obtidas com os biossensores construídos usando soluções com 250  $\mu\text{mol.L}^{-1}$  de dopamina em urina sintética.

Triplicata	Corrente ( $\mu\text{A}$ )
1	29,602
2	30,045
3	30,182
Média	29,943

Fonte: Própria.

O valor médio obtido de corrente foi 29,943  $\mu\text{A}$ . Este valor foi substituído na equação da reta da curva analítica, obtendo-se uma concentração de 259,43  $\mu\text{mol.L}^{-1}$  de dopamina. Usando a Equação 4, foi calculado erro relativo (%) obtendo-se um valor de aproximadamente 3,772 %, considerado excelente.

$$\% \text{Erro} = \frac{259,43 - 250}{250} \times 100 = 3,772\% \quad \text{Eq. 4}$$

Assim, pode-se verificar que o erro obtido foi considerado baixo, ou seja, as outras substâncias presentes na urina não interferem no sinal gerado pelo biossensor proposto. Este resultado é muito relevante, uma vez que a aplicação do dispositivo envolve amostra de urina, na qual a dopamina é excretada, conforme descrito anteriormente. Assim, o dispositivo se mostra promissor no propósito de determinar dopamina em amostra real, contribuindo para o diagnóstico da doença de Parkinson.

## 5 CONCLUSÃO

De acordo com os resultados obtidos, podemos concluir que o biossensor, construído a partir de nanoestrutura do tipo core-shell a base de ZnO@Au, como suporte para a imobilização da enzima tirosinase, apresentou características favoráveis em sua utilização para quantificação de dopamina.

O dispositivo apresentou respostas eficientes, com baixo limite de detecção de  $0,0855 \mu\text{mol L}^{-1}$ , apresentando uma região linear ampla entre 0,1 e  $500 \mu\text{mol.L}^{-1}$  podendo, neste intervalo, detectar níveis normais ou a falta de dopamina excretada, indicando a redução do desempenho do sistema dopaminérgico. Quando aplicado em amostras de urina sintética, apresentou baixo erro relativo (3,772%), indicando que as outras substâncias presentes não interferiram no sinal.

Foi apurado que o biossensor, apresentou um ótimo coeficiente de variação (1,05%), confirmando que o método usado em sua construção fornece dispositivos com respostas reprodutíveis. Embora tenha sido projetado para ser um biossensor descartável, apresentou certa estabilidade, podendo ser reutilizado por até cinco dias com variação de corrente em torno de 11%. Sua seletividade na presença de substâncias comumente encontradas em amostras fisiológicas, até mesmo o ácido ascórbico, que é um interferente na quantificação de dopamina em amostras de urina, apresentou uma alteração abaixo de 7%, um resultado extremamente relevante.

Verificou-se que o dispositivo não apresentou efeito de memória, não carregando sinais residuais de medidas consecutivas de concentrações diferentes do analito.

Sendo assim, os resultados obtidos indicam que o dispositivo miniaturizado proposto é promissor para monitoramento de dopamina em amostras reais, podendo contribuir com o acompanhamento de pacientes como no diagnóstico da doença. Ressalta-se que se trata de um biossensor de baixo custo quando comparado com as técnicas convencionais.

## REFERENCIAS

ABBASSI, M. H. *et al.* Dilemma in parkinson's treatment; levodopa monotherapy may be the best choice. **Journal of clinical neuroscience**, v. 79, p. 219-223, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jocn.2020.06.024>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.ez128.periodicos.capes.gov.br/science/article/pii/S0967586820313357>. Acesso em: 13 abr. 2021.

ABDELHALIM, M. A. K. *et al.* Physical Properties of Different Gold Nanoparticles: Ultraviolet-Visible and Fluorescence Measurements. **J Nanomed Nanotechol**, v.3, n.3, 2012. DOI:10.4172/2157-7439.1000133. Disponível em: [https://faculty.ksu.edu.sa/sites/default/files/j\\_of\\_nanomedicine\\_and\\_nanotechnology.pdf](https://faculty.ksu.edu.sa/sites/default/files/j_of_nanomedicine_and_nanotechnology.pdf). Acesso em: 17 mar. 2022.

ALHO, A. T. D. L. **Caracterização da substância negra humana durante o envelhecimento**. 2011. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, programa de Fisiopatologia Experimental, São Paulo, 2011. Disponível em: <https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/5/5160/tde01122011175727/publico/AnaTerezaDiLorenzoAlho.pdf>. Acesso em: 17 maio 2021.

ANDERSON, J.O.; THUNDIYIL, J. G.; STOLBACH, A. Clearing the air: A review of the effects of particulate matter air pollution on human health. **Journal of Medical Toxicology**, v. 8, p. 166-175, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1007/s13181-011-0203-1>. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s13181-011-0203-1>. Acesso em: 13 abr. 2021.

BARBANTI, S. H. *et al.* Degradação acelerada de suportes de PCL e PLGA em meio alcalino. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 16, n. 2, p. 141-148, 2006. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/po/a/bTymtTcrNxxgQTFqRVYSCKjk/?format=pdf&lang=pt>. Acesso em: 20 mar. 2022.

BHUSHAN, M. *et al.* Serrated hexagonal ZnO nanoparticles: Synthesis and its characterization. **Materialstoday: Proceedings**, v.48, part 3, p. 629-632, 2022. DOI: <https://doi-org.ez128.periodicos.capes.gov.br/10.1016/j.matpr.2021.05.686>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.ez128.periodicos.capes.gov.br/science/article/pii/S2214785321043133>. Acesso em: 17 mar. 2022.

CALDERON-GARCIDUENAS, L.; REYNOSO-ROBLES, R.; GONZALEZ-MACIEL, A. Combustion and friction-derived nanoparticles and industrial-sourced nanoparticles: The culprit of Alzheimer and Parkinson's diseases. **Environmental Research**, v.176, p. 1-19, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.envres.2019.108574>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0013935119303718?via%3Dhub>. Acesso em: 13 abr. 2021.

CANBAY, E.; AKYILMAZ, E. Design of a multiwalled carbon nanotube-Nafion-cysteamine modified tyrosinase biosensor and its adaptation of dopamine determination. **Analytical Biochemistry**, v. 444, p. 8-15, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ab.2013.09.019>. Disponível em: [https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0003269713004491?casa\\_token=8jejcNlbcYkAAAAA:lqXJKARCZs-T4a0\\_RU5uHSUt73scHSvBBFmYecTYGUJTM3HwJPHLk9eYMjtwb5sSaYdWALJmBM](https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0003269713004491?casa_token=8jejcNlbcYkAAAAA:lqXJKARCZs-T4a0_RU5uHSUt73scHSvBBFmYecTYGUJTM3HwJPHLk9eYMjtwb5sSaYdWALJmBM). Acesso em: 15 maio 2022.

CICG (Chromsystems Instruments & Chemicals GmbH). **Catecolaminas na urina (hplc)**. BioSys Rev, p.1-3, 2012. Disponível em: <http://www.biosys.com.br/wp-content/uploads/2015/10/Insert-6000-CATECOLAMINAS-URINA-Rev01-jul2012.pdf>. Acesso em: 20 maio. 2021.

COHRS, S. *et al.* Nocturnal urinary dopamine excretion is reduced in otherwise healthy subjects with periodic leg movements in sleep. **Neuroscience Letters**, v. 360, n. 3, p. 161-164, 2004. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2004.02.056>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304394004002605>. Acesso em: 13 abr. 2021.

COSTA, L. G. *et al.* Effects of air pollution on the nervous system and its possible role in neurodevelopmental and neurodegenerative disorders. **Pharmacology and Therapeutics**, p. 1-18, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2020.107523>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0163725820300516>. Acesso em: 13 abr. 2021.

DAPPER, S. N. *et al.* Poluição do ar como fator de risco para a saúde: uma revisão sistemática no estado de São Paulo. **Estud. av.[online]**, São Paulo, v. 30, n. 86, p. 83-97, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0103-40142016.00100006>. Disponível em: [https://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S010340142016000100083](https://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S010340142016000100083). Acesso em: 13 abr. 2021.

FRITZEN, M. B. **Imobilização de enzimas em materiais nanoestruturados: atividade, estabilidade e aplicação da peroxidase imobilizada em bicamadas lipídicas e nanopartículas poliméricas**. 2010. Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Físicas e Matemáticas, programa de Pós-Graduação em Química, Florianópolis, 2010. Disponível em: <https://repositorio.ufsc.br/xmlui/bitstream/handle/123456789/94205/283289.pdf?sequence=1&isAllowed=y>. Acesso em: 20 maio 2021.

FU, C. *et al.* Ultrasensitive sandwich-like electrochemical biosensor based on core-shell Pt@CeO<sub>2</sub> as signal tags and double molecular recognition for cerebral dopamine detection. **Talanta**, v. 223, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2020.121719>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0039914020310109>. Acesso em: 14 abr. 2021.

GALASKO, D. Lewy body disorders. **Neurologic Clinics**, v.35, n.2, p. 325-338, 2017. DOI: <https://doi-org.ez128.periodicos.capes.gov.br/10.1016/j.ncl.2017.01.004>. Disponível em:

<https://www.sciencedirect.ez128.periodicos.capes.gov.br/science/article/pii/S073386191730004X>. Acesso em: 14 abr. 2021.

GERBREDERS, V. *et al.* ZnO nanostructure-based electrochemical biosensor for Trichinella DNA detection. **Sensing and Bio-Sensing Research**, v. 23, p. 100276, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.sbsr.2019.100276>. Disponível em:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2214180419300224>. Acesso: 14 abr. 2021.

HAN, C.; LU, Y.; CHENG, H.; WANG, C. The impact of long-term exposure to ambiente air pollution and second-hand smoke on the onset of Parkinson disease: a review and meta-analysis. **Public Health**, v.179, p. 100-110, 2020. DOI:

<https://doi.org/10.1016/j.puhe.2019.09.020>. Disponível em:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0033350619303130>. Acesso em: 14 abr. 2021.

HAOMA, BY DNACLINIC. **CATECOLAMINAS URINÁRIAS**. 2019. Disponível em:

<https://dnaclinic.com.br/exames-laboratoriais/catecolaminas-urinarias-catec>. Acesso em: 20 maio 2021.

HASSAN, Q. *et al.* Electrochemical biosensors for the detection and study of  $\alpha$ -synuclein related to Parkinson's disease – A review. **Analytica Chimica Acta**, v.1089, p. 32-39,2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.aca.2019.09.013>. Disponível em:

<https://www.sciencedirect.ez128.periodicos.capes.gov.br/science/article/pii/S0003267019310700>. Acesso em: 14 abr. 2021.

HOEBEL, B. G.; AVENA, N. M.; RADA, P. Accumbens dopamine-acetylcholine balance in approach and avoidance. **Current Opinion in Neurobiology**, v.7, n.6, p. 617-627, 2007. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.coph.2007.10.014>. Disponível em:

<https://www.sciencedirect.ez128.periodicos.capes.gov.br/science/article/pii/S1471489207001968>. Acesso em: 14 abr. 20221.

HU, C. Y. *et al.* Association between ambient air pollution and Parkinson's disease: Systematic review and meta-analysis. **Environmental Research**, v.168, p.448-459, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.envres.2018.10.008>. Disponível em:

<https://www.sciencedirect.ez128.periodicos.capes.gov.br/science/article/pii/S0013935118305358>. Acesso em: 14 abr. 2021.

JÚNIOR, C. C. S. F. **Imobilização de lacase em nanopartículas de magnetite**.2014. Dissertação (Mestrado) - Universidade de Aveiro, Departamento de Química, Portugal, 2014. Disponível em:

<https://core.ac.uk/download/pdf/32244129.pdf>. Acesso em: 21 maio 2021.

LEE, H. *et al.* Long-term exposure to particulate air pollution and incidence of parkinson's disease: A Nationwide population-based cohort study in South Korea. **Environmental Research**, v. 212, part A, 2022. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.envres.2022.113165>. Disponível em:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0013935122004923?via%3Dihub>. Acesso em: 13 maio 2022.

LEE, P. *et al.* Traffic-related air pollution increased the risk of Parkinson's disease in Taiwan: A Nationwide study. **Environment International**, v.96, p. 75-81, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.envint.2016.08.017>. Disponível em:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0160412016303075?via%3Dihub>. Acesso em: 13 maio 2022.

LETE, C. *et al.* Use of sinusoidal voltages with fixed frequency in the preparation of tyrosinase based electrochemical biosensors for dopamine electroanalysis. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 240, p. 801-809, 2017. DOI:

<https://doi.org/10.1016/j.snb.2016.09.045>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.ez128.periodicos.capes.gov.br/science/article/pii/S0925400516314629>. Acesso em: 14 abr. 2021.

LIU, X. *et al.* Au nanoparticles attached Ag@C core-shell nanocomposites for highly selective electrochemical detection of dopamine. **Microchemical Journal**, v.146, p.509-516, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.microc.2019.01.023>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0026265X18311871>. Acesso em: 23 maio 2021.

MARC, D. T. *et al.* Neurotransmitters excreted in the urine as biomarkers of nervous system activity: Validity and clinical applicability. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, v. 35, n. 3, p. 635-644, 2011. DOI:

<https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2010.07.007>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.ez128.periodicos.capes.gov.br/science/article/pii/S0149763410001296#bib0660>. Acesso em: 13 abr. 2021.

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

<https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2018.11.021>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.ez128.periodicos.capes.gov.br/science/article/pii/S1053811918320925>. Acesso em: 14 abr. 2021.

MENDES, R. K. *et al.* Determination of chlorophenol in environmental samples using a voltammetric biosensor based on hybrid nanocomposite. **J. Braz. Chem. Soc.**, v.28, n. 7, p.1212-1219, 2017. DOI: <https://doi.org/10.21577/0103-5053.20160282>.

Disponível em: [https://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_abstract&pid=S0103-50532017000701212&lng=pt&nrm=iso](https://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S0103-50532017000701212&lng=pt&nrm=iso). Acesso em: 14 abr. 2021.

MOHTAR, L. G. *et al.* Amperometric biosensor based on laccase immobilized onto a nanostructured screen-printed electrode for determination of polyphenols in propolis. **Microchemical Journal** v. 144, p. 13-18, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.microc.2018.08.038>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.ez128.periodicos.capes.gov.br/science/article/pii/S0026265X18302650>. Acesso em: 14 abr. 2021.

NEJM, M. *et al.* Air pollution and sudden death risk in patients with Parkinson's disease: Assessing the evidence to date. **Public Health in Practice**, v. 1, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.puhip.2020.100008>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2666535220300070?via%3Dihub>. Acesso em: 13 maio 2022.

PÉREZ, J. G. *et al.* Childhood leukemia and residential proximity to industrial and urban sites. **Environmental Research**, v.140, p. 542-553, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.envres.2015.05.014>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.ez128.periodicos.capes.gov.br/science/article/pii/S0013935115001607>. Acesso em: 14 abr. 2021.

**PNGWING**. Disponível em: <https://www.pngwing.com/pt>. Acesso em: 13 maio 2022.

POEWE, W; MAHLKNECHT, P. Pharmacologic treatment of motor symptoms associated with Parkinson disease. **Neurologic Clinics**, v.38, n.2, p. 255-267, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ncl.2019.12.002>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.ez128.periodicos.capes.gov.br/science/article/pii/S0733861919301124>. Acesso em: 14 abr. 2021.

QIU, J.; PENG, H.; LIANG, R. Ferrocene-modified Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@SiO<sub>2</sub> magnetic nanoparticles as building blocks for construction of reagentless enzyme-based biosensors. **Electrochemistry Communications**, v. 9, n. 11, p. 2734-2738, 2007. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.elecom.2007.09.009>. Disponível em: [https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1388248107003724?casa\\_token=4AZe-geH5BwAAAAA:8jw8gtHEpT7PDEH6vn3BTDsFCcy1tiW5Z5AVXzDrORRECSzJC-DnYIYZT6-BRT9E8034ODLFLNI#!](https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1388248107003724?casa_token=4AZe-geH5BwAAAAA:8jw8gtHEpT7PDEH6vn3BTDsFCcy1tiW5Z5AVXzDrORRECSzJC-DnYIYZT6-BRT9E8034ODLFLNI#!). Acesso em: 13 maio 2022.

RAHMAN, S. Size and Concentration Analysis of Gold Nanoparticles With Ultraviolet-Visible Spectroscopy. **Undergraduate Journal of Mathematical Modeling: One + Two**, v. 7: n. 1, Article 2, 2016. DOI: <http://dx.doi.org/10.5038/2326-3652.7.1.4872>. Disponível em: <https://scholarcommons.usf.edu/ujmm/vol7/iss1/2>. Acesso em: 17 mar. 2022.

RIAHIFAR, V. *et al.* Design a high sensitive electrochemical sensor based on immobilized cysteine on Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@Au core-shell nanoparticles and reduced graphene oxide nanocomposite for nitrite monitoring. **Microchemical Journal**, v. 166, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.microc.2021.106217>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.ez128.periodicos.capes.gov.br/science/article/pii/S0026265X21003015>. Acesso em: 17 mar. 2022.

RIBEIRO, A. G. *et al.* Incidence and mortality for respiratory cancer and traffic-related air pollution in São Paulo, Brazil. **Environmental Research**, v.170, p.243-251, 2019. DOI: <https://doi-org.ez128.periodicos.capes.gov.br/10.1016/j.envres.2018.12.034>.

Disponível em:

<https://www.sciencedirect.ez128.periodicos.capes.gov.br/science/article/pii/S0013935118306637>. Acesso em: 14 abr. 2021.

ROYCHOUDHURY, A.; BASU, S.; JHA, S. K. Dopamine biosensor based on surface functionalized nanostructured nickel oxide platform. **Biosensors and Bioelectronics**, v.84. p. 72-81, 2016. DOI:

<https://doi.org/10.1016/j.bios.2015.11.061>. Disponível em:

<https://www.sciencedirect.ez128.periodicos.capes.gov.br/science/article/pii/S0956566315306102>. Acesso em: 14 abr. 2021.

SAJID, M; BAIG, N; ALHOOSHANI, K. Chemically modified electrodes for electrochemical detection of dopamine: Challenges and opportunities. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 118, p.368-385, 2019. DOI:

<https://doi.org/10.1016/j.trac.2019.05.042>. Disponível em:

<https://www.sciencedirect.ez128.periodicos.capes.gov.br/science/article/pii/S0165993619300913>. Acesso em: 14 abr. 2021.

SAVI, B. M. *et al.* Obtenção de nanopartículas de zno a partir de processamento sol-gel. In: 55º congresso brasileiro de cerâmica, 2011, Porto de Galinhas – PE. **Anais** [...]. Porto de Galinhas, p. 683-692, 2011. Disponível em:

[https://inis.iaea.org/collection/NCLCollectionStore/\\_Public/47/065/47065257.pdf](https://inis.iaea.org/collection/NCLCollectionStore/_Public/47/065/47065257.pdf).

Acesso em: 14 abr. 2021.

SANTOS, L. O. **Estudo comparativo entre as técnicas de voltametria em pulso diferencial, espectrofotometria no ultravioleta e visível e cromatografia líquida de alta eficiência como metodologias analíticas no doseamento da substância química paracetamol.**2003. Dissertação (mestrado) - Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro Janeiro, 2003. Disponível em:

<https://www.arca.fiocruz.br/bitstream/icict/8257/2/168.pdf>. Acesso em: 13 maio 2022.

SCHRAUFNAGEL, D. E. *et al.* Air Pollution and Noncommunicable Diseases: A Review by the Forum of International Respiratory Societies' Environmental Committee, Part 1: The Damaging Effects of Air Pollution. **CHEST**, v.155, n. 2, p. 409-416, 2019a. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.chest.2018.10.042>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.ez128.periodicos.capes.gov.br/science/article/pii/S0012369218327235>. Acesso em: 14 abr. 2021.

SCHRAUFNAGEL, D. E. *et al.* Air Pollution and Noncommunicable Diseases: A Review by the Forum of International Respiratory Societies' Environmental Committee, Part 2: Air Pollution and Organ Systems. **CHEST**, v.155, n. 2, p. 417-426, 2019b. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.chest.2018.10.041>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.ez128.periodicos.capes.gov.br/science/article/pii/S0012369218327223>. Acesso em: 14 abr. 2021.

SECCHI, S. G. **Modelagem, análise e otimização de biossensores eletroquímicos baseados em enzimas**. 2017. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, programa de pós graduação em Engenharia Química do instituto Alberto Luiz Coimbra, Rio de Janeiro, 2017. Disponível em: <http://portal.peq.coppe.ufrj.br/index.php/producaoacademica/dissertacoes-de-mestrado/2017/470--47/file>. Acesso em: 14 abr. 2021.

SHETTI, N. P. *et al.* ZnO- based nanostructures electrodes for electrochemical sensors and biosensors in biomedical applications. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 141, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bios.2019.111417>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0956566319304968>. Acesso em: 14 de setembro de 2021.

SIGNORI, C. C.; FATIBELLO-FILHO, O. Biossensor amperométrico para a determinação de fenóis usando extrato bruto de inhame (*Alocasia macrorrhiza*). **Química Nova**, v.17, p.38-42, 1994. Disponível em: [http://quimicanova.s bq.org.br/detalhe\\_artigo.asp?id=5471](http://quimicanova.s bq.org.br/detalhe_artigo.asp?id=5471). Acesso em: 13 maio 2022.

SILVA, J. C. **Desenvolvimento de biossensor para monitoramento do tratamento de doença intensificada pela poluição de áreas urbanas**. 2021. Dissertação (mestrado) - Pontifícia Universidade Católica de Campinas, Centro de Ciências Exatas, Ambientais e de Tecnologias, programa de Pós-graduação em Sistemas de Infraestrutura Urbana, Campinas, 2021. Disponível em: <http://tede.bibliotecadigital.puccampinas.edu.br:8080/jspui/bitstream/tede/1520/2/Jocimara%20Camargo%20da%20Silva.pdf>. Acesso em: 13 maio 2022.

SILVA, L. P.; LOURENCAO, B. C.; FATIBELLO-FILHO, O. Determinação voltamétrica simultânea de besilato de anlodipino e hidrocortizida em amostras de urina sintética utilizando um eletrodo de diamante dopado com boro. **Química Nova**, v. 38, n. 6, p.801-806, 2015. DOI: <http://dx.doi.org/10.5935/0100-4042.20150077>. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/qn/a/WmLPScZmGph94thy3J6fLPB/?lang=pt>. Acesso em: 13 maio 2022.

SILVA, P., M., S. **Caracterização do padrão de glicosilação do antígeno prostático humano (psa) em soro humano pela lectina cramoll 1,4 utilizando um biossensor eletroquímico baseado em nanotubo de carbono**. Dissertação (Mestrado) - Universidade federal de pernambuco centro de ciências biológicas programa de pós-graduação em bioquímica e fisiologia, Recife, 2015. Disponível em: <https://repositorio.ufpe.br/bitstream/123456789/16260/1/Priscila.pdf>. Acesso em: 20 maio de 2021.

SILVA, R. A. *et al.* Metodologia para detecção eletroquímica qualitativa de compostos orgânicos em interfaces petróleo/água. **Quím. Nova**, v. 42, n. 1, p. 95-98, 2019. DOI: <https://doi.org/10.21577/0100-4042.20170298>. Disponível em: [https://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0100-40422019000100095](https://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422019000100095). Acesso em: 14 abr. 2021.

SILVA, T. R. **Desenvolvimento de eletrodos nanoestruturados para a determinação de dopamina e levodopa em fármacos**. 2018. Tese (Doutorado) – Universidade federal de Santa Catarina, centro de ciências físicas e matemáticas, programa de pós-graduação em química, Florianópolis, 2018. Disponível em: <https://repositorio.ufsc.br/handle/123456789/191521>. Acesso em: 14 abr. 2021.

SOUZA, C. F. M. *et al.* A Doença de Parkinson e o Processo de Envelhecimento Motor: Uma Revisão de Literatura. **Neurociencias**, Mossoró, v. 19, n. 4, p.718-723, 2011. Disponível em: <http://revistaneurociencias.com.br/edicoes/2011/RN1904/revisao%2019%2004/570%20revisao.pdf>. Acesso em: 20 maio 2021.

SRIVASTAVA, V.; GUSAIN, D.; SHARMA, Y. C. Synthesis, characterization and application of zinc oxide nanoparticles (n-ZnO). **Ceramics International**, v.39, n.8, p. 9803-9808, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2013.04.110>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.ez128.periodicos.capes.gov.br/science/article/pii/S0272884213005646>. Acesso em: 14 abr. 2021.

TAN, X. *et al.* Amperometric hydrogen peroxide biosensor based on immobilization of hemoglobina on a glassy carbono electrode modified with Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/chitosan core-shell microspheres. **Sensors**, v. 9, n. 8, p. 6185-6199, 2009. DOI: <https://doi.org/10.3390/s90806185>. Disponível em: <https://www.mdpi.com/14248220/9/8/6185/htm>. Acesso em: 13 maio 2022.

THAMILSELVAN, A. *et al.* Improved electrocatalytic activity of Au@Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> magnetic nanoparticles for sensitive dopamine detection. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 180, p. 1-8, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2019.04.034>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0927776519302577>. Acesso em: 14 maio 2022.

THATAI, S. *et al.* Nanoparticles and core-shell nanocomposite based new generation water remediation materials and analytical techniques: A review. **Microchemical Journal**, v. 116, p.62-76, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.microc.2014.04.001>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0026265X14000502>. Acesso em: 14 abr. 2021.

VILLELA, B. **Artigo: Em 2030, mais de 600 mil brasileiros poderão sofrer do Mal de Parkinson. Pró-saúde, associação beneficente de assistência social e hospitalar**. 2019. Disponível em: <https://www.prosaude.org.br/noticias/em-2030-mais-de-600-mil-brasileiros-poderao-sofrer-do-mal-de-parkinson/>. Acesso em: 31 mar. 2020.

WARDAK, C.; PACZOSA-BATOR, B; MALINOWSKI, S. Application of cold plasma corona discharge in preparation of laccase-based biosensors for dopamine determination. **Materials Science and Engineering C**, v. 116, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.msec.2020.111199>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.ez128.periodicos.capes.gov.br/science/article/pii/S0928493120307475>. Acesso em: 14 abr. 2021.

WEI, H. Impacts of China's national vehicle fuel standards and subway development on air pollution. **Journal of Cleaner Production**, v.241, p. 1-10, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2019.118399>. Disponível em: <https://www-sciencedirect.ez128.periodicos.capes.gov.br/science/article/pii/S095965261933269X>. Acesso em: 14 abr. 2021.

XIANG, S. *et al.* Facile Synthesis of ZnO-Au Nanopetals and Their Application for Biomolecule Determinations. **Chem. Res. Chin. Univ.** v. 35, p. 924-928, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1007/s40242-019-9063-z>. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s40242-019-9063-z#citeas>. Acesso em: 14 abr. 2021.

XUE, C. Amperometric detection of dopamine in human serum by electrochemical sensor based on gold nanoparticles doped molecularly imprinted polymers. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 49, p. 199-203, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bios.2013.04.022>. Disponível em: [https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0956566313002881?casa\\_token=qmBVYBrVNkAAAAA:vXLpJnXGWiBr0IoNxbzjarThaJTKJ6GvnLY4mg0BrBLelHBy92i4hCWCaF9fkJrxdlUckdP0jJg](https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0956566313002881?casa_token=qmBVYBrVNkAAAAA:vXLpJnXGWiBr0IoNxbzjarThaJTKJ6GvnLY4mg0BrBLelHBy92i4hCWCaF9fkJrxdlUckdP0jJg). Acesso em: 14 abr. 2022.

YANG, J. *et al.* Air pollution dispersal in high density urban areas: Research on the triadic relation of wind, air pollution, and urban form. **Sustainable Cities and Society**, v. 54, p.1-12, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.scs.2019.101941>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.ez128.periodicos.capes.gov.br/science/article/pii/S2210670719322474>. Acesso em: 14 abr. 2021.

YANG, L. *et al.* Simultaneous electrochemical determination of dopamine and ascorbic acid using AuNPs@polyaniline core-shell nanocomposites modified electrode. **Talanta**, v.89, p.136-141, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2011.12.002>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0039914011010642>. Acesso em: 23 maio 2021.

YU, D. *et al.* A novel electrochemical sensor for determination of dopamine based on AuNPs@SiO<sub>2</sub> core-shell imprinted composite. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 38, n. 1, p. 270-277, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bios.2012.05.045>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0956566312003582>. Acesso em: 23 maio 2021.

YUE, H. Y. *et al.* Highly sensitive and selective dopamine biosensor using Au nanoparticles ZnO nanocone arrays/graphene foam electrode. **Materials Science & Engineering C**, v.108, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.msec.2019.110490>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0928493119300700>. Acesso em: 14 abr. 2021.