

DETERMINAÇÃO ELETROQUÍMICA DE DOPAMINA USANDO BIOCSENSOR DE PASTA DE CARBONO MODIFICADA COM NANOTUBOS DE TITANATO E PEROXIDASE DE MAXIXE

Daniel Ananias Reis de Campos, UFRRJ – darc.darc91@gmail.com

Dra. Inês Rosane Welter Zwirtes de Oliveira, UFRRJ - inesrz1@yahoo.com.br

Dra. Rosane Nora Castro, UFRRJ - nora@ufrj.br

Dr. João Victor Nicolini, UFRRJ - jvnicolini@gmail.com

RESUMO

A peroxidase é uma das enzimas mais empregadas em pesquisas de biossensores amperométricos. Por isso é cada vez mais importante avançar no conhecimento das aplicações dessa enzima e em fontes alternativas à peroxidase comercial de *Amoracia rusticana*. Neste trabalho, o objetivo foi determinar dopamina em produto farmacêutico com um biossensor de pasta de carbono modificada com peroxidase de extrato de maxixe (*Cucumis anguria*) e nanotubos de titanato (NTT). A imobilização da peroxidase empregou a técnica de ligação covalente entre a enzima e os NTT funcionalizados com APTMS e glutaraldeído. Em varreduras sucessivas, foi necessário a aplicação de um potencial de -0,30 V por 5 s pela técnica de voltametria linear antes de cada varredura de VOQ para promover a dessorção do analito da superfície do biossensor. A curva de calibração obtida foi de 4,98 a 65,4 $\mu\text{mol L}^{-1}$ ($\Delta I = 1,05 \times [\text{DOP}] - 2,30$; $r = 0,9975$), com LD de 2,46 $\mu\text{mol L}^{-1}$. Com [DOP] em $\mu\text{mol L}^{-1}$ e ΔI em μA . Para a determinação de dopamina em ampolas comerciais (5,00 mg mL⁻¹), o intervalo de confiança foi de 5,04 ± 0,06 mg mL⁻¹ (ER = +1,2%) empregando o biossensor de NTT. A repetitividade (n = 10) foi ótima, com um erro relativo (ER) de 1,0%. A reprodutibilidade apresentada foi aceitável, com um ER de 9,0% (n = 3). Em relação a estabilidade a longo prazo, houve uma perda no sinal de cerca de 10% após 15 dias e 17%, após 30 dias.

Palavras-chave: Biossensor; dopamina; maxixe; nanotubos de titanato.

INTRODUÇÃO

A dopamina (3,4-diidroxifeniletilamina) é uma molécula que desempenha funções importantes nos processos fisiológicos e bioquímicos humanos. (LIU e LIU *et al.*, 2021; KONG *et al.*, 2018; DECARLI *et al.*, 2021) Como neurotransmissor, atua no sistema nervoso central e periférico e está envolvido no aprendizado, movimento, memória, entre outros. (SUHITO *et al.*, 2019) Ambas as concentrações, altas e baixas, estão associadas a doenças como hipertensão, insuficiência cardíaca, doença de Parkinson, esquizofrenia, doença de Alzheimer e depressão. (LIU e LIU *et al.*, 2021; KONG *et al.*, 2018, DECARLI *et al.*, 2022, RAOOF *et al.*, 2011)

Vários métodos analíticos foram relatados para a determinação de dopamina, como cromatografia líquida-espectrometria de massa em tandem, cromatografia líquida de alta eficiência, quimiluminescência, espectrofotometria, sensores colorimétricos e técnicas

eletroanalíticas. (DECARLI *et al.*, 2022; SUHITO *et al.*, 2019) Técnicas eletroquímicas foram desenvolvidas para fornecer um método fácil e rápido para analisar reações redox de algumas moléculas e surgiram como fortes candidatos para o reconhecimento de várias moléculas de neurotransmissores, incluindo a dopamina. A medição rápida e em tempo real da dopamina é crítica para o diagnóstico precoce de alguns distúrbios neurológicos relacionados à dopamina e ganhou atenção crescente nos últimos anos. (SUHITO *et al.*, 2019, KONG *et al.*, 2018)

Neste trabalho, um biossensor de pasta de carbono modificada por peroxidase de maxixe imobilizada em nanotubos de titanato foi fabricado para determinação voltamétrica de dopamina. A técnica eletroquímica foi a voltametria de onda quadrada.

METODOLOGIA

Os extrato vegetal foi preparado misturando em um liquidificador 100 mL de solução-tampão 0,100 M pH 7,00 a 4 °C com 25 g de maxixe picado. O homogenato foi filtrado com quatro camadas de gaze de algodão. O extrato filtrado foi colocado em um tubo falcon de 50 mL e centrifugado em uma centrífuga refrigerada a 4 °C por 10 minutos a 4620 g.

Para a determinação da atividade enzimática, foi feita uma análise espectrofotométrica da formação de tetraguaiacol (FRITZEN-GARCIA *et al.*, 2013; RIBEIRO *et al.*, 2013; OLIVEIRA *et al.*, 2012; OLIVEIRA, 2007).

Os NTT foram funcionalizados com (3-aminopropil)trimetoxisilano (APTMS) e glutaraldeído para melhor imobilização da enzima, por ligação covalente, conforme realizado por Nicolini *et al.* (2016).

O extrato enzimático foi adicionado sobre os NTT, que foram acondicionados em um dessecador por 48 h. O volume de extrato variou de acordo com a atividade enzimática do extrato empregado (que foi medida antes da imobilização). A concentração de enzima imobilizada foi de 35,0 U mg⁻¹ de NTT. (FRITZEN-GARCIA, 2009; OLIVEIRA *et al.*, 2012; OLIVEIRA E VIEIRA, 2006)

Os biossensores foram obtidos na composição 75/15/10% (m/m) de pó de grafite, NTT contendo peroxidase e óleo mineral, respectivamente. Os NTTs com peroxidase imobilizada foram homogeneizados com grafite em pó em um cadinho de porcelana e pistilo por 20 minutos. Após esse tempo, foi adicionado o óleo mineral à mistura, que foi homogeneizada novamente por 20 minutos. Ao final, a pasta de carbono era guardada na geladeira. Essa pasta de carbono foi colocada em um eletrodo comercial, de politetrafluoretileno (Teflon[®]), próprio para pasta de carbono com 3 mm de diâmetro interno. Foram empregadas 25,0 mg de pasta de carbono modificada com enzima e NTT.

RESULTADOS E DISCUSSÕES

Imobilização da Peroxidase

Os NTT foram funcionalizados em 2 etapas. A primeira, com APTMS, insere grupos –NH₂ na superfície dos NTT. A segunda, com glutaraldeído, acopla o grupo –CHO, que reage com os grupos –NH₂ da peroxidase, criando uma ligação covalente entre a enzima e os nanotubos. A Figura 1 apresenta os FTIR dos NTT em todas as etapas da funcionalização. Os resultados da FTIR para os NTT foram correspondentes com os dados presentes na literatura e comprovam o resultado positivo da funcionalização e da imobilização enzimática da peroxidase nos NTT. (NICOLINI *et al.*, 2014)

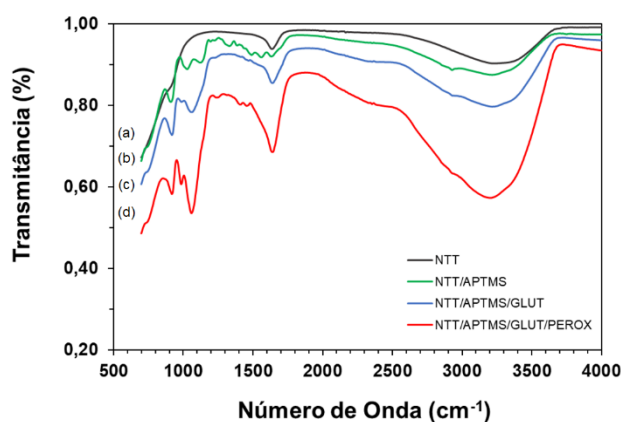


Figura 1. FTIR dos NTT: (a) sem funcionalização, (b) funcionalizados com APTMS, (c) funcionalizados com APTMS e glutaraldeído e (d) funcionalizados com APTMS e glutaraldeído com peroxidase de maxixe immobilizada.

O espectro dos NTT originais mostra uma grande banda entre 3000 e 3500 cm^{-1} devido à presença de grupos -OH na superfície dos nanotubos e em 1630 cm^{-1} devido à deformação angular de moléculas de água. A primeira etapa da funcionalização, com APTM, acrescenta os grupos Si-O-Ti, Si-O-Si e Si-OH à superfície dos NTT, em 1030, 1120 e 907 cm^{-1} , respectivamente, além de diversos picos entre 1200 e 1600 cm^{-1} . Após a etapa com o glutaraldeído, esses picos menores desaparecem, porém há o incremento em 1640 cm^{-1} , atribuídos aos grupos -CONH-, 1060 cm^{-1} (álcool primário) e entre 3000 e 3500 cm^{-1} . Com a imobilização enzimática, a absorvância nesses últimos valores aumenta significativamente. (NICOLINI *et al.*, 2014)

Ambas as etapas de funcionalização adicionam carga positiva ao nanocomposto, com o valor do potencial zeta se alterando de -20,0 para 7,0 mV após a 1ª etapa e, finalmente, para +6,9 mV ao final da funcionalização. Após a imobilização da peroxidase, esse valor aumenta mais um pouco, para +7,3 mV. Então, é possível concluir que esta enzima possui carga positiva no pH da imobilização (pH 7,0).

Repetitividade, reprodutibilidade e estabilidade

Para o teste de repetitividade, foram realizadas 10 varreduras de VOQ com o mesmo biossensor em uma solução de dopamina $1,00 \times 10^{-4}$ e peróxido de hidrogênio $2,00 \times 10^{-3}$ em tampão pH 7,0. O biossensor apresentou um ótimo resultado (Desvio Padrão Relativo de 1,0%), provavelmente devido à imobilização por ligação covalente da enzima com os NTT.

Para o teste de reprodutibilidade, foram empregados 3 biossensores e realizadas 10 varreduras de VOQ com cada um deles em uma solução de dopamina $1,00 \times 10^{-4}$ e peróxido de hidrogênio $2,00 \times 10^{-3}$ em tampão pH 7,0. O biossensor apresentou um resultado aceitável, com DPR = 9,0%.

Para o teste de estabilidade, foram realizadas varreduras de voltametria cíclica nos dias 1º, 15º e 30º do biossensor ser construído, empregando-o em uma solução de dopamina $1,00 \times 10^{-4}$ mol L^{-1} e peróxido de hidrogênio $2,00 \times 10^{-3}$ mol L^{-1} em tampão pH 7,0, que era preparada no dia do experimento. Houve uma perda no sinal de corrente de pico na medição do 15º dia de cerca de 10%. No 30º dia, o sinal cai para apenas 83% do sinal original. No trabalho de Nicolini *et al.* (2016), onde peroxidase comercial foi imobilizada em NTT para detecção de

H₂O₂, o biossensor manteve 91% do sinal em 30 dias. Sović *et al.* (2011) realizaram um trabalho semelhante ao de Nicolini *et al.* (2016), em seu trabalho, o biossensor apresentava menos de 65% de sinal ao final de 30 dias de preparo para aqueles biossensores que estavam sendo utilizados durante esse período e 10% para biossensores que foram usados pela primeira vez no 30º dia.

Não há artigos na literatura sobre biossensores de NTT para detecção de dopamina, mas existem trabalhos para detecção de peróxido de hidrogênio por imobilização de peroxidase comercial. No trabalho de Nicolini *et al.* (2016), o biossensor manteve 91% do sinal em 30 dias. Sović *et al.* (2011) realizaram um estudo semelhante ao de Nicolini *et al.* (2016), o biossensor apresentou menos de 65% de sinal ao final de 30 dias de preparo para os biossensores que estavam sendo utilizados nesse período e 10% para os biossensores que foram utilizados pela primeira vez no 30º dia.

Curva de calibração

A Figura 2 apresenta a curva de calibração para a dopamina. A faixa linear da curva de calibração foi de $5,00 \times 10^{-6}$ a $6,54 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ e a equação da reta ajustada é $I = 1,05 \times [\text{DOP}] - 2,30$ ($r = 0,9975$), com [DOP] em $\mu\text{mol L}^{-1}$ e I em μA . Cada ponto da reta corresponde à média de três medidas. O limite de detecção (LD) calculado é a igual a $2,46 \mu\text{mol L}^{-1}$.

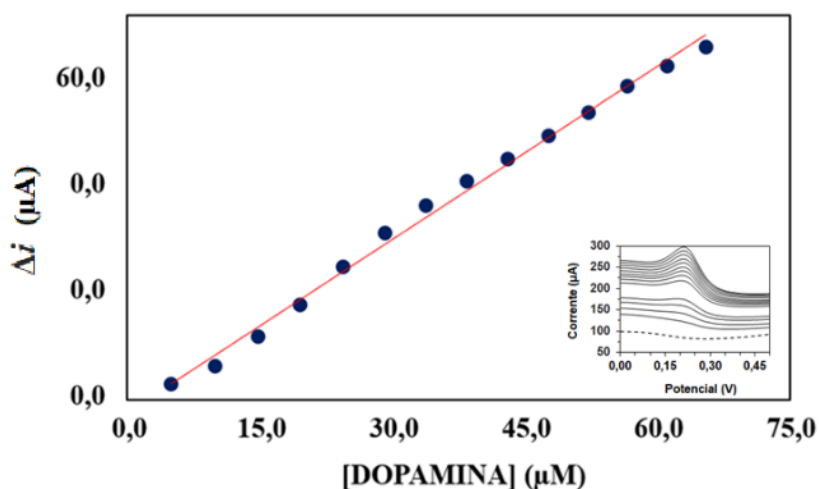


Figura 21. Curva de calibração da dopamina empregando o biossensor de NTT construído, em solução de peróxido de hidrogênio com concentração de $2,00 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹ em tampão pH 7,0. Parâmetros da VOQ: frequência de 100 Hz, amplitude de 100 mV, incremento de 3 mV. Inserção: voltamogramas de cada ponto da curva analítica; linha tracejada = solução tampão.

Apesar de não apresentar a melhor faixa linear e valores de LD, o biossensor deste trabalho apresentou resultados aceitáveis para estes valores, sendo melhor que alguns trabalhos da literatura e foi capaz de determinar a concentração de dopamina na amostra comercial.

Adição de padrão

A Figura 3 apresenta os gráficos da adição de padrão de dopamina realizada.

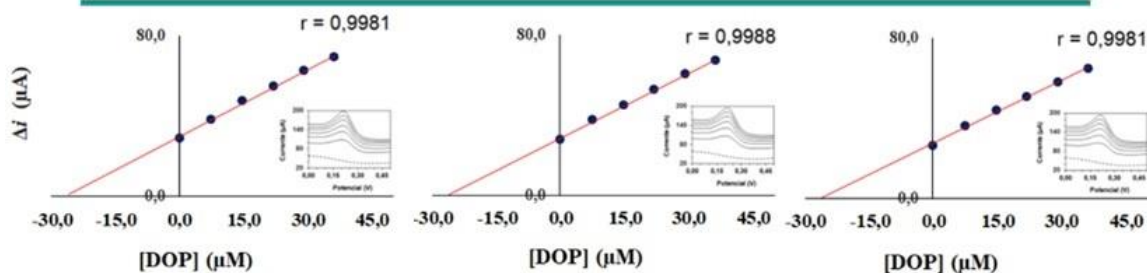


Figura 32. Gráficos da adição de padrão em amostra comercial empregando o biossensor de NTT construído, em solução de peróxido de hidrogênio ($2,00 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) em tampão pH 7,0. Parâmetros da VOQ: frequência de 100 Hz, amplitude de 100 mV e incremento de 3 mV. Inserção: voltamogramas de cada ponto da adição de padrão; linha tracejada = solução tampão.

A Tabela 1 apresenta os valores encontrados para a determinação de dopamina na ampola comercial empregando os dois métodos: biossensor construído e espectrofotométrico.

Tabela 1. Determinação de dopamina em amostra comercial empregando o biossensor construído e o método comparativo

DOPAMINA (mg mL^{-1})			ERRO RELATIVO (%)	
Valor Rotulado	Método Comparativo	Biossensor de NTT	ER ₁	ER ₂
5,00	$4,97 \pm 0,06$	$5,04 \pm 0,11$	+1,2	+1,8

$n = 3$; nível de confiança de 95%; ER₁ = biossensor *versus* valor rotulado; ER₂ = biossensor *versus* método comparativo.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A imobilização da peroxidase de maxixe pela técnica de ligação covalente entre a enzima e o NTT funcionalizado é bastante eficaz.

Um potencial de -0,30 V precisa ser aplicado por 5s antes de cada varredura de voltametria de onda quadrada para dessorver o analito da superfície do biossensor.

O biossensor construído apresenta características favoráveis para determinação de dopamina, com reprodutibilidade aceitável (RSD = 9,0%) e boa repetibilidade (RSD = 1,0%).

A curva analítica construída apresenta boa faixa linear e limite de detecção.

Os resultados obtidos neste trabalho com o biossensor possibilitam a utilização da peroxidase do extrato de maxixe na construção de biossensores de pasta de carbono para determinação de dopamina em amostras farmacêuticas.

REFERÊNCIAS

- DECARLI, N. O.; ZAPP, E.; SOUZA, B. S.; SANTANA, E. R.; WINIARSKI, J. P.; VIEIRA, I. C. Biosensor based on laccase-halloysite nanotube and imidazolium zwitterionic surfactant for dopamine determination. *Biochemical Engineering Journal*, v. 186, n. 108565, p. 1-9, 2022.
- FRITZEN-GARCIA, M. B.; OLIVEIRA, I. R. W. Z.; SOLDI, V.; PASA, A. A.; FATIBELLO-FILHO, O.; CRECZYNSKI-PASA, T. B.; ZANETTI-RAMOS, B. G. Carbon paste electrode modified with pine kernel peroxidase immobilized on pegylated polyurethane nanoparticles. *Sensors and Actuators B*, v. 139, p. 570-575, 2009.
- FRITZEN-GARCIA, M. B.; MONTEIRO, F. F.; CRISTOFOLINI, T.; ACUÑA, J. J. S.; ZANETTI-RAMOS, B. G.; OLIVEIRA, I. R. W. Z.; SOLDI, V.; PASA, A. A.; CRECZYNSKI-PASA, T. B. Characterization of horseradish peroxidase immobilized on PEGylated polyurethane nanoparticles and its application for dopamine detection. *Sensors and Actuators, B: Chemical*, v. 182, p. 264-272, 2013.
- KONG, D.; ZHUANG, Q.; HAN, Y.; XU, L.; WANG, Z.; JIANG, L.; SU, J.; LU, C.; CHI, Y.; Simultaneous voltammetry detection of dopamine and uric acid in human serum and urine with a poly(procaterol hydrochloride) modified glassy carbon electrode. *Talanta*, v. 185, p. 203-212, 2018.
- LIU, X.; LIU, J. Biosensors and sensors for dopamine detection. *View*, v. 2, n. 20200102. p. 1-16, 2021.
- NICOLINI, J. V.; RESENDE, N. S.; FERRAZ, H. C. Adsorption of horseradish peroxidase onto titanate nanowires. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, v. 90, p. 739–746, 2014.
- NICOLINI, J. V.; FERRAZ, H. C.; RESENDE, N. S. Immobilization of horseradish peroxidase on titanate nanowires for biosensing application. *Journal of Applied Electrochemistry*, v. 46, p. 17–25, 2016.
- OLIVEIRA, I. R. W. Z.; VIEIRA, I. C. Construção e aplicação de biossensores usando diferentes procedimentos de imobilização da peroxidase de vegetal em matriz de quitosana. *Química Nova*, v. 29, No. 5, p. 932-939, 2006.
- OLIVEIRA, Inês Rosane Welter Zwirter de. **Desenvolvimento de biossensores e sensores biomiméticos para determinação de compostos fenólicos**. 174f. 2007. Tese (Doutorado), Universidade Federal de Santa Catarina - UFSC, Florianópolis. 2007.
- OLIVEIRA, G.C.; MOCCELINI, S.K.; M. CASTILHO; TEREZO, A.J.; POSSAVATZ, J.; MAGALHÃES, M.R.L.; DORES, E.F.G.C. Biosensor based on atemoia peroxidase immobilized on modified nanoclay for glyphosate biomonitoring. *Talanta*, v. 98, p. 130-136, 2012.

RAOOF, J. B.; KIANI, A.; OJANI, R.; VALIOLLAHI, R. Electrochemical Determination of Dopamine Using Banana-MWCNTs Modified Carbon Paste Electrode. **Analytical and Bioanalytical Electrochemistry**, v. 3, n. 1, p. 59-66, 2011.

RIBEIRO, F. A. S.; TARLEY, C. R. T.; BORGES, K. B.; PEREIRA, A. R. Development of a square wave voltammetric method for dopamine determination using a biosensor based on multiwall carbon nanotubes paste and crude extract of *Cucurbita pepo L.* **Sensors and Actuators B**, v. 185, p. 743-754, 2013.

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.

SOVIĆ, D.; GAJOVIĆ, A.; IVEKOVIĆ, D. Bioelectrocatalytic and biosensing properties of horseradish peroxidase covalently immobilized on (3-aminopropyl)trimethoxysilane-modified titanate nanotubes. **Electrochimica Acta**, v. 56, p. 9953–9960, 2011.

SUHITO, I. R.; ANGELINE, N.; KIM, T. Nanomaterial-modified Hybrid Platforms for Precise Electrochemical Detection of Dopamine. *Biochip Journal*, v. 13, n. 1, p. 20-29, 2019.