Revista Virtual de Química

Review

http://dx.doi.org/10.21577/1984-6835.20220127

Biossensores Eletroquímicos Baseados em Peroxidase: Revisão

Electrochemical Biosensors Based on Peroxidase: A Review

Daniel Ananias R. de Campos,[a] *José G. Rocha Jr.,*[b,*] *Rosane N. Castro,*[c] *Inês R. W. Z. de Oliveira*[b]

[a]Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Instituto de Química, Programa de Pós-Graduação em Química, CEP 23890-000, Seropédica–RJ, Brasil
[b]Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Instituto de Química, Departamento de Química Analítica, CEP 23890-000, Seropédica–RJ, Brasil
[c]Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Instituto de Química, Departamento de Química Orgânica, CEP 23890-000, Seropédica–RJ, Brasil

***E-mail:** geraldorocha@ufrrj.br

Recebido em: 5 de Julho de 2022

Aceito em: 10 de Outubro de 2022

Publicado online: 23 de Novembro de 2022

Biosensors are devices that use biological components as recognition elements. Most of the biosensors available on the market are electrochemical because they are small and simple to operate. Currently, peroxidase is one of the main enzymes used in studies of biosensors. It catalyzes chemical reactions of several phenolic compounds. There is a great expectation for the creation of biosensors using peroxidase enzyme because of the importance of electrochemical biosensors and the good characteristics of this enzyme, which increases the number of scientific articles published on electrochemical peroxidase biosensors. This review describes the characteristics of electrochemical biosensors, adding new technologies that have emerged in recent years and that promise to revolutionize the biorecognition.

Keywords: Electrochemical biosensors; peroxidase; enzyme; nanomaterials.

1. Introdução

A IUPAC define formalmente um sensor químico como sendo "um dispositivo que transforma informações químicas, variando da concentração de um componente específico da amostra até a análise da composição total, em um sinal analiticamente útil" e biossensores como "sensores químicos em que o sistema de reconhecimento utiliza um mecanismo bioquímico".[1,2]

Os biossensores são dispositivos que podem ser desenvolvidos para monitorar a concentração de analitos em amostras de fluídos biológicos e fornecer uma resposta com rapidez e alta sensibilidade. Os resultados podem ser facilmente analisados pelo usuário,[3] como nos testes de gravidez, que é uma das aplicações mais difundidas de biossensores portáteis.[4] Outro exemplo de sucesso no mercado são os glicosímetros,[5] que são dispositivos eletroquímicos que dominam o mercado de biossensores.[6,7]

Os biossensores apresentam três principais vantagens em relação a outras técnicas: são extremamente simples, rápidos e portáteis.[8] Essas vantagens somadas a outras, como a alta especificidade e baixos limites de detecção, fazem com que esse tipo de sensor represente uma das mais proeminentes tecnologias para inúmeras análises,[6,9] tais como a de vírus,[10,11] análise forense,[12] monitoramento ambiental,[8,13,14] detecção de contaminantes em alimentos,[4,15] de alergênicos em alimentos,[16] de armas biológicas,[17] de explosivos,[18] de marcadores de câncer,[1] entre outras.

Atualmente, os biossensores são majoritariamente empregados na área da saúde para diagnosticar, tratar e monitorar doenças[19] usando amostras de sangue, urina e saliva. Além disso, são vastamente aplicados em testes de gravidez e fertilidade,[20,21] detecção de microrganismos causadores de doenças (vírus,[10] bactérias[22] e fungos[23]) e biomarcadores (Troponina I,[24] homocisteína,[25] glypican-1[26]).

Os biossensores comerciais se baseiam basicamente em testes qualitativos e quantitativos. Os testes imunocromatográficos de fluxo lateral são usados para detectar a presença do analito de interesse em uma amostra, como exemplo, o teste de gravidez. Os testes quantitativos, como os glicosímetros, chamados *Point of Care,* podem ser utilizados por pacientes em suas residências sem a necessidade de treinamentos complexos ou no próprio local de atendimento ao paciente, uma vez que geram sinais em poucos segundos ou minutos.[5,21] Esses dispositivos geralmente funcionam com uma tira (*test strip*) onde é aplicada a amostra a ser analisada. Essas tiras representam 35% do mercado de biossensores e foi previsto que poderá atingir US$ 33 bilhões até o ano de 2027.[5]

Esse tipo de biossensor geralmente emprega uma enzima como biorreceptor, baseando-se na detecção de um sinal eletroquímico produzido por uma espécie química produzida ou consumida na reação enzimática.[27] Os biossensores eletroquímicos amperométricos descritos

©2023 Sociedade Brasileira de Química

This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License.

na literatura, na maioria dos casos empregam enzimas da classe das oxirredutases.[28] Peroxidase, lacase, tirosinase, glicose oxidase e galactose oxidase são alguns dos principais exemplos das subclasses de enzimas oxirredutoras, sendo as peroxidases as mais empregadas no desenvolvimento de biossensores. [29-32]

Amplamente empregadas em pesquisas científicas de vários ramos,[32,33] as peroxidases apresentam bons resultados na modificação da superfície de eletrodos comerciais.[34] Considerada uma das principais enzimas empregadas para esta finalidade, devido ao grande número de substâncias que podem ser oxidadas pela catálise promovida pela peroxidase e ao maior sinal gerado comparado a outras enzimas oxirredutoras.[34,35]

Como mencionado anteriormente, os biossensores desempenham um papel muito importante na vida moderna e os números mostram que eles ficarão ainda mais presentes no cotidiano das pessoas, aumentando a qualidade e a expectativa de vida. Uma vez que a maioria dos biossensores comerciais quantitativos são eletroquímicos e devido ao grande número de publicações cientificas descritos na literatura envolvendo a peroxidase, acredita-se que um biossensor comercial dessa enzima será desenvolvido nos próximos anos. Dessa forma, esta revisão tem como objetivo relatar trabalhos sobre biossensores eletroquímicos que usam como biorreceptor a enzima peroxidase. Serão descritas as principais tecnologias empregadas atualmente no desenvolvimento de biossensores, destacando a imobilização da peroxidase e suas aplicações.

2. Peroxidase

O termo peroxidase foi usado pela primeira vez em 1898, por Linossier, apesar de sua atividade ter sido observada e descrita primeiramente em 1855.[36,37] As peroxidases são o principal grupo de enzimas antioxidantes existente.[38] Atualmente, o termo se refere a um grupo de enzimas tais como NADH peroxidase, glutationa peroxidase, iodeto peroxidase, entre outras. Elas são oxirredutases que catalisam a redução de peróxidos e a oxidação de muitos compostos de origem orgânica ou inorgânica. Elas podem conter um grupo heme ou não e são divididas em quatro classes de acordo com a sua origem: vegetais, fúngicas, bacterianas e de origem animal.[34,39,40] O peso molecular das peroxidases varia entre 20 e 200 kDa.[41-43] Elas desempenham um importante papel nos seres vivos. Nas plantas, estão presentes nos mecanismos de defesa de células infectadas por patógenos ou danificadas pelo ambiente, no processo de degradação da lignina nas paredes celulares e na resposta à presença de metais pesados. Nos animais, elimina o peróxido de hidrogênio das células.[39,44]

As peroxidases catalisam a oxidação principalmente de fenóis,[29] aminas aromáticas, entre outras substâncias,[31,38] sendo amplamente empregada em pesquisas científicas e na indústria.[33] É utilizada no desenvolvimento de produtos para a remoção de contaminantes de fontes de água, atuando como catalisador na degradação de fenóis,[45-47] medicamentos,[48] corantes,[49-52] toxinas[53] e outros contaminantes hídricos.[46,54] Também está presente na síntese de polímeros[55-58] e, principalmente, no desenvolvimento de biossensores.[13,24,49,59-61] Porém, a principal desvantagem de usar a peroxidase a nível industrial é a perda de atividade enzimática quando o meio reacional não possui o substrato a ser reduzido, apenas peróxido de hidrogênio.[36]

As peroxidases que apresentam um grupo heme contém protoporfirina IX de ferro (III) como grupo prostético do sítio ativo.[62] O esquema simplificado na Figura 1 mostra o mecanismo de reação da peroxidase na presença de peróxido de hidrogênio e do substrato doador de elétrons (S). Na primeira etapa (Figura 1a), o átomo de ferro do grupo heme é oxidado pelo peróxido com a perda de dois elétrons, formando o Composto I, o qual consiste no ferro oxiferril ($O=Fe^{4+}$) e o radical protoporfirina (R^{+}). Na segunda etapa (Figura 1b), o Composto I oxida uma molécula do substrato doador de elétrons (S) e passa a ser denominado Composto II. Na terceira etapa (Figura 1c), a etapa anterior se repete com outra molécula doadora de elétrons sendo oxidada, fazendo com que a enzima retorne ao estado inicial. Os compostos fenólicos são oxidados a radicais livres nas segunda e terceira etapas (Figura 1b e Figura 1c).[24,39,63,64]

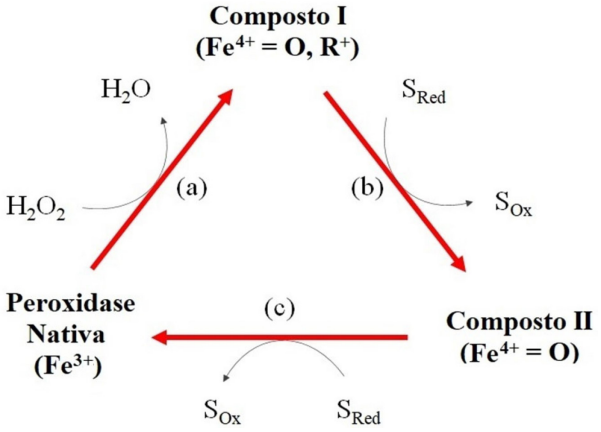

Figura 1. Ciclo catalítico da enzima peroxidase, onde R^{+} = radical protoporfirina, S_{red} = substrato doador de elétrons reduzido e S_{ox} = substrato doador de elétrons oxidado

As peroxidases que não carregam grupo heme em sua estrutura possuem uma molécula do aminoácido cisteína em seu sítio ativo. Esta cisteína é oxidada por uma molécula de peróxido de hidrogênio. O intermediário oxidado forma uma ligação com outra cisteína. Este segundo intermediário é, então, reduzido pelo substrato.[34,40]

Um dos métodos mais empregados para medir a atividade da peroxidase é o que envolve a reação do guaiacol com o peróxido de hidrogênio na presença de peroxidase, formando o tetraguaiacol (Figura 2). A variação da absorbância em 470 nm devido à formação do tetraguaiacol fornece a atividade da enzima em unidades por mililitro (U mL^{1}), que pode ser calculada usando a equação 1.[64-66]

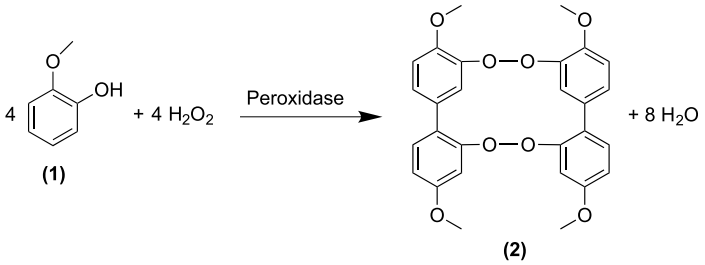

Figura 2. Reação de formação de tetraguaiacol **(2)** empregando peroxidase como catalisador, a partir do guaiacol **(1)** e peróxido de hidrogênio

$$Atividade\ Enzimática = \frac{1000.\Delta A}{\Delta t\ .\ V_{enzima}} \quad (1)$$

V_{enzima} = é o volume da solução de enzima (mL); ΔA = Variação da absorbância; Δt = Variação do tempo (min).[64]

Existem outros métodos espectrofotométricos usados para medir a atividade da peroxidase, porém menos empregados. Em um dos métodos, ocorre a oxidação da o-dianisidina (3,3'-dimetoxibenzidina) em presença de peróxido de hidrogênio, gerando a forma oxidada da o-dianisidina, de cor marrom, que absorve no comprimento de onda de 460 nm (Figura 3). Uma unidade de atividade é definida como a quantidade de enzima que oxida 1 μmol de o-dianisidina por minuto.[67-73]

O método de Trinder pode ser realizado usando dois substratos diferentes para a peroxidase, a 4-aminofenazona[74,75] e a 4-aminoantipiridina.[76-78] Nos procedimentos são empregados tampão fosfato pH 7,0, fenol, peróxido de hidrogênio e a peroxidase em forma livre ou imobilizada em algum suporte. Os reagentes são colocados em um tubo com paredes negras por dez minutos. Após esse tempo de incubação, a absorção de uma amostra da solução é medida em 510 nm (4-aminoantipiridina)[76-78] ou 520 nm (4-aminofenazona).[74,75] Uma unidade de atividade enzimática (U mL^{-1}) é definida como a conversão de 1,0 μmol de H_2O_2 por minuto. A atividade da enzima é determinada usando a Equação 2:

$$Atividade\ Enzimática = \frac{\Delta A V_{Total}}{V_{enzima}.\ \varepsilon} \quad (2)$$

V_{Total} = volume total (mL); V_{enzima} = volume da solução de enzima (mL); ΔA = Variação da absorbância; ε = coeficiente de extinção, 7100 M^{-1} cm^{-1}.[78]

Os três métodos descritos acima empregando guaiacol,[79,80] o-dianisidina[67] e o Método de Trinder,[74,77] podem ser usados para medir a atividade da peroxidase imobilizada, porém são mais empregados na medição da atividade da peroxidase livre. A eficiência da imobilização de enzimas que são empregadas no desenvolvimento de biossensores geralmente é verificada comparando a resposta analítica dos sensores antes e depois das modificações.

2.1. Fontes de peroxidase

Novas fontes de enzimas têm sido estudadas para aplicações em biotecnologia, uma vez que tecidos vegetais podem apresentar propriedades bioquímicas que se adequam melhor em algumas aplicações.[81] Por esses motivos e devido a menores custos, já foram estudados muitos vegetais como alternativa à enzima comercial. Em diversos estudos já foram empregados os seguintes vegetais como fonte da enzima peroxidase: abobrinha,[47] nabo, repolho, rabanete, tomate,[51,82] cenoura,[51] caule e folhas de couve-flor,[83] farelo de soja e farelo de arroz,[51,84] casca de laranja[85] casca de tangerina,[86] fibra de coco,[87] alface, brócolis, palmeira real, mamão, berinjela, limão,[38] figo[88] e folhas de diversas plantas.[45,50]

A principal fonte de peroxidase comercial é a raiz-forte (*Armoracia rusticana*),[85] que geralmente é cultivada em países de clima frio.[89] Na construção de biossensores eletroquímicos, esta é a enzima purificada mais empregada.[90] Porém, o seu alto custo faz com que muitos pesquisadores busquem alternativas como fonte desta enzima.[50,85] Por esse motivo, nos últimos anos, é crescente a tendência de empregar extratos brutos ou tecidos vegetais como fontes enzimáticas. Esses procedimentos têm menor custo quando comparados com as enzimas purificadas disponíveis no mercado e, em alguns casos, a enzima apresenta uma estabilidade maior devido às substâncias naturalmente presentes na fonte vegetal.[91] Para comparação de custos, 5.000 unidades de peroxidase comercial empregada no estudo de Golunski[84] (Tipo VI, liofilizada) custa aproximadamente US$ 140.[92] Enquanto, considerando o

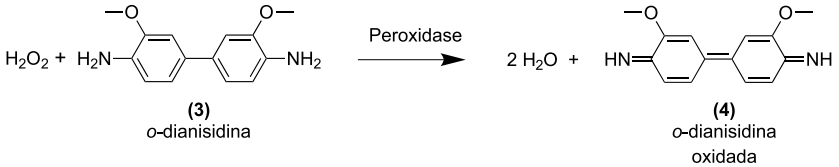

Figura 3. Reação de oxidação da o-dianisidina **(3)** por peróxido de hidrogênio, empregando peroxidase como catalisador

trabalho de Oliveira,[64] que empregou jiló como fonte de peroxidase para emprego em biossensores amperométricos, as mesmas 5.000 unidades podem ser obtidas em apenas 1 mL do extrato desse vegetal, sendo que 100 mL desse extrato foi preparado usando 25 g de jiló. Na elaboração deste extrato, foi necessário apenas uma homogeneização simples com solução tampão e centrifugação em centrífuga refrigerada. Uma desvantagem existente no uso de extratos é a diminuição da seletividade do método analítico.[93]

Como fonte de peroxidase para aplicação em biossensores, já foram empregados diversos vegetais, como: atemoia,[91] abobrinha,[94] broto de feijão,[95] alfafa,[96] alho,[67] soja,[24] canola,[68] capim-mombaça,[81] gengibre, batata doce, inhame, abacate, jiló,[97] entre outros.

A forma de obtenção de enzimas que apresenta maior interesse pela indústria é a microbiana, pois dessa forma são mais facilmente produzidas em larga escala, embora as enzimas de origem vegetal ou animal sejam as mais estudadas. Certas bactérias são empregadas como fonte de peroxidase em algumas pesquisas.[48,49,54] Essa fonte é mais promissora devido a maior facilidade em alterar o código genético de bactérias em relação aos fungos.[98] A seguir, são apresentados três trabalhos onde a peroxidase foi extraída e purificada de fontes microbianas. Essas fontes ainda não são muito aplicadas para o desenvolvimento de biossensores.

Barbosa *et al*.[49] extraíram, purificaram e imobilizaram peroxidase da bactéria *Pseudomonas putida* e desenvolveram um biossensor de anel de prata para detectar peróxido de hidrogênio, que apresentou faixa de linearidade na concentração de 1,0 a 200 µmol L^{-1} em solução aquosa.

Asgher e Iqbal[99] extraíram e purificaram a peroxidase do fungo *Pleurotus ostreatus*. Ele foi cultivado em fermentação de estado sólido usando meio de fermentação à base de palha de trigo. Os principais constituintes do meio foram: tartarato de amônio, KH_2PO_4, $MgSO_4$, $CaCl_2$ e polisorbato 80. A peroxidase foi extraída da biomassa após 5 dias de fermentação. A peroxidase foi purificada por cromatografia de filtração em gel em coluna Sephadex-G-100.

Zouraris *et al*.[100] estudaram cineticamente a peroxidase extraída do fungo *Myceliophthora thermophila* imobilizada em eletrodo de ouro, calculando as constantes cinética e de Michaelis-Menten, e concluíram que essa enzima é estável em concentrações mais altas de peróxido de hidrogênio (16 mmol L^{-1}), com o valor da resposta amperométrica máxima em pH 8,0, concentração de peróxido de hidrogênio de 1,0 mmol L^{-1} e potencial aplicado de -0,26 V.

Esses artigos apresentados mostram a viabilidade do emprego de peroxidase de origem microbiana para a construção de biossensores e podem impulsionar outras pesquisas sobre o tema.

2.2. Imobilização de enzimas

Segundo Souza,[101] "imobilização é um termo genérico empregado para descrever a retenção de uma biomolécula no interior de um reator (indústria) ou de um sistema analítico (biossensor)". A imobilização de uma biomolécula na superfície de um material é uma das etapas cruciais na construção de um biossensor para garantir a estabilidade operacional a longo prazo.[9]

Existem várias técnicas de imobilização de enzimas, quase todas consistem em unir a enzima a um suporte sólido insolúvel no ambiente reacional (Figura 4). Os principais métodos de imobilização de enzimas são adsorção, confinamento, ligação covalente e covalente cruzada.[15,102,103]

Por meio do processo de imobilização as enzimas podem apresentar maior estabilidade e, em alguns casos, podem ser reutilizadas sem perder a atividade catalítica.[38] Dessa forma, a enzima passa de uma forma homogênea (enzima livre) para uma forma heterogênea (enzima imobilizada). A finalidade da imobilização enzimática é obter um catalisador que pode ser empregado em processos contínuos, que pode ser reutilizado e possuir estabilidade de armazenamento e características otimizadas em relação à forma livre. As enzimas imobilizadas geralmente possuem uma maior resistência a solventes orgânicos, variação de pH, de temperatura e de pressão na maioria dos casos.[104]

Enzimas podem ser imobilizadas desde em bagaço de cana-de-açúcar[105] até em materiais artificiais modernos, como *quantum dots*.[106] As características mais importantes em um suporte são estabilidade química, baixo custo, permeabilidade, grande área superficial e resistência ao ataque de microrganismos. Outros parâmetros a serem considerados são o tamanho da partícula (nanopartículas), porosidade e tamanhos dos poros, hidrofilicidade, entre outros.[107]

Para Pandey *et al.*,[32] é necessário explorar suportes menos custosos na imobilização de enzimas para aproveitar

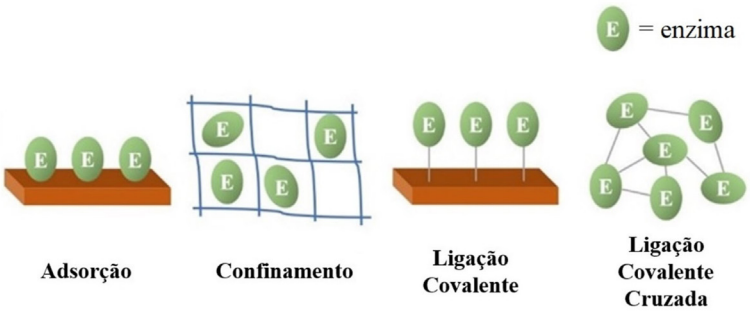

Figura 4. Diferentes tipos de imobilização enzimática

as diversas e potenciais aplicações industriais apresentadas por muitas destas como, por exemplo, a peroxidase.

Alguns suportes têm sido empregados frequentemente na construção de biossensores de peroxidase nos últimos anos, tais como os polímeros naturais (quitosana, celulose, polissacarídeos), polímeros sintéticos (poliacrilonitrila), sílicas, nanopartículas magnéticas, vidro poroso, óxidos (ferro, zinco, alumínio), materiais de carbono (nanotubos simples e multicamadas, grafeno, nanoesferas), *quantum dots*, nanomateriais metálicos, entre outros.[104] Os nanomateriais são ótimas matrizes de imobilização para biomoléculas na construção de biossensores pela grande razão área/volume que possuem, além de aumentarem a sensibilidade dos sensores.[9]

O método de imobilização a ser empregado depende da finalidade de cada biossensor.[15] Ribeiro *et al*.[94] testaram três tipos de imobilização para a peroxidase em nanotubos de carbonos de paredes múltiplas por ligação covalente, adsorção e ligação cruzada, em seguida foram construídos biossensores de pasta de carbono para quantificar dopamina. O biossensor construído a partir da imobilização da enzima por ligação covalente apresentou melhor resposta para determinação de dopamina. Para a realização deste método, a superfície do material foi funcionalizada com grupos carboxila e reticulado com carbodiimida com posterior imobilização da peroxidase. Neste trabalho foi empregada abobrinha como fonte de peroxidase, uma fonte alternativa à peroxidase comercial.

Monier *et al.*[108] desenvolveram um método para imobilização da peroxidase em microesferas de quitosana revestidas com polietilacrilato. Para evitar a desnaturação e perda da atividade catalítica da enzima o método foi desenvolvido sem a interação da peroxidase com reagentes químicos. Este método de imobilização promoveu ligações covalentes entre a peroxidase com a superfície modificada das microesferas. Embora tenha diminuído um pouco a atividade enzimática, a imobilização forneceu bons resultados na estabilidade térmica acima de 45 °C e pH acima de 9.

Ariffin *et al.*[109] também desenvolveram um método semelhante ao de Monier *et al.*, [108] onde foram criadas interações do grupo amino da enzima com um polímero de acrilato. Procedimentos de imobilização análogos a esses também foram empregados por Çevik *et al.*[31], Hernandez-Cancel *et al.*[35] e Amini e Shamsipur[34]. Em todos esses trabalhos, a superfície a ser usada como suporte para a imobilização da peroxidase foi modificada anteriormente à etapa de contato com a enzima, diminuindo a probabilidade de ligações covalentes não desejadas que pudessem afetar a atividade enzimática.

Na Tabela 1 são mostrados alguns trabalhos onde foi calculada a constante de Michaelis-Menten (K_m) para a peroxidase imobilizada. É importante ressaltar que, em trabalhos envolvendo o desenvolvimento de biossensores, geralmente não há essa comparação. O estudo geralmente realizado é do eletrodo comercial original comparado ao eletrodo com as modificações realizadas (biossensor), já com a enzima imobilizada.

Como pode ser visto na Tabela 1, a imobilização não garante um aumento da atividade enzimática (diminuição de K_m), mas uma possível perda de atividade é compensada monetariamente pela reutilização da enzima imobilizada, o que não ocorre com a enzima na forma livre.

2.3. Quitosana para a imobilização de peroxidase

A quitosana (β(1-4)-2-amino-2-deoxi-D-glicose) é o principal derivado da quitina, que é o segundo polímero mais abundante na natureza. Ele está presente em carapaças de crustáceos, insetos, fungos, entre outros.[110] A quitosana é um aminopolissacarídeo que contém muitos grupos amino e hidroxila em sua estrutura, o que faz com que as enzimas possam ser imobilizadas em sua estrutura sem a necessidade de reações de reticulação. Por esses motivos, além do baixo custo, biocompatibilidade e hidrofilicidade, esse biopolímero tem sido empregado nos últimos anos em pesquisas como suporte para imobilização.[104,111] A quitosana também possui propriedades para formar microesferas de tamanhos variados, membranas e fibras. Como material de suporte para imobilização enzimática, é empregada em biossensores, sistemas biocatalíticos para degradação de contaminantes e corantes[104] e na síntese de nanocompósitos para sensores eletroquímicos.[112] Apesar de originalmente ser adequada para a imobilização de enzimas, a quitosana pode ser reticulada para produzir uma estrutura tridimensional ainda melhor para a imobilização de enzimas, seja por adsorção, ligação covalente, ligação covalente cruzada e confinamento.[110]

Segundo Pandey *et al*.,[38] para explorar todas as aplicações possíveis da peroxidase, é necessário empregar

Tabela 1. Valores da constante de Michaelis-Menten (mmol L^{-1}) encontrados para a peroxidase imobilizada descritos na literatura

Substrato	Suporte	Km antes da imobilização	Km após a imobilização	Referência
H_2O_2	Microesfera de quitosana	0,50	0,40	67
H_2O_2	Filme de quitosana	0,50	0,26	67
Pirogalol	Quitosana + Poliacrilato de etila	2,235	2,875	108
Guaiacol	Quitosana	17,78	18,28	80
Guaiacol	Quitosana + Polietilenoglicol	17,78	19,92	80

Km = constante de Michaelis-Menten

um suporte simples e barato, como a quitosana. Esse polímero possui outras propriedades que contribuiriam para viabilizar a prática do uso para diversas aplicações, como: fácil disponibilidade, biodegradabilidade, não toxicidade, propriedades fungistáticas e bacteriostáticas, alta resistência mecânica, hidrofilicidade e estabilidade.

Ichi *et al.*[67] confinaram peroxidase extraída de alho numa matriz de quitosana reticulada com glioxal para detectar peróxido de hidrogênio em amostras de leite de vaca. Um fino filme de quitosana modificado contendo peroxidase foi depositado na superfície de um eletrodo de ouro. O biossensor desenvolvido apresentou faixa de linearidade na concentração de 20 a 60 μmol L^{-1} para o peróxido de hidrogênio.

Oliveira e Vieira[110] imobilizaram peroxidase em quitosana para a construção de um biossensor de hidroquinona. Foram construídos 3 tipos de biossensores diferentes empregando os agentes reticulantes glutaraldeído, epicloridrina e carbodiimida. O melhor resultado foi apresentado pelo biossensor no qual a quitosana foi reticulada com glutaraldeído e epicloridrina, provavelmente devido à formação mais efetiva da rede tridimensional polimérica entre quitosana, epicloridrina e glutaraldeído. Além disso, a enzima está ligada nas extremidades do glutaraldeído e confinada entre os espaços intersticiais das ligações covalentes formadas. A faixa de linearidade da concentração do analito foi de 0,25 a 4,5 mmol L^{-1}, e o LD de 2,0 μmol L^{-1}.

3. Nanomateriais no Desenvolvimento de Biossensores Eletroquímicos

Com o avanço da tecnologia nos últimos anos, os biossensores têm sido miniaturizados e novos materiais, como vários tipos de nanopartículas e nanotubos, foram desenvolvidos e são aliados perfeitos na busca por sensores mais sensíveis e seletivos. Estes, em conjunto com técnicas novas de transdução e imobilização dos componentes biológicos, permitem inúmeros arranjos para detecção de praticamente qualquer analito de interesse.[5,113]

O surgimento de inúmeros nanomateriais e suas ótimas propriedades elétricas, químicas e ópticas impactaram positivamente o desenvolvimento dos biossensores.[21,114,115] Atualmente a maioria dos biossensores são desenvolvidos usando algum tipo de nanomaterial em sua composição,[9] sendo os mais empregados as nanopartículas de metais nobres, nanoestruturas de carbono e nanopartículas magnéticas.[9,116] Nanomateriais é a designação recebida pelos materiais que possuem uma dimensão menor que 100 nm.[30,52,114] Eles podem ser divididos em quatro grupos, de acordo com a matéria-prima empregada em suas sínteses: de carbono (grafeno, óxido de grafeno, nanotubos de carbono, fulereno), inorgânicos (metais, óxidos metálicos, semicondutores), orgânicos (polímeros, dendrímeros, micelas, lipossomas) e compósitos (combinação de um nanomaterial com outro nanomaterial ou qualquer material a granel).[114]

A Figura 5 e a Figura 6 mostram os números de artigos encontrados no banco de dados da *Web of Science*[117] até o mês de dezembro de 2021. O quantitativo foi considerado se os termos pesquisados estivessem presentes em todos os campos possíveis de busca, o que incluiu: título, resumo, palavras-chaves e tópico. O termo "*biosensor*" foi utilizado em todas as buscas, como um termo fixo, juntamente com algumas palavras-chaves variáveis.

A Figura 5 apresenta o número de artigos onde são encontrados o termo *"biosensor"* com as palavras-chave *"peroxidase"*, *"nanoparticle"* e *"nanomaterial*", mostrando a importância desses materiais e desta enzima no desenvolvimento de biossensores. Na Figura 5a, o termo pesquisado foi apenas *"biosensor"*. Na Figura 5b, os termos de pesquisas foram *"biosensor"*, operador booleano *"AND"* e o termo *"peroxidase"*. Na Figura 5c, *"biosensor" "AND" "nanoparticle" "OR" "nanomaterial*". Na Figura 5d, *"biosensor" "AND" "peroxidase" "AND" "nanoparticle" "OR" "nanomaterial"*. Foi observado que cerca de cinco

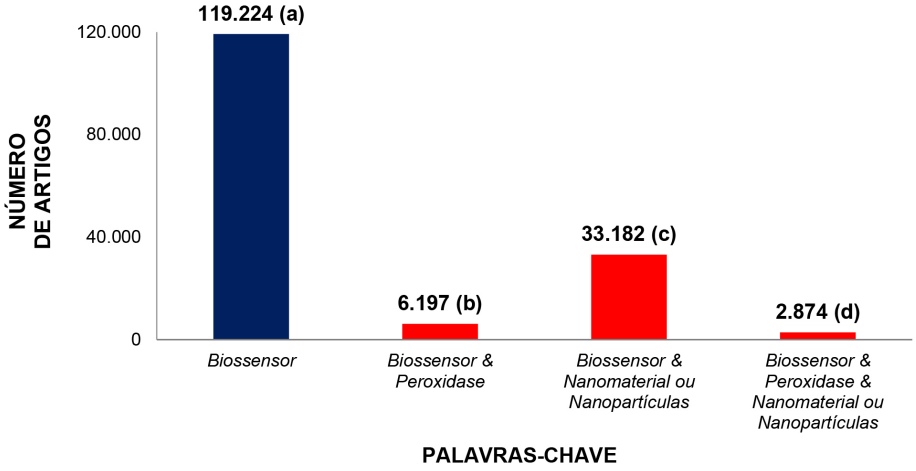

Figura 5. Números de artigos em buscas no banco de dados da Web of Science com os termos "biosensor", "peroxidase", "nanoparticle" e "nanomaterial"

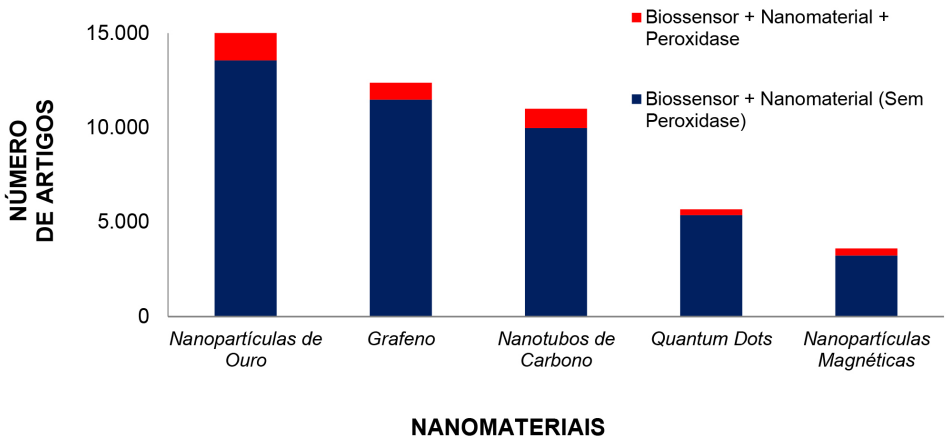

Figura 6. Números de artigos em buscas no banco de dados da Web of Science com a peroxidase e com os principais nanomateriais

por cento dos artigos que citam biossensores também citam peroxidase. Considerando os inúmeros biorreceptores existentes, principalmente entre enzimas e anticorpos, esse é um número bem expressivo. Cerca de 30% dos artigos que citam biossensores incluem nanomateriais, mostrando que o desenvolvimento de biossensores emprega amplamente este tipo de material. Além disso, aproximadamente metade dos textos que citam peroxidase o fazem também citando nanomateriais, mostrando que o uso desta enzima no desenvolvimento de novos biossensores se faz associado com o emprego desses materiais.

A Figura 6 mostra pesquisas com o termo "*biosensor*" e os principais nanomateriais empregados na construção de biossensores segundo a literatura,[9,116] além do termo *"peroxidase"*, sendo as outras palavras-chaves "*graphene*", "*gold nanoparticles*", "*carbon nanotubes*", "*quantum dots*", "*magnetic nanoparticles"* e *"peroxidase"*. As barras azuis representam o número de artigos encontrados que citam *"biosensor" "NOT" "peroxidase" "AND"* algum nanomaterial ("*graphene*", "*gold nanoparticles*", "*carbon nanotubes*", "*quantum dots*", "*magnetic nanoparticles"*), excluindo as produções com o termo *"peroxidase"*. A porção vermelha representa o número de artigos encontrados que, além dos nanomateriais mencionados, citam "*peroxidase*", ou seja, que combinam as palavras *"biosensor" "AND" "peroxidase" "AND"* algum nanomaterial. A Figura 6 mostra o interesse dado a cada nanomaterial nas pesquisas com biossensores e a importância da peroxidase no desenvolvimento de biossensores com diferentes nanomateriais. Na maioria dos casos, os trabalhos com peroxidase representam cerca de 10% do total da produção envolvendo os biossensores com determinado tipo de nanomaterial, com exceção à coluna dos *quantum dots*, provavelmente por estes serem um material mais recente. O número maior de artigos que empregam nanopartículas de ouro pode estar relacionado ao fato deste nanomaterial poder ser sintetizado pelos próprios pesquisadores, dando mais flexibilidade à pesquisa. O contrário ocorre com o grafeno e com os nanotubos de carbono, que só podem ser modificados. A preferência por esses três primeiros compostos (nanopartículas de ouro, grafeno e nanotubos de carbono) deve ser pelo fato de apresentarem as características eletrônicas superiores às nanopartículas magnéticas e aos *quantum dots* ainda serem relativamente recente, como já dito anteriormente.

Biossensores que empregam biomoléculas (como a peroxidase) imobilizadas em nanomateriais possuem propriedades químicas e físicas muito vantajosas, tais como: aumento do número de moléculas imobilizadas devido a elevada área superficial, amplificação do sinal eletroquímico e estabilidade do sistema biomolécula-suporte.[9,30,34,90,118] Por exemplo, nanotubos de carbono e grafeno possuem alta razão área por peso (até 1000 m^2 g^{-1}), além de possuírem estruturas com poros de vários tamanhos viabilizando a imobilização de enzimas.[104] Dessa forma, os biossensores estão apresentando maior sensibilidade, incluindo os biossensores de peroxidase.

3.1. Nanopartículas de ouro

As nanopartículas de ouro são amplamente empregadas para amplificar o sinal em vários tipos de sensores, incluindo biossensores eletroquímicos e piezoelétricos.[119] As principais vantagens do uso dessas nanopartículas na construção de biossensores é a excelente condutividade elétrica, grande área superficial, biocompatibilidade e a facilidade da síntese de partículas de tamanhos e morfologia variados, como: nanoesferas, nanobarras e nanocristais de forma núcleo e casca. As nanopartículas de ouro têm sido usadas para imobilização de enzimas e tem sido observado uma tendência da manutenção da atividade catalítica após este procedimento.[22,30,119,120]

Xiang *et al.*[121] desenvolveram um imunossensor eletroquímico para detecção de *Salmonella*. O sensor foi construído usando nanopartículas de ouro dispersas em hidrogel de quitosana sobre um eletrodo de carbono vítreo. Foi realizado um arranjo do tipo "sanduíche", com anticorpos anti-*salmonella* ligados à superfície do eletrodo

e a enzima peroxidase ligada ao anticorpo. O biossensor apresentou um limite de detecção (LD) de 5 unidades formadoras de colônia (UFC) mL^{-1} e faixa de linearidade na concentração de 10 a 10^5 UFC mL^{-1}.

3.2. Grafeno

O grafeno é caracterizado como um ótimo suporte para várias aplicações, incluindo a construção de biossensores, devido a excelente condutividade elétrica. Outra característica é a alta área superficial, o que resulta em mais biomoléculas imobilizadas, aumentando a sensibilidade do biossensor. É pouco tóxico, possui alta elasticidade e resistência mecânica, além de ser de fácil modificação, o que é adequado para imobilização de biomoléculas, seja por ligações covalentes ou não covalentes.[30,103,120,122]

Embora a grafeno já tenha sido empregado como matéria-prima para a síntese de *quantum dots* para a construção de um biossensor para peróxido de hidrogênio,[123] o uso mais comum do grafeno ou óxido de grafeno é servir de base para a imobilização de peroxidase na modificação de eletrodos comerciais. Como, por exemplo, na pesquisa de Liu *et al*.,[124] onde um eletrodo de carbono vítreo foi revestido com nanofolhas de Co_3O_4 e óxido de grafeno com peroxidase imobilizada na construção de um biossensor de 3ª geração para a detecção de nitrito. A faixa linear de concentração do analito foi de 1,0 a 5400 µmol L^{-1}. Em outro trabalho, um biossensor de grafeno e peroxidase foi construído para a detecção de peróxido de hidrogênio em culturas de células vivas. O sensor apresentou LD de 0,0267 nmol L^{-1} e duas faixas lineares de concentração, em mol L^{-1}: $8{,}0\times10^{-11}$ a $6{,}64\times10^{-7}$ e $2{,}77\times10^{-6}$ a $8{,}35\times10^{-4}$.[125]

3.3. Nanotubos de carbono

Os nanotubos de carbono são reconhecidos como um dos melhores materiais para serem empregados na construção de biossensores eletroquímicos. Esses compostos possuem propriedades físicas, químicas e elétricas únicas, com potencial para grandes avanços no ramo da ciência de biorreconhecimento.[19,113] Isso é devido ao fato desse material reunir várias características importantes para imobilização de biomoléculas, como área superficial elevada, alta estabilidade química e excelente amplificação de sinal devido às suas propriedades eletrônicas.[19,113,114]

Ribeiro *et al*.[94] imobilizaram peroxidase em nanotubos de carbonos de paredes múltiplas e construíram um biossensor para determinação de dopamina em amostras de fármacos. O LD foi de 2,0 µmol L^{-1}. A faixa de quantificação foi de 32,0 a 44,0 µmol L^{-1}. Também foi estudado o comportamento do biossensor com os interferentes ácido úrico e ácido ascórbico, com estes não alterando a eficiência do biossensor.

Akter *et al*.[126] modificaram a superfície de um eletrodo de ouro com a imobilização de nanotubos de carbono de parede múltiplas seguida por imobilização das nanopartículas de ouro. Os anticorpos anti-PSA unidos à peroxidase foram então imobilizados sobre o suporte e o sensor desenvolvido foi otimizado para determinação de antígeno prostático específico (PSA) na concentração de 1,0 pg mL^{-1} a 10,0 ng mL^{-1} com LD de 0,40 pg mL^{-1}.

3.4. Nanopartículas magnéticas

Esse tipo de nanopartículas apresenta baixo custo de produção, fácil preparação e baixa toxicidade. O tipo mais empregado são as sintetizadas a partir de óxido de ferro (II e III), devido às suas propriedades superparamagnéticas (são magnéticas apenas na presença de um campo magnético externo) e biocompatibilidade com enzimas e anticorpos. As enzimas são imobilizadas em partículas magnéticas por meio de interações dos grupos amino, hidroxila e carboxila com a superfície das nanopartículas. Além disso, esse tipo de material possui elevada área superficial e pode ser separado pela aplicação de um campo magnético externo.[66,102,114]

Çevik *et al*.[31] construíram um biossensor empregando nanopartículas de óxido de ferro (Fe_3O_4) para a imobilização de peroxidase para detectar os seguintes compostos fenólicos separadamente: fenol, catecol, p-cresol, 2-aminofenol e pirogalol. As respectivas faixas lineares de concentração dos compostos, em mmol L^{-1}, foram: 0,5 a 8,5; 0,5 a 11,0; 0,5 a 7,0; 0,5 a 3,5 e 0,5 a 15,0.

Darwesh *et al*.[52] e Mohammed *et al*.[66] imobilizaram a peroxidase em nanopartículas magnéticas de Fe_3O_4, porém sem construir um biossensor, e observaram o aumento da estabilidade enzimática ao longo do tempo, e também mediante às alterações de pH e de temperatura, e da reutilização do suporte obtido. Os resultados indicam que esse arranjo seria muito útil em um biossensor. Darwesh *et al*.[52] variaram a temperatura de 20 a 100 °C e o pH de 2 a 12. Mohammed *et al*.[66] variaram o pH de 2 a 9 e a temperatura de 50 a 80 °C.

3.5. Quantum dots

O emprego de *quantum dots* em biossensores é muito apropriado devido à amplificação de sinal e à maior área superficial, o que aumenta o número de biomoléculas imobilizadas na superfície dos eletrodos modificados. Essas duas características resultam na maioria das vezes em um menor limite de detecção e a uma maior sensibilidade do biossensor. Porém, a principal razão pela qual esse tipo de nanomaterial possui boas perspectivas de aplicação na biodetecção **é** a alta capacidade de funcionalização de sua superfície com biorreceptores, criando uma excelente combinação de biotecnologia e nanotecnologia para o uso em biossensores eletroquímicos.[106]

Fruk *et al*.[127] conseguiram induzir a atividade da peroxidase através de irradiação mesmo na ausência de peróxido de hidrogênio. A enzima foi adsorvida **à** superfície de *quantum dots* de CdS com 3 nm de diâmetro. A atividade da enzima era reversivelmente "ligada" e "desligada" pela luz. Esse arranjo seria de ótimo emprego em biossensores,

principalmente por não necessitar da presença do peróxido de hidrogênio.

Su *et al.*[128] fizeram um estudo da resistência de transferência de carga (R_{CT}) de um eletrodo de carbono vítreo (GCE) modificado com *quantum dots* de carbono (CD) para a construção de biossensor para a detecção de peróxido de hidrogênio. Foram sintetizados dois tipos de *quantum dots* em relação à superfície destes, um com grupamento -NH_2 e outro sem. Foram empregados, respectivamente, como fonte de carbono para a síntese, quitosana e glicose. A enzima peroxidase de rábano silvestre (HRP) foi imobilizada nos *quantum dots* por adsorção. O eletrodo GCE/CD-NH_2/HRP apresentou menor R_{CT} do que o eletrodo GCE/CD/HRP, comprovando que a funcionalização da superfície auxilia ou na imobilização de mais moléculas de enzima ou no transporte de elétrons para o eletrodo. Ambos os eletrodos com *quantum dots* de carbono obtiveram menor R_{CT} do que o eletrodo GCE/HRP, construído com a HRP imobilizada diretamente no eletrodo, comprovando a eficiência do nanomaterial em aumentar a condutividade elétrica do sistema. O peróxido de hidrogênio foi quantificado na faixa de 5 a 590 nmol L^{-1}, com LD de 1,8 nmol L^{-1}.

4. Construção de Biossensores Eletroquímicos de Peroxidase

Os principais tipos de transdutores empregados em biossensores são eletroquímicos, ópticos, térmicos e piezoelétricos.[21,27] A Figura 7 mostra um gráfico de pizza da distribuição dos principais transdutores empregados no desenvolvimento de biossensores de peroxidase, de acordo com buscas efetuadas no banco de dados da *Web of Science*. Assim como nas pesquisas anteriores, os termos "*biosensor*" e "*peroxidase*" foram fixados e o tipo de transdutor foi o termo variável nas buscas. No gráfico, é possível notar que os transdutores eletroquímicos são a preferência dos pesquisadores na construção de biossensores de peroxidase.

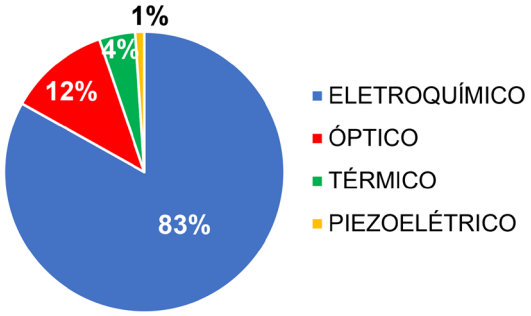

Figura 7. Gráfico da distribuição dos principais transdutores empregados no desenvolvimento de biossensores de peroxidase de acordo com o banco de dados da *Web of Science*

A maioria dos biossensores comerciais empregam transdutores eletroquímicos. O sinal elétrico gerado no transdutor é analisado por uma unidade de processamento, que o converte em uma informação mostrada ao analista por meio de um *display*. Essa informação é a concentração do analito ou, simplesmente, a detecção de sua presença na amostra.[27,29,129]

Os biossensores eletroquímicos medem um sinal elétrico que é resultado de algum evento biológico.[4] São considerados os principais tipos de biossensores[6,7] representando a maior fatia no mercado, com 70% das vendas,[7] sendo os glicosímetros portáteis os principais representantes de biossensores deste tipo.[5] Os biossensores eletroquímicos apresentam maior sensibilidade, menor tempo de análise e menor custo, além de serem mais compatíveis com os métodos de miniaturização disponíveis. Com o avanço da nanotecnologia os biossensores eletroquímicos tiveram o tamanho ainda mais reduzido e produzindo melhores resultados em termos de sensibilidade.[6,19,27,30,130]

A Tabela 2 lista alguns biossensores eletroquímicos de peroxidase. Nela são mostradas as diversas modificações que podem ser realizadas nos eletrodos a fim de aumentar o sinal do biossensor, a variedade de analitos quantificados por biossensores de peroxidase e o método de imobilização empregado em cada trabalho. Com isso, nota-se que os pesquisadores possuem liberdade para construir seus biossensores empregando muitas técnicas de modificação de eletrodos e uma variedade de técnicas eletroanalíticas pode ser empregada nos procedimentos eletroquímicos.

Baseando-se nos dados da Tabela 2, foram pesquisados no site *Web of Science* os números de artigos sobre biossensores que citam as técnicas eletroanalíticas mostradas na Tabela 2, seguindo os mesmos procedimentos das Figuras 4 e 5. Os termos "*biosensor*" e "*peroxidase*" foram fixados, com o termo variável sendo o nome da técnica eletroanalítica: "*electrochemical impedance spectroscopy*", "*square wave voltammetry*", "*differential pulse voltammetry*", "*chronoamperometry*", "*linear scanning voltammetry*", "*steady state current*". A Figura 8 mostra o resultado da pesquisa, onde a voltametria cíclica não é considerada devido à baixa sensibilidade da técnica e atualmente é pouco empregada para fins analíticos.[140]

Com exceção à Espectroscopia de Impedância Eletroquímica (EIE), que é a mais empregada, todas as outras técnicas são amperométricas. Isso concorda com a literatura, que descreve as técnicas amperométricas como as mais empregadas com biossensores.

O sistema transdutor de biossensores eletroquímicos pode ser amperométrico, potenciométrico e condutimétricos/impedimétricos.[15,19,30,129] Os potenciométricos medem diferença de potencial (ddp), mas sem a passagem de corrente elétrica. Esse ddp é registrada ente dois eletrodos e é proporcional a concentração do analito na amostra.[129,140] Os condutimétricos/impedimétricos medem a alteração na condutividade da solução, que ocorre após a geração ou consumo de íons por uma reação química.[129,140] A principal técnica eletroanalítica empregada nesse tipo de transdutor eletroquímico é a espectroscopia de impedância eletroquímica (EIE). Na EIE, a impedância do sistema é medida em ohms. É uma técnica de estado estacionário, o

Tabela 2. Biossensores de peroxidase relatados na literatura

Analito	Eletrodo	Peroxidase	Técnica Eletroanalítica	Método de imobilização	Referência
Compostos Fenólicos	NP de óxido de ferro + telômero de poliglicerilmetacrilato	HRP	VC	Ligação Covalente	31
Dopamina	EPC / PU-PEG	HRP	VOQ	Adsorção	131
Hidroquinona	ECV / AuNP	HRP	CRONO	Ligação Covalente	35
Cianeto	AuNP / ECS	HRP	CEE	Confinamento	132
Oxitetraciclina	ECV / NTCPM	HRP	VPD	Adsorção	133
Bisfenol A	ECV / AuNP / OGR-S	HRP	EIE	Adsorção	134
Capsaicina	ECI / AuNP / MEA	HRP	CRONO	Ligação Covalente	135
Salmonella typhimurium	ECV / AuNP / Polirrol + OGR	HRP	VPD	Adsorção	22
H_2O_2	ECV / Grafeno / 3-(trimetoxisilil)-propilamina	HRP	EIE	Ligação Covalente	34
Pb^{2+}, Ni^{2+}, Cd^{2+}	ECV / Quitosana / NP de óxido de estanho e índio	HRP	EIE	Adsorção	13
H_2O_2 de células cancerígenas	ECV / NTCPM / Estrutura metalorgânica (Fe)	HRP	EIE	Adsorção	59
17β-estradiol	Eletrodo de Platina	HRP	VPD	Adsorção e Ligação Covalente	136
H_2O_2	Eletrodo de Ouro / Quitosana	Peroxidase de alho	EIE	Confinamento e Adsorção	67
Ocratoxina A	EPC / Ferroceno	Peroxidase de canola	CEE	Confinamento	68
Hidroquinona	Eletrodo de Ouro	Peroxidase de alfafa	VOQ	Adsorção	96
Glifosato	EPC / NTCPM	Peroxidase de atemoia	VOQ	Adsorção	91
Dopamina	EPC / NTCPM	Peroxidase de abobrinha	VOQ	Ligação Covalente	94
H_2O_2	Grafeno	Peroxidase de capim-mombaça	CRONO	Adsorção	81
Putrescina	ECV / Ketjenblack	Peroxidase + putrescina oxidase	CRONO	Ligação Covalente	137
Troponina I	ECV / OG / Polietilenoimina	Peroxidase de soja + anticorpo	EIE	Ligação Covalente	24
Catecol, octopamina, pirogalol, 3,4-di-hidroxi-L-fenilalanina	ECI / NTC	HRP	CEE	Adsorção	138
BHA, PG	ECV / Nanotubos de Au-Pt / AuNP + Grafeno	HRP	VVL	Adsorção	139
Colesterol	ECV / AuNP / Quitina / poli(3,4-etilenodioxipirrol) / Grafeno + NTCPM	HRP / colesterol oxidase / colesterol esterase	EIE	Ligação Cruzada	103

NP = Nanopartícula; HRP = Peroxidase de raiz-forte (*Armoracia rusticana*); VC = Voltametria Cíclica; EPC = Eletrodo de pasta de carbono; PU-PEG = Nanopartículas peguiladas de poliuretano; VOQ = Voltametria de Onda Quadrada; ECV = Eletrodo de carbono vítreo; AuNP = Nanopartículas de ouro; CRONO = Cronoamperometria; ECS = Eletrodo de carbono sonogel; CEE = Corrente de Estado Estacionário; NTCPM = nanotubos de carbonos de paredes múltiplas; VPD = Voltametria de Pulso Diferencial; OGR-S = Óxido de grafeno reduzido com tiol; EIE = Espectroscopia de Impedância Eletroquímica; ECI = Eletrodo de carbono impresso; MEA = Microesferas acrílicas; OGR = Óxido de grafeno reduzido; OG = Óxido de grafeno; NTC = nanotubo de carbono; BHA = hidroxianisol butilado; PG = propilgalato; VVL = Voltametria de Varredura Linear

que pode ser uma vantagem em relação a outras técnicas, e é capaz analisar pequenos sinais em uma ampla faixa de frequência (10^{-3} a 10^{6} Hz).[140]

Os biossensores amperométricos, considerados os mais importantes,[15,31] medem a corrente elétrica produzida após a aplicação de uma ddp entre dois eletrodos. Essa ddp promove uma reação de oxirredução reversível das espécies eletroativas presentes na solução sobre a superfície do eletrodo de trabalho.[28,30,31] Esta técnica eletroanalítica é empregada quando é necessário entender os mecanismos e a cinética das reações de oxirredução e a atividade eletroquímica do analito.[140]

Os biorreceptores mais empregados são enzimas e anticorpos, porém sequências de DNA, de RNA, parte ou exemplares inteiros de células, bactérias e vírus podem ser empregados.[7,20,29,129] As enzimas da classe das oxirredutases (oxidases, peroxidases e desidrogenases) são as mais empregadas nos biossensores enzimáticos. O analito quantificado pode ser tanto um substrato da enzima como um inibidor desta, como pesticidas.[29] A seguir são descritos alguns biossensores baseados no método da inibição da peroxidase em solução aquosa. Attar *et al.*[132] quantificaram cianeto na faixa de 0,1 a 58,6 μmol L^{-1}, com LD de 0,03 μmol L^{-1}. Dalkiran *et al.*[13] construíram um

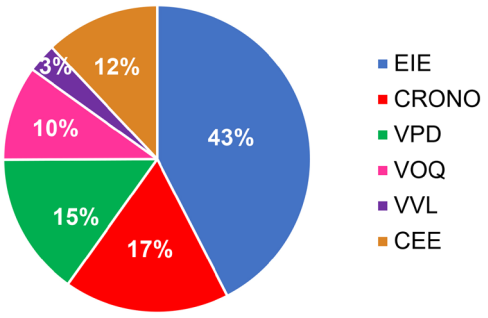

Figura 8. Gráfico da distribuição das principais técnicas eletroanalíticas empregadas na construção de biossensores de acordo com o banco de dados da Web of Science. EIE = Espectroscopia de Impedância Eletroquímica; CRONO = Cronoamperometria; VPD = Voltametria de Pulso Diferencial; VOQ = Voltametria de Onda Quadrada; VVL = Voltametria de Varredura Linear; CEE = Corrente de Estado Estacionário

biossensor onde a peroxidase foi inibida pelos metais Pb^{2+}, Ni^{2+} e Cd^{2+}, com faixas lineares de concentração desses cátions de 0,009 a 0,301 mmol L^{-1}, 0,011 a 0,368 mmol L^{-1}, e 0,008 a 0,372 mmol L^{-1}, respectivamente. Os limites de detecção foram de 8,0, 3,0 e 1,0 nmol L^{-1}, respectivamente para os três cátions. Moyo[141] e Moyo *et al*.[142] modificaram eletrodos de carbono vítreo para a detecção de zinco e cobre, respectivamente. Os cátions foram quantificados nas faixas lineares de concentração de 0,35 a 12 mg L^{-1} e 0,068 a 2,0 mg L^{-1}, respectivamente. Os limites de detecção foram de 7,5 µg L^{-1} e 4,2 µg L^{-1}, respectivamente.

A escolha do biorreceptor mais adequado para cada sistema depende das propriedades de cada amostra (analito a ser quantificado) e do tipo de grandeza física a ser detectada pelo transdutor.[64] Geralmente, são empregadas as enzimas peroxidase ou polifenol oxidases (tirosinase e lacase) na construção de biossensores para detecção de compostos fenólicos. Porém, a peroxidase catalisa a oxidação de uma grande quantidade de compostos fenólicos e a resposta do biossensor geralmente é superior quando comparada as outras enzimas da classe das oxirredutases, o que confere uma maior sensibilidade aos biossensores que contem essa enzima.[35] Muitos biossensores estão sendo desenvolvidos para a detecção de fenóis devido aos efeitos que esta classe de substâncias pode ocasionar no meio ambiente,[35] com vários desses compostos sendo originários de atividades agrícolas ou industriais, como agrotóxicos, detergentes e resíduos.[61] Apesar da peroxidase promover a oxidação de várias espécies químicas (como mostrado na Tabela 2), os trabalhos científicos não explicam como diferenciar o analito para qual o biossensor foi construído de uma substância qualquer que esteja na amostra e também tenha a oxidação catalisada pela peroxidase.

4.1. Eletrodo de pasta de carbono

O eletrodo de pasta de carbono foi inventado pelo professor Ralph N. Adams em 1958. Inicialmente, desejava-se obter um eletrodo alternativo ao eletrodo de gota pendente de mercúrio, para aplicações em que o mercúrio não poderia ser empregado. O autor não obteve sucesso com o eletrodo de gota pendente de carbono, mas percebeu que uma substância mais espessa, a pasta de carbono, poderia ser empregada. Assim, a primeira pasta de carbono foi feita da mistura de 1 g de grafite com 7 mL de bromofórmio. A segunda pasta empregou tetracloreto de carbono ao invés de bromofórmio.[143,144]

A pasta de carbono é constituída basicamente de dois componentes: carbono em pó (grafite) e um líquido orgânico, que serve como aglutinante e deve ser imiscível com soluções aquosas. Ambos devem possuir alta pureza. O líquido aglutinante fornece consistência à pasta de carbono e preenche os espaços entre as partículas de carbono. Por isso, deve ser quimicamente inerte, não pode ser solúvel em soluções aquosas e deve possuir baixa volatilidade. Essas características proporcionam estabilidade e um longo tempo de vida à pasta de carbono. Em casos de aplicação de alguma técnica voltamétrica, o que é comum, a substância também deve ser inativa eletroquimicamente na faixa de potencial empregada. Pode ser empregados vários líquidos para esta função, como parafina, silicone, fosfato de tricresila, epóxi, bromonaftaleno ou outros materiais de carbono.[143,145,146] Os líquidos halogenados inicialmente empregados foram sendo substituídos por outros líquidos menos tóxicos e com maior disponibilidade, como o óleo mineral comercial Nujol®, que ainda hoje é um dos mais empregados.[144]

Eletrodos de pasta de carbono vêm sendo empregados na área de eletroanalítica para a detecção de várias substâncias, incluindo farmacêuticas e biológicas,[147,148] principalmente em pesquisas de biossensores amperométricos.[146] São versáteis e como uma das principais vantagens a possibilidade de modificar o material interno do eletrodo que aumenta a sensibilidade do sensor. Para realizar este procedimento são usados agentes modificadores, como enzimas, óxidos, nanopartículas metálicas, entre outros compostos orgânicos e inorgânicos.[47] Além do baixo custo na produção do eletrodo de pasta de carbono modificado, este dispositivo permite renovar a superfície do eletrodo através de um simples polimento.[47,145,148]

A pasta de carbono vem sendo empregada para a imobilização de enzimas por aumentarem a seletividade e diminuírem o limite de detecção nas análises, uma vez que esse tipo de material permite uma transferência de elétrons eficiente entre a enzima e a superfície do eletrodo.[110,149]

Eletrodos de pasta de carbono modificados são empregados em estudos para a detecção de antibiótico,[68] pesticida,[148] cetoconazol,[147] dopamina, flavonoides,[94,131] entre outros. Para construção de biossensores de pasta de carbono, o material modificado contendo a enzima imobilizada é inserido em uma pequena seringa, sem êmbolo e sem agulha e um fio de cobre é utilizado como contato elétrico. Neste tipo de sensor, a ligação da enzima com o suporte geralmente é feita por adsorção ou empregando algum agente reticulante como o glutaraldeído, carbodiimida e epicloridrina.[64,91,94,95,97,131,133]

4.2. Eletrodos comerciais modificados

Vários tipos de eletrodos comerciais têm sido utilizados para modificação da superfície na construção de biossensores. Eletrodos de carbono vítreo costumam ser a escolha dos pesquisadores para servir como base para as modificações, devido as suas características elétricas e térmicas. Porém, não **é** incomum a utilização de eletrodos de ouro e platina. A maioria dessas modificações são realizadas por adsorção simples da enzima sobre a superfície modificada do eletrodo.[103]

A peroxidase é uma das principais enzimas empregadas na alteração superficial destes eletrodos devido ao grande número de substâncias que podem ser analisadas e ao maior sinal gerado comparado a outras enzimas oxirredutoras.[34,35] Essas modificações geralmente usam nanomateriais de carbono e de metais para aumentar a área superficial efetiva do eletrodo a ser modificado, promovendo uma melhor transferência de elétrons, resultando em um sinal amplificado. Além disso, o uso de nanomateriais possibilita na maioria das vezes o aumento da quantidade de moléculas de enzimas imobilizadas, o que melhora a intensidade do sinal gerado.[118] As modificações também tem o objetivo de ajudar a diminuir o sobrepotencial aplicado à detecção amperométrica de alguns analitos.[103]

A primeira etapa para modificar eletrodos comerciais é o pré-tratamento da superfície. Ela inicia com o polimento da superfície empregando alumina em pó ou em pasta. Então, o eletrodo é limpo em um banho ultrassônico com etanol e água.[22,24,34,59,103,139,150] A secagem pode ser feita com nitrogênio[22,24] ou por simples evaporação.[34,59,103,139] Após esse pré-tratamento, geralmente uma solução contendo o agente modificador do eletrodo é gotejada sobre ele.[22,34,59,103,139] Na maioria dos casos, esta solução contém nanopartículas ou nanotubos, que podem estar ou não com a enzima já imobilizada.[22,59,103,150] Se a enzima não estiver imobilizada, o eletrodo seco é colocado dentro de uma solução com a enzima a ser imobilizada[34,139] ou a solução com a enzima é gotejada sobre o eletrodo.[103]

Outro tipo de eletrodo comercial que pode ser modificado é o eletrodo impresso (SPE, *screen printed eletrode*). Esse modelo consiste de um pequeno módulo com três eletrodos em sua configuração mais comum (de trabalho, auxiliar e de referência). SPEs podem ser construídos com tintas de carbono, ouro, platina, prata e serem modificados com diversos. Esses sensores também podem ser produzidos em impressoras 3D pelos próprios pesquisadores em diversos *designs*, variando com a necessidade de cada projeto.[152,155] Polímeros orgânicos ou cerâmicos geralmente são empregados como base para a fabricação de SPEs,[153] que geralmente possuem dimensões aproximadas de 3 × 1 × 0,5 cm.[154] Eles são projetados para serem de uso único e necessitarem de microvolumes de amostra.[152]

SPEs ganharam popularidade devido à fácil integração com técnicas eletroanalíticas. Com um *design* simples, podem ser integrados em pequenos dispositivos de medição ou microfluídica.[152,153] Esse eletrodo possui a vantagem da não necessidade de renovações química ou física de sua superfície, geralmente realizadas naqueles de pasta de carbono ou eletrodos comerciais (eletrodo de carbono vítreo, ouro, platina) modificados.[156]

A principal forma de imobilizar a peroxidase em um SPE é gotejando a solução contendo a enzima sobre o eletrodo de trabalho com ou sem a prévia modificação superficial deste.[135,138,157-160]

Mohammad *et al.*[135] modificaram um SPE com peroxidase imobilizada em microesferas de acrílico. Os pesquisadores empregaram o biossensor construído para a determinação de capsaicina em extrato de pimenta. A faixa linear de quantificação foi de 0,75 a 24, 94 μM (R^2 = 0,992) com um limite de detecção de 0.39 μM. O método se mostrou uma boa alternativa ao método padrão empregando HPLC.

Orduz *et al.*[159] extraíram peroxidase de capim-mombaça e imobilizaram-na em um SPE, que já continha nanotubos de carbono em sua estrutura original, para a detecção do agente bacteriostático triclosan (muito empregado em cosméticos) em água de torneira. A faixa linear de quantificação foi de 20 mM a 80 mM, com um limite de detecção de 3 mM.

Na última década, milhares de artigos foram publicados sobre modificações de SPE com nanomateriais, sendo um dos principais assuntos a construção de biossensores. Ou seja, trata-se de um tema importantíssimo para aplicações práticas, sejam estas no campo da Química Analítica ou na Medicina.[151]

4.3. Biossensores de Peroxidase Complexos

Em trabalhos onde a modificação da superfície do eletrodo é mais complexa são necessárias várias etapas para a construção do biossensor. Como são os casos em que existem mais de um biorreceptor empregado na construção[103] ou mais de um agente modificador.[34,103,161]

A peroxidase também é muito empregada em arranjos complexos de imunossensores para reduzir interferências e aumentar o sinal, não sendo o biorreceptor do analito nesses casos.[103,114]

Amini e Shamsipu[34] modificaram a superfície de um eletrodo de carbono vítreo para determinação de peróxido de hidrogênio em solução aquosa na faixa linear de concentração de 0,1 a 3 nmol L^{-1}. O eletrodo foi polido e gotejada uma solução de grafeno na superfície. Em seguida, mergulhado em solução de 3-(trimetoxissilil)propilamina (TMSPA) e aplicado potencial fixo de –1,8 V por 100 segundos. Finalmente, o eletrodo modificado foi imerso em uma solução contendo peroxidade que foi imobilizada através da reação com os grupos carboxil da enzima.

Fei *et al.*[161] criaram um imunossensor eletroquímico do tipo sanduíche para a detecção das bactérias *Salmonella gallinarum* e *Salmonella pullorum*. Primeiramente, foram sintetizadas nanopartículas magnéticas de Fe_3O_4/SiO_2-SH. Paralelamente, foram sintetizadas nanopartículas de

ouro (AuNP). Soluções das duas nanopartículas foram misturadas para a formação do nanocompósito Fe_3O_4/SiO_2/AuNP (AuMNP) por adsorção. Posteriormente, soluções compostas pelos anticorpos (Ab_1) anti-*S. gallinarum* e anti-*S. Pullorum* foram misturadas com uma solução contendo AuMNP. O experimento foi seguido com a deposição de *Salmonella gallinarum* e *Salmonella pullorum* sobre o arranjo, ligados aos anticorpos Ab_1. Na próxima etapa, anticorpos (Ab_2) anti-*S. gallinarum* e anti-*S. Pullorum* marcados com peroxidase (HRP) foram imobilizados por adsorção, formando um sanduíche HRP-Ab_2/Ag/Ab_1/AuMNPs. A enzima peroxidase auxilia no incremento de sinal, através da reação com o peróxido de hidrogênio e com a tianina, ambos inseridos no meio reacional. O biossensor foi testado em amostra reais de carne de frango. A faixa analítica alcançada foi de 10^2 a 10^6 UFC mL^{-1}.

No trabalho publicado por Rashidi *et al.*,[103] um eletrodo comercial foi modificado para a construção de um biossensor amperométrico com a imobilização simultânea de colesterol oxidase (ChO), colesterol esterase (ChE) e peroxidase (HRP) para detecção de colesterol em sangue de ratos. A imobilização da peroxidase teve como objetivo diminuir interferências e aumentar o sinal devido a transferência direta de elétrons para o eletrodo. Primeiramente, foi sintetizado um composto que empregou em sua síntese os seguintes materiais: grafeno (Gr), nanotubos de carbono de paredes múltiplas (MWCNT), líquido iônico (IL) e ácido ferrocenodicarboxílico (Fr). A solução desse composto foi gotejada sobre o eletrodo polido. Nas etapas seguintes, foram adicionados a superfície do eletrodo etilenodioxipirrol, quitina, nanopartículas de ouro. Após essas etapas, o eletrodo foi imerso em uma solução de glutaraldeído, em seguida imerso em uma solução contendo ChO, ChE e HRP e as enzimas foram imobilizadas sobre o eletrodo modificado. Para cada etapa de modificação, foi realizado um estudo de espectroscopia de impedância eletroquímica a fim de comprovar que cada modificação diminui a resistência do eletrodo, aumentando o sinal gerado. O biossensor desenvolvido foi otimizado e foi possível quantificar colesterol em sangue de ratos em duas faixas lineares de concentração, de 0,1 a 25 µmol L^{-1} e de 25 a 950 µmol L^{-1}.

Liu *et al.*[162] desenvolveram um imunossensor eletroquímico do tipo sanduíche ultrassensível para a detecção quantitativa de apolipoproteína E4 humana (APOE4), um biomarcador para a doença de Alzheimer. Sobre um vidro condutor revestido de óxido de estanho e óxido de índio, foi sintetizado nanoestruturas de ouro fractal (FracAu) para a síntese de um eletrodo de trabalho. Anticorpos anti-APOE4 humanos foram imobilizados sobre a FracAu. Após esse procedimento, o eletrodo foi imerso em uma solução de AOPE4. Na última etapa, anticorpos anti-APOE4 marcados com peroxidase foram imobilizados. A enzima reagiu com hidroquinona em presença de peróxido de hidrogênio, aumentando o sinal gerado. A faixa linear do biomarcador foi de 1,0 a 10.000 ng mL^{-1}.

Kafi *et al.*[163] construíram um biossensor baseado na co-imobilização de peroxidase e quitosana em nanotubos de dióxido de titânio modificados com ouro para a detecção de peróxido de hidrogênio. Um substrato de titânio sofreu oxidação em 40 V por 8 h para a formação dos nanotubos de dióxido de titânio. O filme de ouro foi então revestido nos arranjos de nanotubos de TiO_2 por pulverização de plasma de argônio por 30 s. Na última etapa, soluções de peroxidase e de quitosana foram gotejadas no eletrodo. A presença do filme de ouro aumentou a condutividade elétrica dos arranjos de nanotubos de TiO_2 formados. A faixa linear de concentração do peróxido de hidrogênio foi de 5×10^{-6} a 4×10^{-4} mol L^{-1}.

5. Conclusões

Nas últimas décadas os aparelhos eletrônicos tiveram seus tamanhos reduzidos, o que favoreceu o mercado de biossensores como uma alternativa para as diversas análises de interesse. É esperado que esse cenário continue favorável no desenvolvimento de biossensores, principalmente na área da saúde.

Biossensores de peroxidase apresentam diversas aplicações em várias áreas, como na saúde, meio ambiente, agricultura, entre outras. Na busca de sensores com maior sensibilidade, seletividade e baixos limites de detecção observou-se o aumento no desenvolvimento de novas técnicas de imobilização da peroxidase em nanomateriais e posterior uso na construção do biossensores.

Porém, é importante ressaltar que, apesar da literatura apresentar inúmeros trabalhos sobre vários tipos de biossensores, a grande atenção dada a novos estudos não é acompanhada do desenvolvimento de protótipos, o que resulta na ausência de produtos para uso em larga escala. Um dos motivos para esse cenário pode ser justamente o fato da peroxidase catalisar a oxidação de diversas substâncias fenólicas e muitas vezes apresentar baixa seletividade para o analito de interesse. Uma forma de contornar esse problema seria fazer uma pré-purificação da amostra, com algum sistema simples, garantindo que a apenas o analito de interesse possa reagir com a enzima. Dessa forma, talvez sejam criados vários *designs* de biossensores a base de peroxidase que possam ser empregados para uso comercial. Outra alternativa, também mencionada, é o uso complementar da peroxidase em biossensores com outro biorreceptor (geralmente anticorpos), nos quais a peroxidase funciona apenas como amplificador de sinal, sendo a seletividade de responsabilidade do outro biorreceptor.

A busca por fontes alternativas de peroxidase (como o uso de extratos de vegetais) ainda não é muito explorada na construção de biossensores. Porém, os estudos desenvolvidos apontam a simplicidade e facilidade na extração de peroxidase de diversas matérias-primas, que podem ser consideradas fontes viáveis no desenvolvimento de biossensores estáveis e acessíveis economicamente. Uma vez

que o custo da atual peroxidase comercial (HRP) é alto, novas formas de comercialização dessa enzima com certeza ajudarão na busca de um produto com menos custos finais. Assim, estudos sobre a extração da peroxidase de outras fontes também seriam muito úteis no desenvolvimento de biossensores de peroxidase comerciais.

Portanto, considerando os fatores mencionados nesta breve revisão, para viabilizar o desenvolvimento de biossensores comerciais a base de peroxidase será necessário o desenvolvimento de sistemas que viabilizem uma maior seletividade da peroxidase na determinação de compostos fenólicos.

Agradecimentos

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

Referências Bibliográficas

1. Khanmohammadi, A.; Aghaiea, A.; Vahedia, E.; Qazvinia, A.; Ghaneia, M.; Afkhamib, A.; Hajianc, A.; Bagheria, H.; Electrochemical biosensors for the detection of lung cancer biomarkers: A review. *Talanta* **2020**, *206*, 120251. [CrossRef] [PubMed]
2. Poghossian, A.; Geissler, H.; Schöning, M. J.; Rapid methods and sensors for milk quality monitoring and spoilage detection. *Biosensors and Bioelectronics* **2019**, *140*, 111272. [CrossRef] [PubMed]
3. Bollella, P.; Katz, E.; Biosensors – Recent Advances and Future Challenges. *Sensors* **2020**, *20*, 6645. [CrossRef] [PubMed]
4. Balamurugan, M.; Santharaman, P.; Madasamy, T.; Rajesh, S.; Sethy, N. K. Bhargava, K.; Kotamraju, S.; Karunakaran, C.; Recent trends in electrochemical biosensors of superoxide dismutases. *Biosensors and Bioelectronics* **2018**, *116*, 89. [CrossRef] [PubMed]
5. Neves, M. M.; González-García, M. B.; Hernández-Santos, D.; Fanjul-Bolado, P.; Future trends in the market for electrochemical biosensing. *Current Opinion in Electrochemistry* **2018**, *10*, 107. [CrossRef]
6. Gattani, A.; Singh, S. V.; Agrawala, A.; Khana, M. H.; Singh, P.; Recent progress in electrochemical biosensors as point of care diagnostics in livestock health. *Analytical Biochemistry* **2019**, *579*, 25. [CrossRef] [PubMed]
7. Halilović, A.; Merdan, E.; Kovačević, Z.; Poković, L. G.; *Resumos do 8th Mediterranean Conference On Embedded Computing (MECO)*, Budva, Montenegro, 2019. [CrossRef]
8. Mahmoudpour, M.; Dolatabadid, J. E. N.; Torbati, M.; Homayouni-Rad, A.; Nanomaterials based surface plasmon resonance signal enhancement for detection of environmental pollutions. *Biosensors and Bioelectronics* **2019**, *127*, 72. [CrossRef] [PubMed]
9. Carneiro, P.; Morais, S.; Pereira, M. C.; Biosensors on the road to early diagnostic and surveillance of Alzheimer's disease. *Talanta* **2020**, *211*, 120700. [CrossRef] [PubMed]
10. Faria, H. A. M.; Zucolotto, V.; Label-free electrochemical DNA biosensor for zika virus identification. *Biosensors and Bioelectronics* **2019**, *131*, 149. [CrossRef] [PubMed]
11. Chen, Y.; Ren, R.; Pu, H.; Guo, X.; Chang, J.; Zhou, G.; Mao, S.; Kron, M.; Chen, J.; Field-Effect Transistor Biosensor for Rapid Detection of Ebola Antigen. *Scientific Reports* **2017**, *7*, 10974. [CrossRef] [PubMed]
12. Yáñez-Sedeño, P; Agüí, L.; Villalonga, R.; Pingarrón, J. M.; Biosensors in forensic analysis. A review. *Analytica Chimica Acta* **2014**, *823*, 1. [CrossRef] [PubMed]
13. Dalkiran, B.; Amperometric determination of heavy metal using an HRP inhibition biosensor based on ITO nanoparticles-ruthenium (III) hexamine trichloride composite: Central composite design optimization. *Bioelectrochemistry* **2020**, *135*, 107569. [CrossRef] [PubMed]
14. Justino, C. I. L.; Duarte, A. C.; Rocha-Santos, T. A. P.; Recent Progress in Biosensors for Environmental Monitoring: A Review. *Sensors* **2017**, *17*, 2918. [CrossRef] [PubMed]
15. Kurbanoglu, S.; Erkmen, C.; Uslu, B.; Frontiers in electrochemical enzyme based biosensors for food and drug analysis. *Trends in Analytical Chemistry* **2020**, *124*, 115809. [CrossRef]
16. Hosu, O.; Selvolini, G.; Marrazza, G.; Recent advances of immunosensors for detecting food allergens. *Current Opinion in Electrochemistry* **2018**, *10*, 149. [CrossRef]
17. Bahadir, E. B.; Sezgintürk, M. K.; Applications of commercial biosensors in clinical, food, environmental, and biothreat/biowarfare analyses. *Analytical Biochemistry* **2015**, *478*, 107. [CrossRef] [PubMed]
18. Liu, R.; Li, Z.; Huang, Z.; Li, K.; Lv, Y.; Biosensors for explosives: State of art and future trends. *Trends in Analytical Chemistry* **2019**, *118*, 123. [CrossRef]
19. Zhou, Y.; Fang, Y.; Ramasamy, R. P.; Non-Covalent Functionalization of Carbon Nanotubes for Electrochemical Biosensor Development. *Sensors* **2019**, *392*, 1. [CrossRef] [PubMed]
20. Mohankumar, P.; Ajayan, J.; Mohanraj, T.; Yasodharan, R.; Recent developments in biosensors for healthcare and biomedical applications: A review. *Measurement* **2021**, *167*, 10829. [CrossRef]
21. Bhalla, N.; Jolly, P.; Formisano, N.; Estrela, P.; Introduction to biosensors. *Essays in Biochemistry* **2016**, *60*, 1. [CrossRef]
22. Ye, Y.; Yan, W.; Liu, Y.; He, S.; Cao, X.; Xu, X.; Zheng, H.; Gunasekaran, S.; Electrochemical detection of Salmonella using an invA genosensor on polypyrrole-reduced graphene oxide modified glassy carbon electrode and AuNPs-horseradish peroxidase-streptavidin as nanotag. *Analytica Chimica Acta* **2019**, *1074*, 80. [CrossRef] [PubMed]
23. Shoute, L. C.; Anwar, A.; MacKay, S.; Abdelrasoul, G. N.; Lin, D.; Z. Yan, Z.; Nguyen, A. H.; McDermott, M. T.; Shah, M. A.; Yang, J.; Immuno-impedimetric Biosensor for Onsite Monitoring of Ascospores and Forecasting of Sclerotinia. *Scientific Reports* **2018**, *8*, 12396. [CrossRef] [PubMed]
24. Tang, M.; Zhou, Z.; Shangguana, L.; Zhao, F.; Liu, S.; Electrochemiluminescent detection of cardiac troponin I by

using soybean peroxidase labeled-antibody as signal amplifier. *Talanta* **2018**, *180*, 47. [CrossRef] [PubMed]

25. Lawrence, N. S.; Deo, R. P.; Wang, J.; Detection of homocysteine at carbon nanotube paste electrodes. *Talanta* **2004**, *63*, 443. [CrossRef] [PubMed]
26. Dai, Y.; Abbasi, K.; DePietro, M.; Butler, S.; Liu, C. C.; Advanced fabrication of biosensor on detection of Glypican-1 using S-Acetylmercaptosuccinic anhydride (SAMSA) modification of antibody. *Scientific Reports* **2018**, *8*, 1. [CrossRef] [PubMed]
27. Khan, M. Z. H.; Hasan, M. R.; Hossain, S. I.; Ahommed, M. S.; Daizy, M.; Ultrasensitive detection of pathogenic viruses with electrochemical biosensor: State of the art. *Biosensors and Bioelectronics* **2020**, *166*, 112431. [CrossRef] [PubMed]
28. Das, P.; Das, M.; Chinnadayyal, S. R.; Singha, I. M.; Goswam, P.; Recent advances on developing 3rd generation enzyme electrode for biosensor applications. *Biosensensors and Bioelectronics* **2016**, *79*, 386. [CrossRef] [PubMed]
29. Rotariu, L.; Lagarde, F.; Renault, N. J.; Bala, C.; Electrochemical biosensors for fast detection of food contaminants – trends and perspective. *Trends in Analytical Chemistry* **2016**, *79*, 80. [CrossRef]
30. Putzbach, W.; Ronkainen, N. J.; Immobilization Techniques in the Fabrication of Nanomaterial-Based Electrochemical Biosensors: A Review. *Sensors* **2013**, *13*, 4811. [CrossRef] [PubMed]
31. Çevik, E.; Senel, M.; Baykal, A.; Abasiyanik, M. F.; A novel amperometric phenol biosensor based on immobilized HRP on poly(glycidylmethacrylate)-grafted iron oxide nanoparticles for the determination of phenol derivatives. *Sensors and Actuators, B: Chemical* **2012**, *173*, 396. [CrossRef]
32. Pandey, V.; Awasthi, M.; Singh, S.; Tiwari, S.; Dwivedi, U.; A Comprehensive Review on Function and Application of Plant Peroxidases. *Biochemistry and Analytical Biochemistry* **2017**, *6*, 1. [CrossRef]
33. Bilal, M.; Rasheed, T.; Iqbal, H. M. N.; Yan, Y.; Peroxidases-assisted removal of environmentally-related hazardous pollutants with reference to the reaction mechanisms of industrial dyes. *Science of the Total Environment* **2018**, *644*, 1. [CrossRef] [PubMed]
34. Amini, N.; Shamsipur, M.; Impedimetric mechanism study of horseradish peroxidase at low and high concentrations of hydrogen peroxide based on graphene/sol-gel/horseradish peroxidase. *International Journal of Biological Macromolecules* **2019**, *123*, 677. [CrossRef] [PubMed]
35. Hernández-Cancel, G.; Suazo-Dávila, D.; Medina-Guzmán, J.; Rosado-González, M.; Díaz-Vázquez, L. M.; Griebenow, K.; Chemically glycosylation improves the stability of an amperometric horseradish peroxidase biosensor. *Analytica Chimica Acta* **2015**, *854*, 129. [CrossRef] [PubMed]
36. Juarez-Moreno, K.; Ayala, M.; Vazquez-Du, R.; Antioxidant Capacity of Poly(Ethylene Glycol) (PEG) as Protection Mechanism Against Hydrogen Peroxide Inactivation of Peroxidases. *Applied Biochemistry and Biotechnology* **2015**, *177*, 1364. [CrossRef] [PubMed]
37. Azevedo, A. M.; Martins, V. C.; Prazeres, D. M. F.; Vojinovic, V.; Cabral, J. M. S.; Fonseca, L. P.; Horseradish peroxidase: a valuable tool in biotechnology. *Biotechnology annual review* **2003**, *9*, 199. [CrossRef] [PubMed]
38. Pandey, V. P.; Rani, J.; Jaiswal, N.; Singh, S.; Awasthi, M.; Shasany, A. K.; Tiwari, S.; Dwivedi, U. N.; Chitosan immobilized novel peroxidase from Azadirachta indica: characterization and application. *International Journal of Biological Macromolecules* **2017**, *104*, 1713. [CrossRef] [PubMed]
39. Hamid, M.; Khalil-ur-Rehman.; Potential applications of peroxidases. *Food Chemistry* **2009**, *115*, 1177. [CrossRef]
40. Schmidt, T. F.; *Dissertação de Mestrado*, Universidade de São Paulo, Brasil, 2008. [Link]
41. Luo, H.; Purification and characterization of peroxidase from fresh-cut *Zizania Latifolia*. *Journal of Food Biochemistry* **2012**, *36*, 309. [CrossRef]
42. Vishwasrao, C.; Chakraborty, S.; Ananthanarayan, L.; Partial purification, characterisation and thermal inactivation kinetics of peroxidase and polyphenol oxidase isolated from *Kalipatti sapota* (*Manilkara zapota*). *Journal of the Science of Food and Agriculture* **2017**, *97*, 3568. [CrossRef] [PubMed]
43. Pandey, V.; Dwivedi, U.; Purification and characterization of peroxidase from *Leucaena leucocephala*, a tree legume. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* **2011**, *68*, 168. [CrossRef]
44. Santos, M. B.; Jacobi, S. S.; Miñarro, M. C. A.; Balsalobre, J. A. P.; Guillén, A. A.; Gorbe, M. I. F.; Kinetic characterization, thermal and pH inactivation study of peroxidase and pectin methylesterase from tomato (*Solanum betaceum*). *Food Science and Technology* **2020**, *40*, 273. [CrossRef]
45. Garg, S.; Kumar, P.; Singh, S.; Yadav, A.; Dumée, L. F.; Sharma, R. S.; Mishra, V.; Prosopis juliflora peroxidases for phenol remediation from industrial wastewater— An innovative practice for environmental sustainability. *Environmental Technology & Innovation* **2020**, *19*, 100865. [CrossRef]
46. Moussavi, G.; Haddad, F. A.; Bacterial peroxidase-mediated enhanced biodegradation and mineralization of bisphenol A in a batch bioreactor. *Chemosphere* **2019**, *222*, 549. [CrossRef] [PubMed]
47. Silva, T. M.; Santos A. R.; Caramori, S. S.; Peroxidase from green zucchini (*Cucurbita pepo* L.) immobilized on natural polymers removes phenolic compounds from water samples. *Revista Ambiente e Água* **2018**, *13*, e2226. [CrossRef]
48. Al-Dhabi, N. A.; Esmail, G. A.; Arasu, M. V.; Effective degradation of tetracycline by manganese peroxidase producing Bacillus velezensis strain Al-Dhabi 140 from Saudi Arabia using fibrous-bed reactor. *Chemosphere* **2021**, *268*, 128726. [CrossRef] [PubMed]
49. Barbosa, C.; Silveira, C. M.; Silva, D.; Brissos, V.; Hildebrandt, P.; Martins, L. O.; Todorovic, S.; Immobilized dye-decolorizing peroxidase (DyP) and directed Evolution variants for hydrogen peroxide biosensing. *Biosensensors and Bioelectronics* **2020**, *153*, 112055. [CrossRef] [PubMed]
50. Fritzke, W.; Salla, E. G.; Bagatini, M. D.; Bonadiman, B. S. R.; Skoronski, E.; Moroni, L. S.; Kempka, A. P.; Peroxidase of Cedrela fissilis leaves: Biochemical characterization and toxicity of enzymatically decolored solution of textile dye Brilliant Sky-Blue G. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology* **2020**, *24*, 101553. [CrossRef]

51. Qayyum, S.; Nasir, A.; Mian, A. H.; Rehman, S.; Qayum, S.; Siddiqui, M. F.; Kalsoom, U.; Extraction of peroxidase enzyme from different vegetables for biodetoxification of vat dyes. *Applied Nanoscience* **2020**, *10*, 5191. [CrossRef]
52. Darwesh, O. M.; Matter, I. A.; Eida, M. F.; Development of peroxidase enzyme immobilized magnetic nanoparticles for bioremediation of textile wastewater dye. *Journal of Environmental Chemical Engineering* **2019**, *7*, 1. [CrossRef]
53. Garcia, S. O.; Feltrin, A. C. P.; Garda-Buffon, J.; Zearalenone reduction by commercial peroxidase enzyme and peroxidases from soybean bran and rice bran. *Food Additives & Contaminants: Part A* **2018**, *35*, 1819. [CrossRef] [PubMed]
54. Kumar, V.; Chandra, R.; Characterisation of manganese peroxidase and laccase producing bacteria capable for degradation of sucrose glutamic acid-Maillard reaction products at different nutritional and environmental conditions. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* **2018**, *34*, 32. [CrossRef] [PubMed]
55. Jin, W.; Wang, R.; Huang, X.; Horseradish peroxidase-catalyzed oxidative polymerization of aniline in bicontinuous microemulsion stabilized by AOT/SDS. *Journal of Molecular Liquids* **2020**, *302*, 112529. [CrossRef]
56. Hu, H.; Wang, L.; Xu, B.; Wang, P.; Yuan, J.; Yu, Y.; Wang, Q.; Construction of a composite hydrogel of silk sericin via horseradish peroxidase-catalyzed graft polymerization of poly-PEGDMA. *Journal of Biomedical Materials Research* **2020**, *108B*, 2643. [CrossRef] [PubMed]
57. Li, Z.; Qiu, C.; Gao, J.; Wang, H.; Yingjuan, F.; Qin, M.; Improving lignin removal from pre-hydrolysis liquor by horseradish peroxidase-catalyzed polymerization. *Separation and Purification Technology* **2019**, *212*, 273. [CrossRef]
58. An, E. S.; Cho, D. H.; Choi, J. W.; Kim, Y. H.; Song, B. K.; Peroxidase-catalyzed copolymerization of syringaldehyde and bisphenol A. *Enzyme and Microbial Technology* **2010**, *46*, 287. [CrossRef]
59. Jiang, T.; Sun, X.; Wei, L.; Li, M.; Determination of hydrogen peroxide released from cancer cells by a Fe-Organic framework/horseradish peroxidase-modified electrode. *Analytica Chimica Acta* **2020**, *1135*, 132. [CrossRef] [PubMed]
60. Chen, H.; Luo, D.; Shang, B.; Cao, C.; Wei, J.; Chen, Q.; Chen, J.; Immunoassay-type biosensor based on magnetic nanoparticle capture and the fluorescence signal formed by horseradish peroxidase catalysis for tumor-related exosome determination. *Microchimica Acta* **2020**, *187*, 282. [CrossRef] [PubMed]
61. Neelam; Chhillar, A. K.; Rana, J. S.; Enzyme nanoparticles and their biosensing applications: A review. *Analytical Biochemistry* **2019**, *581*, 1. [CrossRef] [PubMed]
62. Wang, Q.; Wei, R.; Guo, H.; Wei, Y.; Yang, W.; A facile horseradish peroxidase electrochemical biosensor with surface molecular imprinting based on polyaniline nanotubes. *Journal of Electroanalytical Chemistry* **2018**, *817*, 184. [CrossRef]
63. Bollella, P.; Medici, L.; Tessema, M.; Poloznikov, A. A.; Hushpulian, D. M.; Tishkov, V. I.; Andreu, R.; Leech, D.; Megersa, N.; Marcaccio, M.; Gorton, L.; Antiochi, R.; Highly sensitive, stable and selective hydrogen peroxide amperometric biosensors based on peroxidases from different sources wired by Ospolymer: A comparative study. *Solid State Ionics* **2018**, *314*, 178. [CrossRef]
64. Oliveira, I. R. W. Z.; *Tese de Doutorado*, Universidade Federal de Santa Catarina, 2007. [Link]
65. Oztekin, A.; Almaz, Z.; Gerni, S.; Erel, D.; Kocak, S. M.; Sengül, M. E.; Ozdemir, H.; Purification of peroxidase enzyme from radish species in fast and high yield with affinity chromatography technique. *Journal of Chromatography B* **2019**, *1114*, 86. [CrossRef] [PubMed]
66. Mohammed, S. A.; Al-Harbi, M H.; Almulaiky, Y. Q.; Ibrahim, I. H.; Reda M. El-Shishtawy, R. M.; Immobilization of horseradish peroxidase on Fe_3O_4 magnetic nanoparticles. *Electronic Journal of Biotechnology* **2017**, *27*, 84. [CrossRef]
67. Ichi, S.; Limam, F.; Marzouki, M. N.; Garlic peroxidase immobilized into chitosan matrix suitable for biosensors applications. *Materials Science and Engineering C* **2009**, *29*, 1662. [CrossRef]
68. Ramírez, E. A.; Granero, A. M.; Zón, M. A.; Fernández, H.; Development of an Amperometric Biosensor Based on Peroxidases from Brassica napus for the Determination of Ochratoxin a Content in Peanut Samples. *Biosensors and Bioelectronics* **2011**, *S3*, 001. [CrossRef]
69. Freitas, A. A.; Francelin, M. F.; Hirata, G. F.; Clemente, E.; Schmidt, F. S.; Atividades das enzimas peroxidase (POD) e polifenoloxidase (PPO) nas uvas das cultivares benitaka e rubi e em seus sucos e geléias. *Ciência e Tecnologia de Alimentos* **2008**, *28*, 172. [CrossRef]
70. Mooltongchun, M.; Teepoo, S.; A Simple and Cost-effective Microfluidic Paper-Based Biosensor Analytical Device and its Application for Hypoxanthine Detection in Meat Samples. *Food Analytical Methods* **2019**, *12*, 2690. [CrossRef]
71. Adewale, I. O.; Adekunle, A. T.; Biochemical properties of peroxidase from white and red cultivars of kolanut (*Cola nitida*). *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology* **2018**, *14*, 1. [CrossRef]
72. Agunbiade, O. J.; Famutimi, O. G.; Kadiri, F. A.; Kolapo, O. A.; Adewale, I. O.; Studies on peroxidase from Moringa oleifera Lam leaves. *Heliyon* **2021**, *7*, e06032. [CrossRef] [PubMed]
73. Maki, Y.; Amao, Y.; Novel Optical Solid-State Glucose Sensor Tip Using Immobilized o-Dianisidine, Glucose Oxidase and Peroxidase. *Sensor Letters* **2008**, *6*, 242. [CrossRef]
74. Rani, K.; Chauhan, N.; Narang, J.; Jain, U.; Sharma, S.; A cost effective immobilization of horseradish peroxidase nanoparticles on to easy-to-prepare activated plasticized polyvinyl-chloride vial and its application. *Journal of Nanomedicine Research* **2015**, *2*, 12. [CrossRef]
75. Bhargava, A. K.; Lal, H.; Pundir, C. S.; Discrete analysis of serum uric acid with immobilized uricase and peroxidase. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* **1999**, *39*, 125. [CrossRef] [PubMed]
76. Lu, Y.; Yang, Q.; Wang, L.; Zhang, M.; Guo, W.; Cai, Z.; Wang, D.; Yang, W.; Chen, Y.; Enhanced Activity of Immobilized Horseradish Peroxidase by Carbon Nanospheres for Phenols Removal. *Clean Soil Air Water* **2017**, *45*, 1. [CrossRef]
77. Cerqueira, M. R. F.; Santos, M. S. F.; Matos, R. C.; Gutz, I. G. R.; Angnes, L.; Use of poly(methyl methacrylate)/polyethyleneimine

flow microreactors for enzyme immobilization. *Microchemical Journal* **2015**, *118*, 231. [CrossRef]

78. Jun, L. Y.; Mubarak, N. M.; Yon, L. S.; Bing, C. H.; Khalid, M.; Jagadish, P.; Abdullah, E. C.; Immobilization of Peroxidase on Functionalized MWCNTs-Buckypaper/Polyvinyl alcohol. *Nanocomposite Membrane. Scientific Reports* **2019**, *9*, 2215. [CrossRef] [PubMed]
79. Chagas, P. M. B.; Torres, J. A.; Silva, M. C.; Corrêa, A. D.; Immobilized soybean hull peroxidase for the oxidation of phenolic compounds in coffee processing wastewater. *International Journal of Biological Macromolecules* **2015**, *81*, 568. [CrossRef] [PubMed]
80. Melo, M. N.; Pereira, F. M.; Rocha, M. A.; Ribeiro, J. G.; Diz, F. M.; Monteiro, W. F.; Ligabue, R. A.; Severino, P.; Fricks, A. T.; Immobilization and characterization of horseradish peroxidase into chitosan and chitosan/PEG nanoparticles: A comparative study. *Process Biochemistry* **2020**, *98* 160. [CrossRef]
81. Centeno, D. A.; Solano, X. H.; Castillo, J. J.; A new peroxidase from leaves of guinea grass (Panicum maximum): A potential biocatalyst to build amperometric biosensors. *Bioelectrochemistry* **2017**, *116*, 33. [CrossRef] [PubMed]
82. Rathnamsamy, S.; Singh, R.; Auxilia, R.; Vedhahari, B. N.; Extraction of peroxidase from various plant sources and its biodegradation studies on phenolic compounds. *Biotechnology* **2014**, *9*, 160. [Link]
83. Deva, A. N.; Arun, C.; Arthanareeswaran, G.; Sivashanmugam, P.; Extraction of peroxidase from waste Brassica oleracea used for the treatment of aqueous phenol in synthetic waste water. *Journal of Environmental Chemical Engineering* **2014**, *2*, 1148. [CrossRef]
84. Golunski, S. M.; *Dissertação de Mestrado*, Universidade Federal da Fronteira Sul, 2015. [Link]
85. Vetal, M. D.; Rathod, V. K.; Three phase partitioning a novel technique for purification of peroxidase from orange peels (*Citrus sinenses*). *Food and bioproducts processing* **2015**, *94*, 284. [CrossRef]
86. Nouren, S.; Bhatti, H. N.; Bhatti, I. A.; Asgher, M.; Kinetic and thermal characterization of peroxidase from peels of *Citrus reticulata* var. Kinnow. *The Journal of Animal & Plant Sciences* **2013**, *23*, 430. [Link]
87. Kozan, J. V. B.; Silva, R. P.; Serrano, S. H. P.; Lima, A. W. O.; Angnes, L.; Biosensing hydrogen peroxide utilizing carbon paste electrodes containing peroxidases naturally immobilized on coconut (*Cocus nucifera L.*) fibers. *Analytica Chimica Acta* **2010**, *591*, 200. [CrossRef] [PubMed]
88. Abdel-Aty, A. M.; Hamed, M. B.; Gad, A. A. M.; El-Hakim, A. E.; Mohamed, S. A.; Ficus sycomorus latex: An efficient alternative Egyptian source for horseradish peroxidase in labeling with antibodies for immunodiagnostic kits. *Veterinary World* **2018**, *11*, 1364. [CrossRef] [PubMed]
89. Silva, M. C.; Torres, J. A.; Corrêa, A. D.; Junqueira, A. M. B.; Amorim, M. T. P.; Santos, C. D.; Obtention of plant peroxidase and its potential for the decolorization of the reactive dye Remazol Turquoise G 133%. *Water Science & Technology* **2012**, *65*, 669. [CrossRef] [PubMed]
90. Zhang, Y.; Wei, Q.; The role of nanomaterials in electroanalytical biosensors: A mini review. *Journal of Electroanalytical Chemistry* **2016**, *781*, 401. [CrossRef]
91. 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 atemoya peroxidase immobilised on modified nanoclay for glyphosate biomonitoring. *Talanta* **2012**, *98*, 130. [CrossRef] [PubMed]
92. Peroxidase from horseradish. Disponível em: <http://www.sigmaaldrich.com/BR/en/product/sigma/p8375>. Acesso em: 13 maio 2022.
93. Polesel, D. N.; Sinhorini, A. L. C.; Perone, C. A. S.; Caracterização cinética da enzima catecolase (Polifenol oxidase) em extratos brutos da polpa e da casca de berinjela (*Solanum melongena* L.). *Journal of the Health Sciences Institute* **2010**, *28*, 175. [Link]
94. 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* **2013**, *185*, 743. [CrossRef]
95. Moccelini, S. K.; Spinelli, A.; Vieira, I. C.; Biosensors based on bean sprout homogenate immobilized in chitosan microspheres and silica for determination of chlorogenic acid. *Enzyme and Microbial Technology* **2008**, *43*, 381. [CrossRef]
96. Fernandes, S. C.; Souza, F. D.; Souza, B. S.; Nome, F.; Vieira, I. C.; Gold nanoparticles dispersed in zwitterionic surfactant for peroxidase immobilization in biosensor construction. *Sensors and Actuators B: Chemical* **2012**, *173*, 483. [CrossRef]
97. Oliveira, I. R. W. Z.; Vieira, I. C.; Lupetti, K. O.; Fatibello-Filho, O.; Fávere, V. T.; Laranjeira, M. C. M.; Biosensor Based on Chitosan Biopolymer and Crude Extract of Ginger (*Zingiber officinales Rosc.*) for the Determination of Hydroquinone in Wastewater of Photographic Process. *Analytical Letters* **2004**, *37*, 3111. [CrossRef]
98. Falade, A. O.; Mabinya, L. V.; Okoh, A. I.; Nwodo, U. U.; Studies on peroxidase production and detection of *Sporotrichum* thermophile-like catalase-peroxidase gene in a Bacillus species isolated from Hogsback Forest reserve, South Africa. *Heliyon* **2019**, *5*, e03012. [CrossRef] [PubMed]
99. Asgher, M.; Iqbal, H. M. N.; Enhanced catalytic features of sol–gel immobilized MnP isolated from solid state culture of *Pleurotus ostreatus* IBL-02. *Chinese Chemical Letters* **2013**, *24*, 344. [CrossRef]
100. Zouraris, D.; Zerva, A.; Topakas, E.; Karantonis, A.; Kinetic and amperometric study of the MtPerII peroxidase isolated from the ascomycete fungus *Myceliophthora thermophila*. *Bioelectrochemistry* **2017**, *118*, 19. [CrossRef] [PubMed]
101. Souza, L. T. A.; Veríssimo, L. A. A.; Pessela, B. C.; Santoro, R. R.; Resende, R. R.; Mendes, A. A. Em Biotecnologia aplicada **à** Agro&Indústria: fundamentos e aplicações – vol. 4; Resende, R. R., eds.; Edgard Blücher Ltda: São Paulo, 2016, cap. 15.
102. Harrad, L.; Bourais, I.; Mohammadi, H.; Amine, A.; Recent Advances in Electrochemical Biosensors Based on Enzyme Inhibition for Clinical and Pharmaceutical Applications. *Sensors* **2018**, *18*, 1. [CrossRef] [PubMed]

103. Rashidi, K.; Mahmoudi, M.; Mohammadi, G.; Zangeneh, M. M.; Korani, S.; Goicoechea, H. C.; Gu, H.; Jalalvand, A. R.; Simultaneous co-immobilization of three enzymes onto a modified glassy carbon electrode to fabricate a high-performance amperometric biosensor for determination of total cholesterol. *International Journal of Biological Macromolecules* **2018**, *120*, 587. [CrossRef] [PubMed]
104. Zdarta, J.; Meyer, A. S.; Jesionowski, T.; Pinelo, M.; Developments in support materials for immobilization of oxidoreductases: A comprehensive review. *Advances in Colloid and Interface Science* **2018**, *258*, 1. [CrossRef] [PubMed]
105. Queiroz, M. L. B.; Conceição, K. C.; Melo, M. N.; Imobilização de peroxidase de raiz forte em bagaço de cana-de-açúcar. *Química Nova* **2018**, *41*, 1019. [CrossRef]
106. Farzin, M. A.; Abdoos, H.; A critical review on quantum dots: From synthesis toward applications in electrochemical biosensors for determination of disease-related biomolecules. *Talanta* **2021**, *224*, 121828. [CrossRef] [PubMed]
107. Souza, E. F.; *Dissertação de Mestrado*, Universidade Estadual do Norte Fluminense, 2012. [Link]
108. Monier, M.; Ayad, D. M.; Wei, Y.; Sarhan, A. A.; Immobilization of horseradish peroxidase on modified chitosan beads. *International Journal of Biological Macromolecules* **2010**, *46*, 324. [CrossRef] [PubMed]
109. ARIFFIN, E. Y.; MANSOR, N. N. N.; SAFITRI, E.; HENG, L. Y.; HASSAN, N. I.; A Hydrogen Peroxide Biosensor from Horseradish peroxidase Immobilization onto Acrylic Microspheres. *Sains Malaysiana* **2019**, *48*, 1409. [CrossRef]
110. 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* **2006**, *29*, 932. [CrossRef]
111. Bilal, M.; Rasheed, T.; Zhao, Y.; Iqbal, H. M. N.; Cui, J.; "Smart" chemistry and its application in peroxidase immobilization using different support materials. *International Journal of Biological Macromolecules* **2018**, *119*, 278. [CrossRef] [PubMed]
112. Xia, J.; Cao, X.; Wang, Z.; Yang, M.; Zhang, F.; Lu, B.; Li, F.; Xia, L.; Li, Y.; Xia, Y.; Molecularly imprinted electrochemical biosensor based on chitosan/ionic liquid–graphene composites modified electrode for determination of bovine serum albumin. *Sensors and Actuators B* **2016**, *225*, 305. [CrossRef]
113. Tran, T. T.; Mulchandani, A.; Carbon nanotubes and graphene nano field-effect transistor-based biosensors. *Trends in Analytical Chemistry* **2016**, *79*, 222. [CrossRef]
114. Sheikhzadeh, E.; Beni, V.; Zourob, M.; Nanomaterial application in bio/sensors for the detection of infectious diseases. *Talanta,* **2021**, *230*, 122026. [CrossRef] [PubMed]
115. Ansari, S. A.; Husain, Q.; Potential applications of enzymes immobilized on/in nano materials: A review. *Biotechnology Advances* **2012**, *30*, 512. [CrossRef] [PubMed]
116. Farzin, L.; Shamsipur, M.; Samandari, L.; Sheibani, S.; Advances in the design of nanomaterial-based electrochemical affinity and enzymatic biosensors for metabolic biomarkers: A review. *Microchimica Acta* **2018**, *185*, 276. [CrossRef] [PubMed]
117. Web of Science. Disponível em: <https://www.webofscience.com>. Acesso em: 28 dezembro 2021.
118. Wang, B.; Akiba, U.; Anzai, J.; Recent Progress in Nanomaterial-Based Electrochemical Biosensors for Cancer Biomarkers: A Review. *Molecules* **2017**, *22*, 1048. [CrossRef] [PubMed]
119. Fenzl, C.; Hirsch, T.; Baeumner, A. J.; Nanomaterials as versatile tools for signal amplification in (bio)analytical applications. *Trends in Analytical Chemistry* **2016**, *79*, 306. [CrossRef]
120. Afzali, M.; Mostafavi, A.; Shamspur, T.; Designing an Au/reduced graphene oxide modified carbon paste electrode for the electrochemical quantification of agnuside. *Sensors & Actuators: B. Chemical* **2019**, *290*, 188. [CrossRef]
121. Xiang, C.; Li, R.; Adhikari, B.; She, Z.; Li, Y.; Kraatz, H.; Sensitive electrochemical detection of *Salmonella* with chitosan–gold nanoparticles composite film. *Talanta* **2015**, *140*, 122. [CrossRef] [PubMed]
122. Wang, L.; Wu, A.; Wei, G.; Graphene-based aptasensors: from molecule–interface interactions to sensor design and biomedical diagnostics. *Analyst* **2018**, *143*, 1526. [CrossRef] [PubMed]
123. Muthurasu, A.; Ganesh, V.; Horseradish Peroxidase Enzyme Immobilized Graphene Quantum Dots as Electrochemical Biosensors. *Applied Biochemistry and Biotechnology* **2014**, *17*, 945. [CrossRef] [PubMed]
124. Liu, H.; Guo, K.; Lv, J.; Gao, Y.; Duan, C.; Deng, L.; Zhu, Z.; A novel nitrite biosensor based on the direct electrochemistry of horseradish peroxidase immobilized on porous Co_3O_4 nanosheets and reduced graphene oxide composite modified electrode. *Sensors and Actuators B* **2017**, *238*, 249. [CrossRef]
125. Liu, Y.; Liu, X.; Guo, Z.; Hu, Z.; Xue, Z.; Lu, X.; Horseradish peroxidase supported on porous graphene as a novel sensing platform for detection of hydrogen peroxide in living cells. *Biosensors and Bioelectronics* **2017**, *87*, 101. [CrossRef] [PubMed]
126. Akter, R.; Rahman, M. A.; Rhee, C. K.; Amplified Electrochemical Detection of a Cancer Biomarker by Enhanced Precipitation Using Horseradish Peroxidase Attached on Carbon Nanotubes. *Analytical Chemistry* **2012**, *84*, 6407. [CrossRef] [PubMed]
127. Fruk, L.; Rajendran, V.; Spengler, M.; Niemeyer, C. M.; Light-Induced Triggering of Peroxidase Activity Using Quantum Dots. *ChemBioChem* **2007**, *8*, 2195. [CrossRef] [PubMed]
128. Su, Y.; Zhou, X.; Long, Y.; Li, W.; Immobilization of horseradish peroxidase on amino-functionalized carbon dots for the sensitive detection of hydrogen peroxide. *Microchimica Acta* **2018**, *185*, 114. [CrossRef] [PubMed]
129. Purohit, B.; Vernekar, P. R.; Shetti, N. P.; Chandra, P.; Biosensor nanoengineering: Design, operation, and implementation for biomolecular analysis. *Sensors International 1* **2020**, *1*, 100040. [CrossRef]
130. Hai, X.; Li, Y.; Zhu, C.; Song, W.; Cao, J.; Bi, S.; DNA-based label-free electrochemical biosensors: From principles to applications. *Trends in Analytical Chemistry* **2020**, *133*, 116098. [CrossRef]
131. 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* **2013**, *182*, 264. [CrossRef]

132. Attar, A.; Cubillana-Aguilera, L.; Naranjo-Rodríguez, I.; Cisneros, J. L. H.; Palacios-Santander, J. M.; Amine, A.; Amperometric inhibition biosensors based on horseradish peroxidase and gold sononanoparticles immobilized onto different electrodes for cyanide measurements. *Bioelectrochemistry* **2015**, *101*, 84. [CrossRef] [PubMed]
133. Ghodsi, J.; Rafati, A. A.; Shoja, Y.; First report on electrocatalytic oxidation of oxytetracycline by horse radish peroxidase: Application in developing a biosensor to oxytetracycline determination. *Sensors and Actuators, B: Chemical* **2016**, *224*, 692. [CrossRef]
134. Vilian, A.T.; Giribabu, K.; Choe, S. R.; Muruganantham, R.; Lee, H.; Roh, C.; Huh, Y. S.; Han, Y.; A spick-and-span approach to the immobilization of horseradish peroxidase on Au nanospheres incorporated with a methionine/graphene biomatrix for the determination of endocrine disruptor bisphenol A. *Sensors and Actuators, B: Chemical* **2017**, *251*, 804. [CrossRef]
135. Mohammad, R.; Ahmad, M.; Heng, L. Y.; Amperometric capsaicin biosensor based on covalent immobilization of horseradish peroxidase (HRP) on acrylic microspheres for chillihotness determination. *Sensors and Actuators, B: Chemical* **2017**, *241*, 174. [CrossRef]
136. Spychalska, K.; Zajac, D.; Cabaj, J.; Electrochemical biosensor for detection of 17β-estradiol using semi-conducting polymer and horseradish peroxidase. *RSC Advances* **2020**, *10*, 9079. [CrossRef] [PubMed]
137. Xia, H.; Kitazumi, Y.; Shirai, O.; Ohta, H.; Kurihara, S.; Kano, K.; Putrescine oxidase/peroxidase-co-immobilized and mediator-less mesoporous microelectrode for diffusion-controlled steady-state amperometric detection of putrescine. *Journal of Electroanalytical Chemistry* **2017**, *804*, 128. [CrossRef]
138. Chekin, F.; Gorton, L.; Tapsobea, I.; Direct and mediated electrochemistry of peroxidase and its electrocatalysis on a variety of screen-printed carbon electrodes: amperometric hydrogen peroxide and phenols biosensor. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2015**, *407*, 439. [CrossRef] [PubMed]
139. Wu, L.; Yin, W.; Tang, K.; Li, D.; Shao, K.; Zuo, Y.; Ma, J.; Liu, J.; Han, H.; Enzymatic biosensor of horseradish peroxidase immobilized on Au-Pt nanotube/Au-graphene for the simultaneous determination of antioxidants. *Analytica Chimica Acta* **2016**, *933*, 89. [CrossRef] [PubMed]
140. Magar, H. S.; Hassan, R. Y. A.; Mulchandani, A.; Electrochemical Impedance Spectroscopy (EIS): Principles, Construction, and Biosensing Applications. *Sensors* **2021**, *21*, 6578. [CrossRef] [PubMed]
141. Moyo, M.; Horseradish Peroxidase Biosensor to Detect Zinc Ions in Aqueous Solutions. *Open Journal of Applied Biosensor* **2014**, *3*, 1. [CrossRef]
142. Moyo, M.; Okonkwo, J. O.; Agyei, N. M.; Optimization of Horseradish Peroxidase Immobilization on Glassy Carbon Electrode Based on Maize Tassel-Multiwalled Carbon Nanotubes for Sensitive Copper(II) Ion Detection. *International Journal of Electrochemical Science* **2014**, *9*, 1439. [Link]
143. Sanghavi, B. J.; Wolfbeis, O. S.; Hirsch, T.; Swami, N. S.; Nanomaterial-based electrochemical sensing of neurological drugs and neurotransmitters. *Microchimica Acta* **2015**, *182*, 1. [CrossRef] [PubMed]
144. Švancara, I.; Kalcher, K.; Walcarius, A.; Vytras, K.; *Electroanalysis with carbone paste eletrodes*, 1a. ed., CRC Press: Boca Raton, 2012.
145. Muñoz, J.; Baeza, M.; Customized Bio-functionalization of Nanocomposite Carbon Paste Electrodes for Electrochemical Sensing: A Mini Review. *Electroanalysis* **2017**, *29*, 1660. [CrossRef]
146. Silva, V. C. C.; *Dissertação de Mestrado*, Universidade Federal de Goiás, 2018. [Link]
147. Saleh, T. A.; AlAqad, K. M. M.; Rahim, A.; Electrochemical sensor for the determination of ketoconazole based on gold nanoparticles modified carbon paste electrode. *Journal of Molecular Liquids* **2018**, *256*, 39. [CrossRef]
148. **Özcan,** A.; Gürbüz, M.; **Özbal,** A.; Preparation of a double-step modified carbon paste electrode for the voltammetric determination of propham via bulk modification with fumed silica and drop-casting of maghemite-modified fumed silica nanocomposite. *Sensors and Actuators B* **2018**, *255*, 1517. [CrossRef]
149. Sassolas, A.; Blum, L.J.; Leca-Bouvier, B. D.; Immobilization strategies to develop enzymatic biosensors. *Biotechnology Advances* **2012**, *30*, 489. [CrossRef] [PubMed]
150. Liu, H.; Guo, K.; Duan, C.; Chen, X.; Zhu, Z.; A novel biosensor based on the direct electrochemistry of horseradish peroxidase immobilized in the three-dimensional flower-like Bi_2WO_6 microspheres. *Materials Science and Engineering C* **2016**, *64*, 243. [CrossRef] [PubMed]
151. Trojanowicz, M.; Impact of nanotechnology on design of advanced screen-printed electrodes for different analytical applications. *Trends in Analytical Chemistry* **2016**, *84*, 22. [CrossRef]
152. Mincu, N.; Lazar, V.; Stan, D.; Mihailescu, C. M.; Iosub, R.; Mateescu, A. L.; Screen-Printed Electrodes (SPE) for In Vitro Diagnostic Purpose. *Diagnostics* **2020**, *10*, 517. [CrossRef] [PubMed]
153. Pohanka, M.; Screen Printed Electrodes in Biosensors and Bioassays. A Review. *International Journal Of Electrochemical Science* **2020**, *15*, 11024. [CrossRef]
154. Couto, R. A. S.; Lima, J. L. F. C.; Quinaz, M. B.; Recent developments, characteristics and potential applications of screen-printed electrodes in pharmaceutical and biological analysis. *Talanta* **2016**, *146*, 801. [CrossRef] [PubMed]
155. Sun, Q.; Wang, J.; Tang, M.; Huang, L.; Zhang, Z.; Liu, C.; Lu, X.; Hunter, K. W.; Chen, G.; A New Electrochemical System Based on a Flow-Field Shaped Solid Electrode and 3D-Printed Thin-Layer Flow Cell: Detection of Pb2+ Ions by Continuous Flow Accumulation Square-Wave Anodic Stripping Voltammetry. *Analytical Chemistry* **2017**, *89*, 5024. [CrossRef] [PubMed]
156. Palenzuela, C. L. M.; Pumera, M.; (Bio)Analytical chemistry enabled by 3D printing: Sensors and biosensors. *Trends in Analytical Chemistry* **2018**, *103*, 110. [CrossRef]
157. Duarte, R. R.; Giarola, J. F.; Silva, D.N.; Saczk, A. A.; Tarley, C. R. T.; Ribeiro, E. S.; Pereira, A. C.; Development

of Electrochemical HRP-MWCNT-Based Screen-Printed Biosensor for the Determination of Phenolic Compounds in Effluent from Washing Coffee Beans. *Revista Virtual de Química* **2021**, *13*, 43. [CrossRef]

158. Uribe, P. A.; Ortiz, C. C.; Centeno, D. A.; Castillo, J. J.; Blanco, S. I.; Gutierrez, J. A.; Self-assembled Pt screen printed electrodes with a novel peroxidase *Panicum maximum* and zinc oxide nanoparticles for H2O2 detection. *Colloids and Surfaces A* **2019**, *561*, 18. [CrossRef]
159. Orduz, A. E.; Gutiérrez, J. A.; Blanco, S. I.; Castillo, J. J.; Amperometric detection of triclosan with screen-printed carbon nanotube electrodes modified with Guinea Grass (*Panicum maximum*) peroxidase. *Universitas Scientiarum* **2019**, *24*, 363. [CrossRef]
160. Xin, Y.; Fu-bing, X.; Hong-wei, L.; Feng, W.; Di-zhao, C.; Zhao-yang, W.; A novel H_2O_2 biosensor based on Fe_3O_4–Au magnetic nanoparticles coated horseradish peroxidase and graphene sheets–Nafion film modified screen-printed carbon electrode. *Electrochimica Acta* **2013**, *109*, 750. [CrossRef]
161. Fei, J.; Dou, W.; Zhao, G.; A sandwich electrochemical immunoassay for Salmonella pullorum and *Salmonella gallinarumn* based on a AuNPs/SiO_2/Fe_3O_4 adsorbing antibody and 4 channel screen printed carbon electrode electrodeposited gold nanoparticles. *RSC Advances* **2015**, *5*, 74548. [CrossRef]
162. Liu, Y.; Xu, L.; Wang, S.; Yang, W.; Wen, Y.; Zhang, X.; An ultrasensitive electrochemical immunosensor for apolipoprotein E4 based on fractal nanostructures and enzyme amplification. *Biosensors and Bioelectronics* **2015**, *71*, 396. [CrossRef] [PubMed]
163. Kafi, A.K.M.; Wu, G.; Chen, A.; A novel hydrogen peroxide biosensor based on the immobilization of horseradish peroxidase onto Au-modified titanium dioxide nanotube arrays. *Biosensors and Bioelectronics* **2008**, *24*, 566. [CrossRef] [PubMed]