



UNIVERSIDADE D
COIMBRA

João Pedro de Sousa Martins

Relatórios de Estágio e Monografia intitulada “Os desafios bioanalíticos na deteção e monitorização de peróxido de hidrogénio na sinalização redox” referentes à Unidade Estágio Curricular, sob orientação da Dra. Elisabete Alves, do Dr. Gualter Gaspar e do Professor Doutor Rui Barbosa, apresentados à Faculdade de Farmácia de Coimbra, para apreciação na prestação de provas públicas de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas.

Outubro de 2021



UNIVERSIDADE D
COIMBRA

João Pedro de Sousa Martins

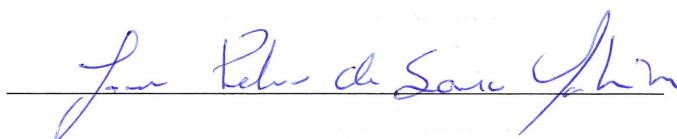
Relatórios de Estágio e Monografia intitulada “Os desafios bioanalíticos na deteção e monitorização de peróxido de hidrogénio na sinalização redox” referentes à Unidade Estágio Curricular, sob orientação da Dra. Elisabete Alves, do Dr. Gualter Gaspar e do Professor Doutor Rui Barbosa, apresentados à Faculdade de Farmácia de Coimbra, para apreciação na prestação de provas públicas de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas.

Outubro de 2021

Eu, João Pedro de Sousa Martins, estudante do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, com o n.º 2015238519, declaro assumir toda a responsabilidade pelo conteúdo do Documento Relatórios de Estágio e Monografia intitulada “Os desafios bioanalíticos na deteção e monitorização de peróxido de hidrogénio na sinalização redox” apresentados à Faculdade de Farmácia de Coimbra, no âmbito da unidade de Estágio Curricular.

Mais declaro que este Documento é um trabalho original e que toda e qualquer afirmação ou expressão, por mim utilizada, está referenciada na Bibliografia, segundo os critérios bibliográficos legalmente estabelecidos, salvaguardando sempre os Direitos de Autor, à exceção das minhas opiniões pessoais.

Coimbra, 29 de outubro de 2021.



(João Pedro de Sousa Martins)

Agradecimentos

Aos meus pais, por todo o apoio dado, não só nesta etapa académica, mas ao longo de toda a minha vida, por investirem e acreditarem nas minhas capacidades sem nunca me faltarem com nada permitindo chegar onde cheguei.

Aos meus avós e restantes familiares que sempre tiveram o desejo que chegasse o mais longe possível no meu percurso académico apoiando-me e acarinhando-me.

Aos meus amigos de sempre que me viram crescer e me acompanharam não só nesta última etapa académica, mas ao longo de todo um percurso de muitos anos juntos.

Aos amigos que a faculdade uniu e não mais irá separar.

Às pessoas que tiveram uma enorme paciência e que nunca me deixaram cair, mesmo nas situações mais difíceis, ao longo deste percurso.

À Farmácia Alves e toda a sua equipa, pela aprendizagem, pela experiência e pelas amizades que irão prevalecer.

Aos Laboratórios Basi, nomeadamente ao Diogo Reis e ao Dr. Gualter Gaspar, pelo exemplo de referência de profissionalismo, pela experiência, pela confiança dada e pelo incrível acolhimento, mostrando o que é uma definição verdadeira da palavra equipa.

Aos restantes elementos da equipa de garantia de qualidade dos Laboratórios Basi que foram fundamentais na minha integração

Ao Professor Doutor Rui Barbosa, pela disponibilidade, paciência, apoio e orientação no longuíssimo caminho de construção da monografia.

A todos os colegas, à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra e todos os seus docentes e não docentes.

A ti, Coimbra!

Índice

Parte I - Relatório de Estágio em Farmácia Comunitária

Abreviaturas.....	7
1. Introdução.....	8
2. Análise SWOT.....	9
2.1. Pontos Fortes.....	9
2.1.1. <i>Kaizen</i>	9
2.1.2. Formações.....	9
2.1.3. Equipa.....	9
2.1.4. Módulos de venda SIFARMA®.....	9
2.1.5. Serviços diferenciados.....	10
2.1.6. Localização.....	10
2.2. Pontos Fracos.....	10
2.2.1. COVID.....	10
2.2.2. Insegurança.....	10
2.3. Oportunidades.....	11
2.3.1. Aplicação de conhecimento teórico.....	11
2.3.2. Sazonalidade do estágio.....	11
2.4. Ameaças.....	11
2.4.1. Desrespeito pela profissão.....	12
2.4.2. Localização.....	12
3. Considerações Finais.....	12

Parte II - Relatório de Estágio em Indústria Farmacêutica

Abreviaturas.....	14
1. Introdução.....	15
2. Análise SWOT.....	16
2.1. Pontos Fortes.....	16
2.1.1. Equipa.....	16
2.1.2. Tarefas desempenhas.....	16
2.1.3. Formação interna.....	16
2.2. Pontos Fracos.....	17
2.2.1. Localização.....	17
2.2.2. Tarefas desempenhadas.....	17
2.3. Oportunidades.....	17
2.3.1. COVID.....	17
2.3.2. Dinâmica da empresa.....	17
2.3.3. Conhecimento geral da empresa.....	17
2.4. Ameaças.....	18
2.4.1. Duração do estágio.....	18
3. Considerações Finais.....	18

Parte III - Os desafios bioanalíticos na deteção e monitorização de peróxido de hidrogénio na sinalização redox

Abreviaturas.....	20
Resumo.....	21

Abstract.....	22
1. Introdução.....	23
2. Propriedades físico-químicas e reatividade do peróxido de hidrogénio.....	24
2.1. Agente oxidante.....	24
2.2. Reação com tióis e metais de transição.....	24
3. Peróxido de hidrogénio no corpo humano.....	25
3.1. Sinalização redox celular.....	25
3.2. <i>Oxidative eustress versus Oxidative distress</i>	25
3.3. Alvos moleculares e celulares.....	26
3.4. Defesas antioxidantes celulares contra o peróxido de hidrogénio	27
3.5 Difusibilidade, permeabilidade e compartimentalização.....	28
4. Detecção e monitorização de peróxido de hidrogénio.....	30
4.1. Métodos de deteção e quantificação.....	30
4.2. Quimioluminescência e Fluorescência.....	30
4.3. Sensores e biossensores eletroquímicos.....	34
5. Algumas aplicações dos sensores e biossensores em sistemas biológicos.....	39
6. Conclusão.....	40
7. Referências.....	42

Parte I

Relatório de Estágio em Farmácia Comunitária

Farmácia Alves

Abreviaturas

COVID-19 - Coronavirus disease 2019

FFUC - Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

MICF - Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas

SWOT - *Strenghts, Weaknesses, Opportunities, Threats*

I. Introdução

A conclusão do meu percurso no Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas (MICF) pela Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra (FFUC), pressupõe a realização de um estágio em Farmácia Comunitária. Embora este seja um dos últimos passos deste percurso de quatro anos é um dos mais importantes, pois é aqui, que podemos pôr em prática todo o conhecimento teórico absorvido e ter um primeiro contacto com a realidade da profissão.

O farmacêutico representa um dos principais rostos no que concerne á prestação de serviços de saúde bem como na sua promoção cumprindo-lhe executar todas as tarefas no que ao medicamento diz respeito. Para além disso, este tem uma posição algo singular pois consegue contribuir e pôr em prática o seu conhecimento em variadíssimas áreas, entre as quais, a administração de medicamentos, a identificação de pessoas de risco, a gestão terapêutica, a determinação de pessoas de risco ou a educação para estilos de vidas mais saudáveis.

As farmácias, pela ampla cobertura geográfica, são um dos pilares do Serviço Nacional de Saúde garantindo a acessibilidade ao medicamento da população, mas também a equidade e qualidade de prestação de cuidados de saúde a todos os cidadãos. Desta forma, o farmacêutico tem a oportunidade de ter um contacto próximo e direto com a população.

Para a realização do estágio curricular, optei pela Farmácia Alves, uma escolha que se prendeu com o facto de ali já ter realizado um estágio extracurricular de verão conhecendo já alguns elementos da equipa e o ambiente vivido na farmácia. O estágio realizou-se no período de 04/01/2020 até 30/05/2020 (com um interregno de 17/03/2020 a 06/05/2020 devido á situação pandémica). A Farmácia Alves está localizada numa freguesia (União de Freguesias de Eiras e São Paulo de Frades) do concelho Coimbra, na localidade de Lordemão que se situa na periferia da cidade acima referida. Esta farmácia é propriedade da Dra. Elisabete Alves, sendo simultaneamente a diretora técnica.

O presente relatório irá apresentar-se sob a forma de uma análise SWOT (*Strenghts, Weaknesses, Opportunities, Threats*). Esta abordagem tem como objetivo principal analisar os aspetos que se destacaram durante o período de estágio onde serão mencionados, do ponto de vista de uma avaliação interna o que, considereei como os pontos mais fortes e mais fracos, e de um ponto de vista externo, as oportunidades e as ameaças identificadas.

2. Análise SWOT

2.1. Pontos Fortes

2.1.1. Kaizen

A busca por novas estratégias que levem a empresa a obter melhores resultados é cada vez mais um foco e, por isso, são adotadas ideologias e metodologias como a filosofia *Kaizen*, a qual tem origem japonesa. O objetivo é, então, a melhoria contínua de forma sustentada, fazendo uma gestão dirigida à diminuição de custos e de desperdícios e aumento de produtividade e de rentabilidade, proporcionando uma rentabilização de recursos. Para mim enquanto estagiário, foi um ponto forte na medida em que me incentivou a participar na evolução da empresa, estabelecendo metas de venda, procurando encontrar e solucionar possíveis falhas. Existiam reuniões semanais em que estes aspetos eram abordados e debatidos.

2.1.2. Formações

No decorrer do meu estágio tive acesso a variadas formações externas, acerca de vários temas, o que aumentou e aprofundou o meu conhecimento. Considero importante, principalmente nesta área em que a ciência evolui a cada dia, permitindo a atualização da equipa. Desta forma, também conheci novos produtos, suas especificações e particularidades, relacionadas com os seus componentes. Todos estes aspetos serviram para aprimorar o meu aconselhamento farmacêutico.

2.1.3. Equipa

A equipa da Farmácia Alves é composta por três farmacêuticos e dois técnicos de farmácia. O conhecimento técnico e científico é de grande nível e sempre pronto a ser partilhado, colocando-me à vontade para qualquer esclarecimento. Além disto, o espírito de equipa e bom ambiente que se vive, foi, também, um estímulo para o meu desenvolvimento e aprendizagem.

2.1.4. Módulo de vendas SIFARMA®

Um dos pontos fortes do meu estágio foi o facto de o módulo de vendas do SIFARMA já estar integrado no sistema da farmácia. Este fator permitiu elevar a qualidade do atendimento já que é bastante intuitivo e fácil de utilizar ao contrário do que acontecia no passado.

2.1.5. Serviços diferenciados

A farmácia disponibiliza à população o serviço de medição de pressão arterial, glicémia, colesterol e triglicéridos, fazendo-o com o máximo profissionalismo e com personalizado aconselhamento farmacêutico. Muito utentes recorrem a estes serviços, tornando-se um ponto de contacto diferenciado que pude experienciar, colocando mais à vontade para um posterior atendimento ao balcão e, além disso, colocando em prática vários conhecimentos adquiridos. Assim, o tempo em privado com cada utente era utilizado para estabelecer com ele um diálogo, criar empatia, enquanto se salientavam as medidas não farmacológicas a adotar em cada situação, os cuidados e precauções a ter, esclarecer alguma questão e alertar a possíveis fatores de risco.

2.1.6. Localização

O facto de a Farmácia Alves estar localizada fora da cidade de Coimbra, leva a que as pessoas, geralmente, tenham mais tempo para um atendimento cuidado e atento, permitindo criar relações, empatia com os utentes e vice-versa. Proporciona, assim, um atendimento mais dedicado, com maior oportunidade de aprendizagem e evolução.

2.2. Pontos Fracos

2.2.1. COVID

O início da pandemia que já todos conhecemos, a COVID-19, foi um período conturbado no estágio em farmácia. Por um lado, a procura constante e desesperada de produtos como álcool, gel desinfetante, máscaras, suplementos alimentares de reforço imunitário e medicamentos, o que contribuiu para uma constante agitação e pressão no meu período de estágio, muitas vezes retirando algum tempo ao atendimento, assim como os serviços farmacêuticos personalizados que ficaram em suspenso. Por outro lado, a interrupção do estágio e incerteza relativamente à continuação do mesmo.

2.2.2. Insegurança

Ao iniciar o atendimento, surgem algumas inseguranças devido ao papel fundamental que o farmacêutico desempenha junto da população, na responsabilidade de um aconselhamento correto e assertivo, personalizado a cada utente, com as suas particularidades e características pessoais. Para além disto, a falta de prática inicial com o sistema SIFARMA, contribuiu para algum constrangimento ou demora no atendimento, com maior desconforto em pessoas menos tolerantes.

2.3. Oportunidades

2.3.1. Aplicação do conhecimento teórico

Durante o meu estágio tive a oportunidade de colocar em prática vários conhecimentos adquiridos no decorrer do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas. As situações vividas no dia a dia diferem um pouco do que aprendemos na teoria já que há uma diversidade de fatores que não são mensuráveis e o facto de estarmos a lidar com pessoas aumenta esses fatores. Desta forma, o farmacêutico tem um desafio a cada atendimento, sendo que cada doente é um doente devendo o seu atendimento ser realizado da forma mais personalizada possível.

2.3.2. Sazonalidade do estágio

Sendo a duração do estágio longa é possível que este se realize em diferentes estações do ano entre as quais Inverno, Primavera e Verão. O facto de o estudante interagir com o doente em diferentes estações proporciona-lhe alguma experiência acrescida em doenças típicas e comuns dessas mesmas. Assim, no meu estágio tendo ocorrido durante o Inverno/Primavera deu-me a oportunidade de contactar com casos práticos de doenças como a gripe ou as alergias proporcionando um aumento do meu conhecimento e experiência em casos deste género.

2.4. Ameaças

2.4.1. Desrespeito pela profissão

Apesar de o farmacêutico ser encarado de forma séria e respeitosa pela maioria da população nota-se por vezes alguma descredibilização da profissão. Há uma visão de chegar á farmácia e se adquirir a medicação ou produto de saúde e bem-estar necessário como se fosse uma prática comum e banal. Compreende-se que muitas vezes os doentes já façam a medicação e utilizem certos produtos há bastante tempo, no entanto, estes estão perante um profissional de saúde especializado pelo que o seu comportamento deveria ser um pouco diferente.

Acrescentar, que ainda existe nos dias de hoje alguma falta de educação da sociedade no que respeita á saúde já que a automedicação é uma prática comum e a tentativa de aquisição de medicamento sujeitos a receita médica sem esta uma realidade, sendo que por vezes negação do farmacêutico a esta última prática é mal-encarada pelos doentes.

2.4.2. Localização

Embora a localização já tenha sido referida como um ponto forte, ela foi também uma ameaça na medida em que não tive a oportunidade de ter experienciado o fluxo de uma farmácia localizada na cidade o que me permitiria ganhar uma maior experiência ao nível da gestão do tempo de atendimento bem como a vivência de situações mais diversificadas.

3. Considerações Finais

Este estágio curricular foi, uma experiência extremamente enriquecedora, em que pude vivenciar o dia-a-dia do trabalho numa farmácia comunitária.

A farmácia comunitária não deve ser vista como apenas um ponto de venda de medicamentos ou de produtos de bem-estar e saúde, mas também como um serviço de saúde pública acessível a qualquer pessoa. Já o farmacêutico para além do estatuto de profissional que ostenta e de todos os direitos e deveres que dispõe é também uma pessoa próxima da população que se deve mostrar disponível para “abraçar” todos os doentes.

Para além de ter colocado muitos dos conhecimentos teóricos em prática senti que cada dia que passava existia uma evolução quer devido a novas aprendizagens, novas realidades, novos casos.

Assim, como constatado através do presente relatório, os pontos fortes destacam-se perante os pontos fracos, assim como são mais as oportunidades do que as ameaças tendo sido uma experiência bastante positiva quer do nível pessoal como profissional. Por último, realçar, que tudo isto só foi possível graças a uma equipa de profissionais exemplares que me acolheram nesta última etapa de forma sensacional.

Parte II

Relatório de Estágio em Indústria Farmacêutica

Laboratórios Basi

Abreviaturas

BPF – Boas Práticas de Fabrico

CAPA – *Corrective and Preventative Actions*

CM – Controlo de Mudança

COVID-19 – Coronavirus disease 2019

FFUC – Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

MICF – Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas

OOS – *Out of Specifications*

SOP – *Standard Operating Procedures*

SWOT – *Strenghts, Weaknesses, Opportunities, Threats*

1. Introdução

Com a conclusão do meu percurso no Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas (MICF) pela Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra (FFUC), para além da realização obrigatória de um estágio em Farmácia Comunitária tive também a oportunidade de optar por um dos outros ramos farmacêuticos, uma oportunidade única para um estudante que quer presenciar várias experiências profissionais antes de entrar no mercado de trabalho.

Assim, optei pela realização de um estágio em Indústria Farmacêutica, pois embora esta área seja referenciada em várias unidades curriculares, senti que foi abordada apenas uma pequena “ponta do iceberg” deste mundo, existindo assim um enorme interesse em experienciar e contactar com o seu dia a dia.

A Indústria Farmacêutica encontra-se em crescimento contínuo sendo importante na melhoria da saúde e qualidade de vida da população não só pelo facto de produzir produtos para o tratamento e prevenção da doença, mas também pelo facto de incentivar o desenvolvimento e inovação de novas terapêuticas. O farmacêutico tem um papel de foco nesta área já que é este que assegura o conhecimento técnico-científico e o cumprimento das boas práticas de fabrico (BPF).

Posto isto, tive a oportunidade de realizar o estágio nos Laboratórios Basi no departamento de Garantia de Qualidade, na área de Qualificação de Equipamentos, Sistemas e Infraestruturas e Validação de Software, sob a orientação do Dr. Gualter Gaspar e sob tutela de Diogo Reis. Os Laboratórios Basi situam-se em Mortágua, sendo uma empresa que nos últimos anos apresentou um crescimento significativo das suas instalações devido à construção de uma nova unidade de fabrico de produtos injetáveis que veio complementar a já existente unidade de fabrico de produtos líquidos e semissólidos.

As minhas tarefas durante este estágio prenderam-se essencialmente com o acompanhamento de calibrações a equipamentos, à análise dos seus certificados bem como à sua qualificação.

O presente relatório irá apresentar-se sob a forma de uma análise SWOT (*Strengths, Weaknesses, Opportunities, Threats*). Esta abordagem tem como objetivo principal analisar os aspetos que se destacaram durante o período de estágio onde serão mencionados, do ponto de vista de uma avaliação interna o que, considerarei como os pontos mais fortes e mais fracos, e de um ponto de vista externo, as oportunidades e as ameaças identificadas.

2. Análise SWOT

2.1 Pontos Fortes

2.1.2. Equipa

Um dos pontos fortes deste estágio prendeu-se com o facto da equipa em que fui enquadrado ser multifacetada, já que esta era composta não só por farmacêuticos, mas também por profissionais de outras áreas académicas, que tentou desde o primeiro dia facilitar a minha integração bem como vontade de esclarecer qualquer dúvida não apenas nas tarefas em que desempenhei, mas também no processo geral da empresa.

Para além disso, demonstrou ser uma equipa bem organizada e estruturada com reuniões semanais que me permitiram ter contacto com outras áreas para além da que estava intimamente envolvido.

2.1.3. Tarefas desempenhadas

As tarefas desempenhadas revelaram-se um ponto importante, já que me permitiram ter contacto direto com conceitos abordados durante as aulas teóricas do meu percurso académico de forma prática. Conceitos como SOP, OOS, CAPA ou CM foram utilizados e aplicados durante o dia a dia percebendo o que na prática realmente significam.

Também o facto de ter realizado o estágio na área de Qualificação de Equipamentos, Sistemas e Infraestruturas e Validação de *Software* permitiu-me ter uma visão de como na indústria farmacêutica qualquer pormenor é relevante pois as tarefas que elaborei requeriam a máxima atenção pois a diferença de uma unidade de medida, de pressão ou até de massa faziam a diferença entre um equipamento estar calibrado ou descalibrado tendo a sua análise impacto direto no processo da empresa.

2.1.4. Formação interna

Os Laboratórios Basi proporcionaram-me formação individualizada nas tarefas que elaborei bem como acesso às normas e procedimentos da empresa que, para além de contribuírem para uma adequada integração, permitiram também aumentar o meu conhecimento e a minha experiência na área.

2.2. Pontos Fracos

2.2.1. Localização

O facto de os Laboratórios Basi se localizarem em Mortágua e de o meu local de habitação ser em Coimbra levou a que tivesse de fazer viagens longas todos os dias o que acabou por se tornar cansativo e com alguma perda de tempo a nível pessoal.

2.2.2 Tarefas desempenhas

Como a maior parte do tempo o estágio se centrou na verificação de certificados de calibração, embora existisse alguma variabilidade nas tarefas desempenhas por vezes o dia tornava-se um pouco monótono e com largos períodos a executar a mesma tarefa.

2.3. Oportunidades

2.3.1 COVID

A situação pandémica levou a que o meu estágio tenha sido realizado sem nenhum colega da faculdade. Este facto despoletou a oportunidade de criar relações pessoais e profissionais não só com a equipa em que estava inserido, mas também com os restantes trabalhadores. Assim, toda a conjuntura contribuiu para o meu crescimento pessoal e independência.

2.3.2 Dinâmica da empresa

A empresa apresenta uma dinâmica de recruta de pessoal ao nível de todas as áreas o que me fez acreditar que seria possível mediante um bom estágio conseguir entrar no mercado de trabalho via Laboratórios Basi. Apesar de este não ser o principal foco, acabou por ser uma motivação extra para a sua realização.

2.3.3 Conhecimento geral da empresa

O facto de acompanhar calibrações de equipamentos realizadas por empresas subcontratadas e de realizar, mediante acompanhamento, qualificações de equipamentos situados nas várias áreas da empresa deu-me a oportunidade de ter uma visão geral desta. Foi possível conhecer toda a empresa, desde pisos técnicos, áreas de produção, áreas de controlo de qualidade e armazém

2.4. Ameaças

2.4.1 Duração do estágio

O facto de a duração do estágio ser de apenas 3 meses limita o conhecimento que podemos atingir, já que este tempo é curto para uma assimilação total de todos os processos e tarefas sendo que o estagiário tem de entrar na dinâmica da empresa de forma rápida.

3. Considerações Finais

A experiência no estágio nos Laboratórios Basi foi, inquestionavelmente, uma experiência extremamente proveitosa e enriquecedora, nomeadamente enquanto parte final do percurso académico, já que foi o culminar de uma etapa, imediatamente anterior à entrada no mercado de trabalho. Por outro lado, foi também a concretização de um objetivo pessoal, isto é, a oportunidade de vivenciar e conhecer, na prática, o setor da indústria farmacêutica antes do final do curso.

Mais concretamente, e enquanto consequência de ter integrado o departamento de garantia de qualidade – Qualificação de Equipamentos, Sistemas e Infraestruturas e Validação de *Software* – permitiu-me ter uma visão ampla e geral de uma indústria farmacêutica, ganhar conhecimentos até aí nunca abordados bem como aprofundar outros já abordados no passado.

Ao nível pessoal e de relações humanas foi também uma experiência de salientar já que como referenciado anteriormente fui integrado numa equipa com amplo conhecimento na área que me ajudou a todos os níveis.

A concretização do estágio, confirma a importância da existência desta componente prática no plano curricular, pois é absolutamente benéfico para os estudantes a possibilidade de se experienciarem um setor adicional à Farmácia Comunitária. Por último, reforço a importância dos Laboratórios Basi que embora não tenham sido a primeira escolha se revelaram como uma enorme surpresa, superando as minhas expectativas.

Parte III

Monografia

“Os desafios bioanalíticos na deteção e monitorização de peróxido de hidrogénio na sinalização redox”

Abreviaturas

AE - elétrodo auxiliar

AuNP - nanopartícula de ouro

BZTC - cloreto de benzetônio

CL - quimioluminescência

CNT - nanotubo de carbono

CV - voltametria cíclica

DNA – ácido desoxirribonucleico

DPV - voltametria de impulso diferencial

E0' - potencial formal de redução

FCV - voltametria cíclica de varrimento rápido

GADPH - gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase

GCE - elétrodo de carbono vítreo

GO – óxido de grafeno

H₂O₂ - peróxido de hidrogénio

HIF - fator indutível por hipoxia

HRP - peroxidase de rábano

KEAPI - kelch-like ECH-associated protein I

NADPH - nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase

NIR - infravermelho próximo

NPG - ouro nanoporoso

NRF2 - nuclear factor erythroid-2 related factor 2

NW - nanofio

PB - azul da Prússia

PtNP – nanopartícula de platina

RE - elétrodo de referência

Redox - redução-oxidação

RGO - óxido de grafeno reduzido

ROS - espécies reativas de oxigénio

RP - roxo de ruténio

SPCES - elétrodo de carbono impressos em tela

SWCNT - nanotubo de carbono de parede simples

SWW - voltametria de onda quadrada

WE - elétrodo de trabalho

Resumo

O peróxido de hidrogénio é umas das espécies reativas de oxigénio com mais interesse ao nível da sinalização redox celular sendo que as suas concentrações podem desencadear diferentes respostas, existindo níveis limiares que separam o estado patológico do estado fisiológico e por conseguinte, o estado de *oxidative eustress* do estado de *oxidative distress*. Assim, é importante compreender como é que esta molécula se comporta e encontra no corpo humano por forma a realizar a sua deteção e monitorização. Atualmente, são aplicados vários métodos analíticos destacando-se os espectroscópicos (quimioluminescência e fluorescência) e os eletroanalíticos (sensores e biossensores). Os biossensores embora ainda apresentem algumas desvantagens assumem-se como um dos maiores desafios na deteção e monitorização do peróxido de hidrogénio utilizando uma molécula de reconhecimento biológico ou mediadores de transferência de eletrão tais como os hexacianoferratos, conhecidos como “peroxidases artificiais”. Estes sensores são capazes de fornecer informações sobre a dinâmica de concentração em tempo real que não é acessível com outros métodos.

Palavras-Chave: peróxido de hidrogénio, *oxidative eustress*, *oxidative distress*, quimioluminescência, fluorescência, sensor, biossensor, deteção, monitorização.

Abstract

Hydrogen peroxide is one of the most interesting reactive oxygen species in terms of cellular redox signalling and its concentrations result in different responses. Different levels of hydrogen peroxide separate the pathological state from the physiological state and, the oxidative eustress state from the oxidative distress state. Thus, it is important to understand how this molecule behaves and finds in the human body to carry out its detection and monitoring. Nowadays, several analytical methods are applied, highlighting spectroscopic (chemiluminescence and fluorescence) and electroanalytical (sensors and biosensors). Biosensors, although they still have some disadvantages, are one of the biggest in challenges in detection and monitoring of hydrogen peroxide using a biological recognition molecule or electron mediators such as hexacyanoferrate compounds known as an “artificial enzyme peroxidase”. This type of sensors can provide information regarding the real-time concentration dynamics of hydrogen peroxide, that are not accessible to other methods.

Keywords: Hydrogen peroxide, oxidative eustress, oxidative distress, chemiluminescence, fluorescence, sensor, biosensor, detection, monitoring.

I. Introdução

As designadas espécies reativas de oxigénio (ROS) são moléculas com diferentes reatividades e de grande interesse bioquímico e bioanalítico. Estas espécies químicas englobam um grupo de moléculas derivadas do oxigénio, que são formadas por redução-oxidação (redox) ou por excitação eletrónica, e que têm diferentes distribuições temporais e espaciais e uma ampla gama de concentrações intracelulares e extracelulares (Sies e Jones, 2020; Gulaboski *et al.*, 2019).

O peróxido de hidrogénio (H_2O_2) é uma das principais ROS, tendo um papel principal na regulação redox da atividade biológica (Winterbourn, 2013; Sies e Jones, 2020). Esta molécula tem sido cada vez mais reconhecida sendo um indicador do stress oxidativo, intimamente relacionado com eventos fisiológicos e patológicos, como o crescimento celular e a apoptose ou doenças inflamatórias, cancerígenas ou neurodegenerativas (Meier *et al.*, 2019; Zhang *et al.*, 2014).

Vários métodos analíticos de deteção e quantificação de H_2O_2 em organismos, tecidos e células foram sendo desenvolvidas nas últimas décadas, destacando-se a fluorescência, a quimiluminescência e os métodos eletroquímicos sendo que estes últimos demonstraram uma elevada sensibilidade, seletividade e tempo rápido de resposta (Meier *et al.*, 2019; Zhang *et al.*, 2014; Gulaboski *et al.*, 2019; Lu *et al.*, 2017).

Também para detetar o H_2O_2 foram utilizados diferentes materiais quer de origem biológica (e.x. enzimas) como de origem não biológica (e.x. derivados do carbono, metais e óxidos metálicos) (Patella *et al.*, 2017).

Desta forma torna-se claro que o H_2O_2 desempenha funções fundamentais no metabolismo sendo a compreensão do seu papel biológico bastante relevante e os métodos de deteção e monitorização um enorme desafio.

2. Propriedades físico-químicas e reatividade do peróxido do hidrogénio

2.1. Agente Oxidante

O H_2O_2 é uma espécie química oxidante com um potencial formal de redução (E^0) de 1,32 V a pH 7,0. No entanto, o H_2O_2 tem uma baixa reatividade com a maioria das moléculas biológicas, já que é necessária uma elevada energia de ativação para que isso ocorra. Embora seja um agente oxidante forte, o H_2O_2 também poderá atuar como um agente oxidante fraco quando perde um eletrão, apresentando um E^0 de 0,32 V. Neste caso, há formação do radical hidroxilo ($\cdot\text{OH}$) que é uma espécie oxidante extremamente forte cujo E^0 é de 2,31 V (Winterbourn, 2013; Y, Veronique e Hua, 2000).

Apesar do H_2O_2 ser estável em solução aquosa, a sua estabilidade é fortemente afetada na presença de iões metálicos como por exemplo o Fe^{2+} . O H_2O_2 também reage com compostos de enxofre e selénio e com centros de metais de transição (Winterbourn, 2020).

2.2. Reação com tióis e metais de transição

Como vimos anteriormente, o peróxido de hidrogénio, apesar de ser um forte oxidante, reage com relativamente poucas moléculas biológicas com exceção dos tióis (R-SH), grupo funcional do aminoácido cisteína, originando o ácido sulfénico (R-SOH), que poderá reagir com outro tiol, sob condições de oxidação moderadas e formar um dissulfeto (R-SS-R), que não sofre oxidação posterior. No entanto, das progressivas oxidações do ácido sulfénico irão resultar o ácido sulfinico (R-SO₂H) e sulfónico (R-SO₃H). Os tióis reagem mais rapidamente do que outros aminoácidos com as espécies oxidantes, e alguns dos seus produtos de oxidação podem ser reduzidos reversivelmente. Assim, os tióis ao sofrerem estas modificações químicas conseguem atuar como moléculas sinalizadoras, e como interruptores ou comutadores redox na regulação dinâmica das funções celulares (Winterbourn, 2020; Y, Veronique e Hua, 2000).

Muitos dos efeitos biologicamente prejudiciais do H_2O_2 dependem da presença de metais de transição como o ferro ou o cobre, pela clivagem da ligação O-O, originando radicais hidroxilo ou complexos metálicos ativados. A nível fisiológico, os centros contendo metais de transição podem ser quelatos de baixo peso molecular, heme peroxidases, ou outras metaloproteínas redox-ativas como proteínas sulfúricas ou ferrosas (Winterbourn, 2013).

3. Peróxido de hidrogénio no corpo humano

3.1. Sinalização redox celular

A sinalização redox celular compreende a resposta da célula a um oxidante/redutor ou a uma modificação no estado redox de um constituinte celular, sendo que esta resposta ou modificação irá originar uma cascata de efeitos com interesse biológico na célula ou a jusante desta (Sies e Jones, 2020).

Tendo em conta as propriedades físico-químicas já referidas do H_2O_2 , este torna-se um composto com bastante relevo no que diz respeito á sinalização redox, pois é capaz de servir como um mensageiro na transmissão de um sinal redox do seu local de origem para um local alvo. O H_2O_2 reage com proteínas que contêm locais sensíveis a reações redox, e que têm um papel importante na regulação de várias vias bioquímicas quer a nível enzimático quer a nível transcricional, estas proteínas são designadas de comutadores redox (Antunes e Brito, 2017; Sies, 2014).

3.2. Oxidative eustress versus Oxidative distress

Os níveis de concentração celular de H_2O_2 são mantidos em valores baixos pela ação antioxidante de sistemas enzimáticos como a catalase, a glutathione peroxidase e as peroxirredoxinas, que eliminam rápida e eficientemente o H_2O_2 (Sies e Jones, 2020; Antunes e Brito, 2017). Contudo, pequenas variações de H_2O_2 podem ser benéficas já que são relevantes em alguns processos fisiológicos tais como proliferação, migração, diferenciação celular e angiogénese. Este estado de manutenção dos níveis fisiológicos de H_2O_2 é designado de *oxidative eustress* (Sies e Jones, 2020).

No entanto, níveis excessivos de H_2O_2 em concentrações supra fisiológicas (superiores a 100 nM) levam a uma oxidação de proteínas e a respostas alteradas, bem como a danos reversíveis e irreversíveis de biomoléculas, o que poderá causar morte celular ou interrupção do crescimento com estados patológicos associados. Um estado com concentrações de H_2O_2 cima das fisiológicas é designado de *oxidative distress* (Sies e Jones, 2020). Desta forma, conforme se mostra na Figura 1 as consequências oxidativas do H_2O_2 são complexas havendo níveis limiares que separam o estado patológico do estado fisiológico (Antunes e Brito, 2017).

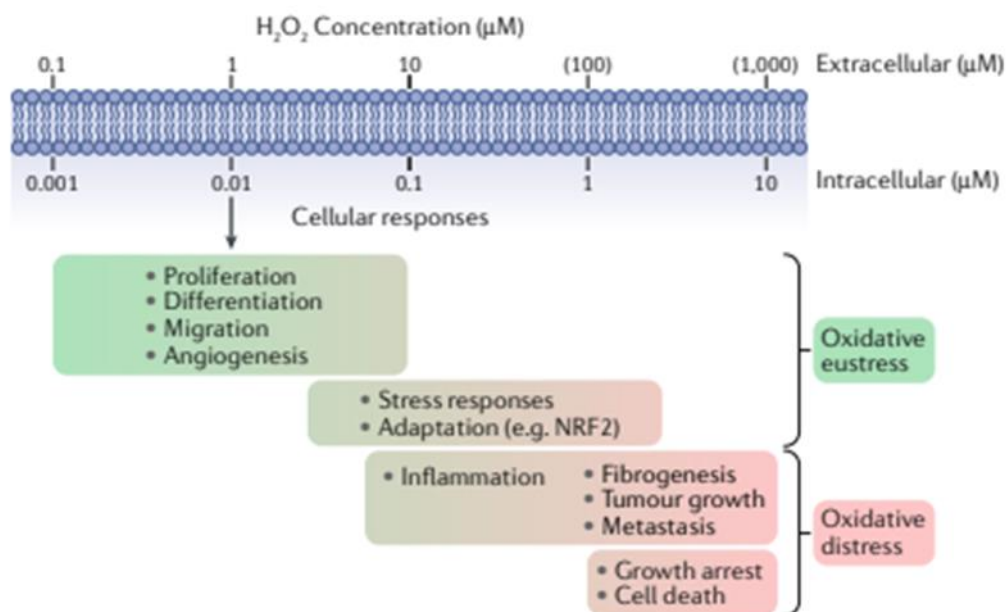


Fig.1. Concentrações de H_2O_2 e diferentes respostas celulares – a verde o *oxidative eustress* e a vermelho o *oxidative distress* separados por pequenas concentrações. (Adaptada de (Sies e Jones, 2020).

3.3. Alvos moleculares e celulares

Como já referido anteriormente, o H_2O_2 é uma importante molécula na sinalização e regulação redox já que interage com vários alvos moleculares e celulares com impacto em diversos processos biológicos, quer ao nível do controlo de uma única atividade enzimática ou ao nível transcricional (Sies e Jones, 2020; Sies, 2017).

Um dos alvos com quais o H_2O_2 interage é o sistema Nrf2-Keap1 que tem como função manter a homeostase celular no que concerne ao equilíbrio redox. Este sistema é composto pelo fator de transcrição nuclear Nrf2 e pela proteína citosólica Keap1 que contem vários resíduos de cisteína e que permite a ubiquitinação do Nrf2. Na presença de H_2O_2 , este oxida as cisteínas presentes no Keap1 havendo interferência na sua conformação, o que vai impedir a degradação do Nrf2 permitindo o aumento da sua estabilidade, e o consequente transporte para o núcleo, onde ocorre transcrição de genes que expressam proteínas antioxidantes. Desta forma, o H_2O_2 revela-se fundamental na resposta antioxidante (Sies e Jones, 2020) (Lismont e Revenco, 2019; Bellezza *et al.*, 2018). Outro exemplo também envolvido na transcrição génica, é o fator de transcrição nuclear NF- κ B. Este fator é um importante interruptor dos processos inflamatórios bem como da proliferação e apoptose celular. O H_2O_2 pode ter um papel inibidor ou estimulador conforme se encontre no citoplasma ou no núcleo. Assim, o H_2O_2 citosólico leva à dissociação do complexo NF- κ B / IB, o que permite que o fator

NF- κ B seja transportado para o núcleo e ocorra a sua transcrição. No sentido inverso, o aumento de concentração de H_2O_2 nuclear inibe a ligação do NF- κ B ao DNA, já que este contém cisteínas oxidáveis reduzindo desta forma a sua atividade transcricional (Sies e Jones, 2020; Marzo, Chisci e Giovannoni, 2018).

A hipoxia crônica intermitente demonstrou ativar a sinalização redox, contribuindo para várias respostas celulares e sistêmicas, como alterações de pressão arterial, aumento da libertação de neurotransmissores, fatores neurotróficos e alteração de desempenho cognitivo e do sono (Sies e Jones, 2020). Assim, são ativadas as vias de segundo mensageiro e reguladores de transcrição da hipoxia, como o fator induzível por hipoxia (HIF), principal regulador de respostas transcricionais à diminuição dos níveis de oxigênio. Perante uma situação de hipoxia, os oxidantes contribuem, então, para a estabilização do HIF, ajudando a estabelecer uma resposta, estando esta condição associada a um aumento da produção do radical anião superóxido e H_2O_2 (Sies e Jones, 2020).

O H_2O_2 revela-se também importante na adaptação metabólica já que interage com a gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (GADPH), uma importante enzima no processo da glicólise. O H_2O_2 reage com uma cisteína catalítica necessária para a sua afinidade ao substrato glicolítico, o gliceraldeído 3-fosfato (Sies e Jones, 2020).

Também o fator de transcrição p53 é modulado através do H_2O_2 . Este fator de transcrição é responsável por manter o equilíbrio redox celular regulando a expressão de genes antioxidantes e evitando danos no DNA nas doenças cancerígenas (Sies e Jones, 2020).

Desta forma, e consoante o alvo com que o H_2O_2 interage, este pode ter um papel relevante na expressão génica, na regulação celular (e.x. crescimento, proliferação, diferenciação, senescência e apoptose), na função mitocondrial, e nos estados patológicos de doença (Lismont e Revenco, 2019).

3.4. Defesas antioxidantes celulares contra o peróxido de hidrogénio

No que diz respeito às nossas defesas celulares contra o H_2O_2 esta espécie reativa pode ser removida por sistemas antioxidantes eficientes por via da catalase, mas também através da glutatona peroxidase e das peroxiredoxinas (Winterbourn, 2013; Sies, 2014).

Relativamente à catalase, uma proteína hémica, esta decompõe o H_2O_2 em oxigênio e água, processo que se designa de dismutação (reação catalítica). Esta reação ocorre essencialmente nos peroxissomas (sendo as exceções os eritrócitos e os neutrófilos), e tem como objetivo principal remover o H_2O_2 proveniente das oxidases peroxissómicas assim

como qualquer H_2O_2 que se difunda neste organelo. A catalase pode ainda reduzir o H_2O_2 a água oxidando compostos doadores metabólicos de hidrogénio (reação peroxidática), como por exemplo o metanol (Winterbourn, 2013; Sies, 2014; Sies e Jones, 2020).

Por sua vez, a glutatona peroxidase encontra-se em vários compartimentos celulares, e contém no seu local ativo uma seleniocisteína que reage rapidamente com H_2O_2 formando-se água (Couto, Wood e Barber, 2016; Lismont e Revenco, 2019).

Outra das formas de eliminar o H_2O_2 do organismo é através das peroxirredoxinas. Estas proteínas tiol tal e qual como a glutatona peroxidase estão presentes em vários compartimentos das células, e podem ser classificadas com base nas semelhanças a proteínas e ao mecanismo de redução da proteína oxidada como as formas típicas de 2-Cys, 2-Cys atípicas ou 1-Cys (Winterbourn, 2013; Veal, Day e Morgan, 2007). É importante realçar que tanto a glutatona peroxidase quanto as peroxirredoxinas dependem do NADPH para manter sua atividade catalítica, tornando a regeneração do NADPH uma característica crucial numa defesa antioxidante eficaz (Winterbourn, 2013).

3.5. Difusibilidade, permeabilidade e compartimentalização

A distribuição espacial de H_2O_2 nas células e tecidos não é uniforme existindo gradientes substanciais, tanto de extracelular para intercelular e entre espaços subcelulares. Também dentro dos organelos subcelulares, existem gradientes de H_2O_2 como no espaço das cristas mitocondriais (Sies, 2017). Estima-se que o H_2O_2 pode ser localizado num intervalo entre 10 a 50% do diâmetro celular em concentrações celulares normais de peroxirredoxina ou glutatona peroxidase (Winterbourn, 2013).

Apesar do H_2O_2 ser uma molécula sem carga, o seu momento dipolar é maior que o da água e, por isso, a difusão simples é mais limitada. Assim, o peróxido de hidrogénio consegue passar através das membranas celulares, embora possa ser facilitado por canais como as aquaporinas, as quais têm também por função mediar o transporte de água sob pressão osmótica. Tem sido demonstrado em vários estudos que as isoformas específicas destas proteínas, também chamadas de peroxiporinas, transportam o H_2O_2 , conforme foi verificado em vários sistemas baseados em modelos celulares (Marzo, Chisci e Giovannoni, 2018; Sies, 2017). Desta forma, a separação espacial das fontes de H_2O_2 e dos seus alvos, assim como a difusibilidade a partir do local de produção através das membranas, leva à formação de gradientes intracelulares de H_2O_2 , o que determina o comportamento dos sistemas alvo desta

espécie química reativa (Lismont e Revenco, 2019). A Figura 2 resume esquematicamente os principais alvos moleculares e moduladores chave da sua ação a nível celular.

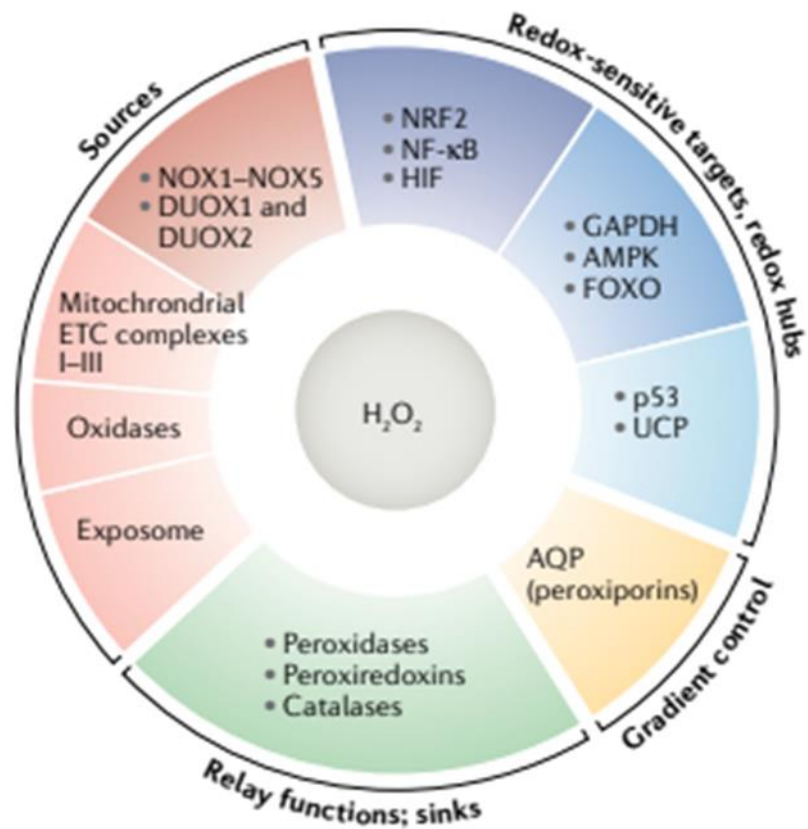


Fig. 2. Moduladores e alvos principais do H_2O_2 . A azul os principais alvos moleculares e celulares do H_2O_2 . A vermelho as principais fontes de H_2O_2 . A verde as defesas antioxidantes celulares contra o H_2O_2 . A amarelo o mecanismo de controlo do gradiente de H_2O_2 (peroxiporinas). (Adaptada de (Sies e Jones, 2020).

4. Detecção e monitorização de peróxido de hidrogénio

4.1. Métodos de deteção e quantificação

Presentemente, há uma enorme diversidade de métodos (bio)analíticos para detetar e quantificar o H_2O_2 em sistemas biológicos. Nestes métodos podemos assinalar técnicas mais convencionais como a cromatografia, a espectrofotometria, a quimioluminescência e a fluorescência e as técnicas voltamétricas/amperometrias (Pundir, Deswal e Narwal, 2018).

Nesta secção, podemos destacar a quimioluminescência (CL) e a fluorescência no que concerne aos métodos espectroscópicos, e também dar relevo aos métodos eletroanalíticos, dando especial atenção aos sensores e biosensores de transdução eletroquímica.

4.2. Quimioluminescência e Fluorescência

No que respeita á CL, e de forma resumida, trata-se de um método de deteção e quantificação para o qual conseguimos medir a concentração de H_2O_2 através da intensidade do sinal de emissão de radiação obtida por uma reação química entre o H_2O_2 e um reagente sendo necessário a utilização de um catalisador. Intervêm na reação atrás descrita vários reagentes tais como o luminol, a fluoresceína, dioxetanos, oxalato e seus derivados e corantes de acridínio sendo utilizados de acordo a sua especificidade (Meier *et al.*, 2019).

Como referido acima um dos reagentes mais utilizados nas reações de quimioluminescência é o luminol existindo uma diversidade enorme de exemplos de indicadores ou sondas em que este é utilizado. A luminescência do luminol (5-amino-2,3-dihidro-1,4-ftalazinediona) foi descrita pela primeira vez em 1928, desempenhando ainda um papel importante nos métodos analíticos modernos (Gansauge, 2003). Tanto iões metálicos como enzimas podem atuar como catalisadores na reação do luminol como na reacção com o acridínio (Sheng *et al.*, 2017).

Diversos oxidantes como o hipoclorito e o ferrocianeto de potássio geram quimioluminescência na presença de acridínio, e catalisadores como as peroxidases aumentam a intensidade de luminescência, em condições alcalinas. A diazaquinona pode também emitir luz tal como o próprio luminol (Gansauge, 2003).

Uma das enzimas, a peroxidase de rábano (HRP), tem sido amplamente utilizada para a deteção de H_2O_2 e de outros compostos por meio de reações enzimáticas acopladas. No entanto, esta enzima natural tem algumas desvantagens como o elevado custo, dificuldade de isolamento e tempo de vida útil curto (Yu *et al.*, 2016).

Uma das vias alternativas para substituir a HRP é a utilização de nanopartículas metálicas já que estas têm a capacidade de mimetizar a peroxidase e de catalisar a reação do luminol- H_2O_2 . Assim, em comparação com a HRP as nanopartículas apresentam um baixo custo e são menos vulneráveis que as enzimas, que sofrem desnaturação. No entanto, a sua atividade catalítica depende das dimensões das partículas, e a sua preparação com tamanho uniforme ainda é um grande desafio. Para além disso, a toxicidade da maioria das nanopartículas é desconhecida (Yu et al., 2016).

Um dos exemplos da utilização de nanopartículas em imagiologia de fluorescência do H_2O_2 é através de nanopartículas preparadas com ésteres de peroxalato e corantes fluorescentes (e.g. perileno, rubreno e pentaceno) que têm a capacidade de emitir fluorescência na presença de H_2O_2 in vivo com alta especificidade e sensibilidade. As nanopartículas de peroxalato detetam o H_2O_2 passando por uma reação de CL de três componentes (H_2O_2 , ésteres de peroxalato e corantes fluorescentes) (Lee et al., 2007). Desta forma, temos nanopartículas compostas por polímeros de éster de peroxalato e pelo corante que ao entrar em contacto com o H_2O_2 vai originar uma reação entre este e os ésteres de peroxalato resultando um composto intermediário de dioxetanodiona que vai excitar o corante levando à emissão de luz das nanopartículas e à obtenção de imagens. De referir ainda que as nanopartículas de peroxalato têm propriedades atrativas para imagiologia in vivo, como a emissão a comprimentos de onda entre 460-630 nm, sensibilidade ao H_2O_2 na ordem dos nanomolar, e excelente especificidade para H_2O_2 em relação a outras espécies reativas de oxigênio (Meier et al., 2019; Lee et al., 2007). Para a obtenção destas imagens foram efetuados ensaios em murganhos em que se pode observar H_2O_2 exógeno intramuscular, bem como a sua produção na cavidade peritoneal induzida por lipopolissacarídeos (Meier et al., 2019). Embora consigamos obter imagens in vivo de H_2O_2 estes ensaios apenas nos mostram imagens de H_2O_2 exógeno ou produzido de forma induzida e não um aumento da sua concentração intracelular como resultado de estímulos pró-oxidantes fisiológicos (Lee et al., 2007).

Outro dos métodos bioanalíticos utiliza nanopartículas de metais de transição já que estas possuem excelentes propriedades óticas, elétricas e químicas. Em estudos recentes foi descrita atividade catalítica de nanopartículas de Au, Cu e Ag na reação quimiluminescente do luminol. No que diz respeito às nanopartículas de Ag estas têm diversas vantagens; como uma síntese relativamente fácil, tamanhos muitos pequenos, emissão de fluorescência ajustável e baixa toxicidade, tendo sido utilizadas em conjunto com a BSA (usada como agente de proteção para a produção de nanoclusters devido à forte afinidade com sais inorgânicos) na deteção de H_2O_2 . Este ensaio revelou em condições ótimas experimentais, a deteção de H_2O_2 na gama de 0,14 μM a 100 μM com limite de deteção de 0,016 μM (Sheng et al., 2017). Assim,

a formação de um nanocluster de prata com a BSA, origina a emissão de radiação em comprimentos de onda variáveis (Meier *et al.*, 2019).

Em 2015, descobriu-se que a reação do luminol poderia ser catalisada pelo azul de iodofenol, sendo a primeira vez relatado um indicador químico com atividade catalítica na reação do luminol com o H_2O_2 . Esta descoberta foi uma consequência de estudos realizados em que o azul de iodofenol estava a ser utilizado como intensificador no sistema luminol- H_2O_2 -HRP sendo que se observou que o sinal do branco (sinal de CL na ausência de HRP) do sistema luminol- H_2O_2 -HRP-azul de iodofenol estava muito elevado, indicando que o azul de iodofenol podia catalisar a reação do luminol- H_2O_2 diretamente, mesmo na ausência de HRP. Desta forma, e com base na dependência da concentração de H_2O_2 da atividade catalítica do azul de iodofenol desenvolveu-se um método CL sensível e não enzimático para a detecção e quantificação de H_2O_2 (Yu *et al.*, 2016; Meier *et al.*, 2019).

Este método mostrou que o azul de iodofenol pode servir como catalisador para acelerar a formação de espécies de radicais oxidantes (OH^\cdot e $O_2^{\cdot-}$), e subsequente formação de 1O_2 que reage com o anião luminol para emitir luz, tendo-se desenvolvido um ensaio simples, sensível e seletivo com limite de detecção de 14 nM (Yu *et al.*, 2016). Os resultados mostraram ainda que este método aumentou a reprodutibilidade em comparação aos ensaios de nanopartículas que mimetizam a peroxidase, cujas propriedades de detecção dependem do tamanho da partícula (Meier *et al.*, 2019).

Ainda dando exemplos da utilização de catalisadores na reação luminol- H_2O_2 destaca-se a hemina e o polietilenoglicol éter metílico com limite de detecção de 1,8 nM, sendo este mais baixo que o obtido noutros métodos (Meier *et al.*, 2019).

Quanto à fluorescência, outro dos métodos utilizados, envolve a medição de um sinal de luz que é emitido por excitação com radiação. Esta excitação é provocada usualmente por uma lâmpada de Xénon (Meier *et al.*, 2019).

Nos últimos anos, a detecção de fluorescência e a respetiva imagem sofreram alguns avanços significativos estabelecendo-se como uma das técnicas bioanalíticas com maior relevância e interesse na detecção de H_2O_2 (Xu *et al.*, 2016). Vários indicadores ou sondas fluorescentes têm sido utilizadas partindo de diferentes materiais e fluoróforos como o disulfonato de naftofluoresceína, ácido homovanílico, *Escherichia coli* OxyR, nanotubos de carbono de parede simples (SWCNT) ou reagentes fluorescentes à base de fosfina (Meier *et al.*, 2019). Para além disto, algumas das sondas fluorescentes podem ser direcionadas para alvos celulares precisos, o que fornece um método poderoso e versátil para monitorizar a quantidade, o transporte e a localização de biomoléculas *in vivo* (Xu *et al.*, 2016).

Um dos exemplos foi uma sonda desenvolvida especificamente para a detecção de H_2O_2 associado à mitocôndria, a Mito- H_2O_2 . Esta sonda mostrou uma reduzida fluorescência devido ao processo de transferência de eletrão fotoinduzida (PET, e um sinal de fundo extremamente baixo, o que proporcionou uma elevada sensibilidade. A reação de Mito- H_2O_2 com H_2O_2 em condições fisiológicas causa a oxidação da fração boronato o que leva a uma alta seletividade para o H_2O_2 sobre as restantes ROS resultando numa resposta fluorescente “Turn-On” e não de quenching, que leva ao desenvolvimento de um método altamente sensível e seletivo para detetar e monitorizar a dinâmica de concentração do H_2O_2 em sistemas biológicos. De realçar que esta sonda exibiu excelentes propriedades direcionadas às mitocôndrias, e foi aplicada com sucesso para a obtenção de imagens do H_2O_2 mitocondrial em células tumorais Hela.

Em suma, esta sonda fluorescente é vista como um excelente exemplo no que diz respeito à síntese de novas moléculas fluorescentes com especificidade para organelos celulares (Xu *et al.*, 2016).

Outro exemplo de sondas fluorescentes utilizadas na detecção de H_2O_2 é o nano-sensor ratiométrico que se baseia em propriedades similares à das peroxidases de complexos de cobalto e nanotubos de carbono peroxidase-like (Qian *et al.*, 2019). O complexo Co-CNT catalisa a transformação do Amplex Red não fluorescente num derivado fluorescente, e a transformação da escopoletina fluorescente num derivado não fluorescente na presença de H_2O_2 . O sistema sensor muda de cor de amarelo para azul, o que pode ser claramente visto a olho nu. Desta forma, estamos perante um ensaio simples em termos de preparação e operação e um método de detecção simples e económico de H_2O_2 (Qian *et al.*, 2019).

Recentemente foi também criada uma sonda de fluorescência no infravermelho próximo (NIR) para detetar H_2O_2 revelando-se uma técnica eficaz para estudos de imagem *in vivo* já que tem excelente penetração ao nível dos tecidos, e baixo dano biológico e de autofluorescência. Esta sonda espectroscópica NIR off-on obteve resultados na visualização de H_2O_2 em células HepG2, e em murganhos demonstrando baixa toxicidade, elevada especificidade, sensibilidade e fotoestabilidade o que permite uma detecção e monitorização de H_2O_2 endógeno. No entanto, estas sondas com boas propriedades óticas no NIR ainda são escassas (Zhang *et al.*, 2019).

4.3. Sensores e biossensores eletroquímicos

Um sensor químico é um dispositivo que converte um estado químico, geralmente concentração, num sinal mensurável. O mecanismo envolve três etapas fundamentais: o reconhecimento da espécie química (analito alvo), o processo de transdução de sinal e o processamento do sinal.

Os biossensores são considerados como um subtipo de sensores químicos, e são definidos de como um dispositivo integrado capaz de fornecer informações analíticas quantitativas ou semi-quantitativas utilizando uma molécula de reconhecimento biológico ou bioreceptor que está em contato espacial direto com um elemento “transdutor”.

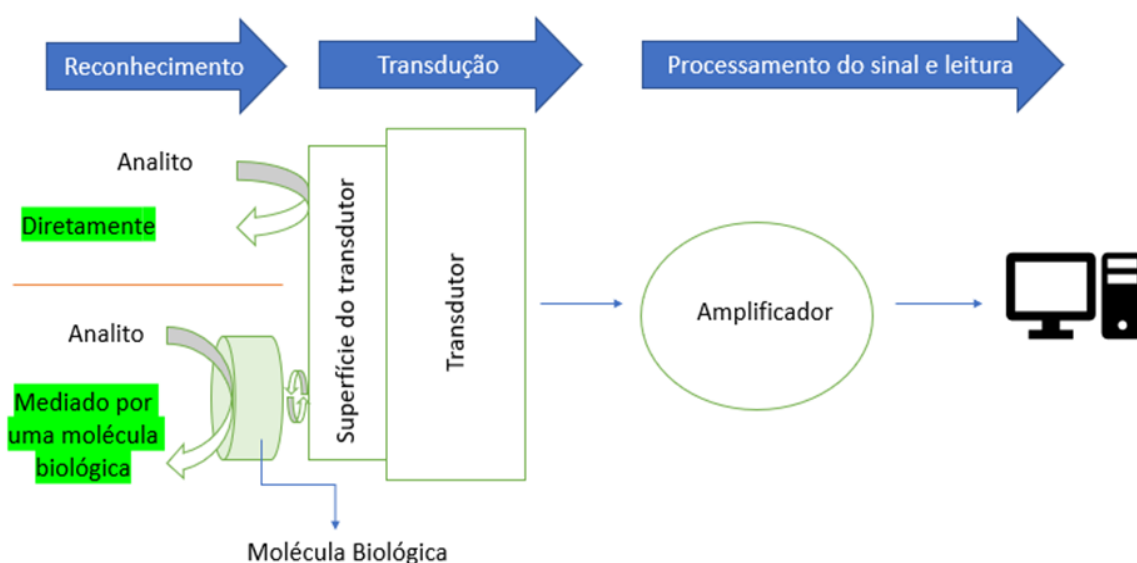


Fig. 3. Mecanismo de funcionamento dos sensores e biossensores.

Na detecção de H_2O_2 podem ser utilizados sensores ou biossensores eletroquímicos, amperométricos ou voltamétricos. Utilizam dois ou três elétrodos; um elétrodo de trabalho (WE), um elétrodo auxiliar (AE) e um elétrodo de referência (RE), medindo-se a corrente de redução ou de oxidação do H_2O_2 a um determinado potencial mantido constante ou variável obtendo-se registos da corrente em função do tempo (amperograma) ou em função do potencial (voltamograma). As alterações na corrente redox são proporcionais à concentração de H_2O_2 em solução.

Em geral, para uma determinada espécie eletroativa quer dissolvida numa solução, quer adsorvida na superfície de um elétrodo de trabalho, é medida a corrente faradaica com origem nas reações redox que acontecem na superfície de um elétrodo de trabalho. Há diferentes variante técnicas, como por exemplo a voltametria cíclica (CV), voltametria cíclica de varrimento rápido (FCV), voltametria de impulso diferencial (DPV) ou a voltametria de

onda quadrada (SWV), as quais revelam grande sensibilidade e baixos limites de detecção (Gulaboski *et al.*, 2019).

Os sensores amperométricos baseiam-se na medição de uma corrente redox a um potencial fixo aplicado ao WE. Assim, a corrente redox gerada é diretamente proporcional à concentração da espécie eletroativa em solução. Os sensores eletroquímicos de H_2O_2 podem ser construídos a partir de elétrodos metálicos sobretudo de Pt que tem uma ação catalítica na oxidação ou redução do H_2O_2 , ou ser, modificados com materiais/filmes electrocatalíticos, os quais podem ser nanopartículas metais nobres (e.g. Pt, Au ou Pd).

Os biossensores são construídos a partir de enzimas como a peroxidase de rábano e a catalase, ou ainda proteínas como hemoglobina ou mioglobina e citocromos, imobilizadas na superfície do elétrodo de trabalho, reagindo especificamente com o H_2O_2 , desta forma mediando a transferência de eletrões com o elétrodo (Hydrogen Peroxide Sensors Paper Review JEC May 2019).

Um dos métodos eletroquímicos para a medição do H_2O_2 é a detecção amperométrica por elétrodo modificado por azul da Prússia (PB) que permite aplicar potenciais mais baixo (~ 0 V vs. Ag/AgCl), evitando a detecção de vários interferentes (Puganova e Karyakin, 2005; Lu *et al.*, 2017). Estes cristais constituem um hexacianoferrato com uma estrutura de rede cúbica de face centrada, com iões férricos (Fe^{3+}) e ferrosos (Fe^{2+}) alternados na rede, coordenados para átomos de nitrogénio e carbono. Referidas como “peroxidases artificiais”, a forma reduzida deste complexo (Prussian white) é conhecida pela elevada atividade catalítica para reduzir, seletivamente e com baixo potencial o H_2O_2 (Lu *et al.*, 2017; Husmann *et al.*, 2014).

O fabrico de sensores pode exigir várias etapas que influenciam o desempenho destes pelo que é necessário desenvolver métodos que sejam rápidos, simples e reprodutíveis (Scientifica, 2014). Assim, o PB pode ser depositado com sucesso na maioria das superfícies de elétrodos à exceção da platina, por meio de vários métodos, tais como como deposição eletroquímica, deposição química in situ e *screen-printed* (Lu *et al.*, 2017).

A eletrodeposição é uma técnica rápida e bem controlada para depositar PB na superfície dos elétrodos, sendo utilizadas no fabrico de sensores modificados por PB, como veremos mais á frente. Esta técnica deverá ter em consideração diversos fatores, tais como, o material do elétrodo, a espessura, a microestrutura, o desempenho eletroquímico e o tempo de deposição (Lu *et al.*, 2017).

Outra das técnicas utilizadas para a produção de sensores modificados por PB é a impressão em tela (*screen-printed*). A *screen-printed* a jato de tinta é uma poderosa tecnologia de deposição com a capacidade de fornecer quantidades precisas de tinta em volumes de picolitros permitindo o desenvolvimento de sensores através de um método

simples, robusto e confiável que evita processos de fabrico com múltiplas etapas, sendo adequado para produção em grande escala (Scientifica, 2014).

No entanto, a estabilidade do PB é a sua grande desvantagem, já que o material é influenciado pelo pH e possui pouca estabilidade em soluções neutras ou alcalinas, ou ainda com elevadas concentrações do ião Na^+ , o que dificulta a sua aplicabilidade em biossensores, que na maioria dos casos têm a sua gama de trabalho ao pH fisiológico entre 7,0-7,4 (Husmann *et al.*, 2014; Lu *et al.*, 2017).

Uma das formas de resolver este problema é a utilização de surfactantes como o cetiltrimetilamónio (CTAB) ou o cloreto de benzetónio (BZTC), explorando a sua capacidade de se acumular na superfície ou interface entre duas fases diferentes, neste caso a interface eletrodo-solução (Salazar *et al.*, 2012). Assim, foi possível produzir sensores de H_2O_2 , baseados na eletrodeposição de azul da Prússia (PB) em eletrodos de carbono impressos em tela (SPCEs) modificados por BZTC. A concentração de BZTC foi otimizada concluindo-se que a configuração BZTC (2mM) / PB apresentava um melhor comportamento eletroquímico, com melhor cobertura de superfície e parâmetros de difusão (Salazar *et al.*, 2012).

Esta metodologia, permitiu obter uma maior sensibilidade do que em configurações anteriores baseadas em SPCEs modificados, representando também um método mais rápido e demonstrando boa estabilidade em soluções neutras. Para além disso os sensores baseados em BZTC (2mM) / PB armazenados secos e à temperatura ambiente por 4 meses, permaneceram com ~90% de sua resposta inicial ao H_2O_2 , uma propriedade útil para aplicações comerciais (Salazar *et al.*, 2012).

Ainda no que respeita á estabilidade do PB em soluções neutras, outras das metodologias que pode solucionar este problema é a preparação de nanocompósitos de PB com diferentes estruturas de nanomateriais de carbono, como nanotubos de carbono (CNTs) e grafeno. Devido às propriedades elétricas, estruturais e mecânicas destes nanomaterias é possível minimizar a limitação do pH na utilização do PB através da formação de nanocompósitos de PB/nanomaterias. Este material mostra melhor estabilidade eletroquímica e reposta ao H_2O_2 quando comparado com o PB (Husmann *et al.*, 2014).

Assim, foram produzidos eletrodos via eletrodeposição de CNTs e PB em que o PB foi depositado na superfície do eletrodo como o produto da reação entre os iões Fe^{3+} e $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ o que que melhorou várias propriedades do PB e aumentou a sua estabilidade eletroquímica. Esta elevada estabilidade eletroquímica é resultado da interação entre o PB e o CNT, isto é, como as espécies de ferro, necessárias para a formação do PB, são encontradas exclusivamente no CNT, o PB só crescerá onde essas espécies estiverem disponíveis, ou seja, nas paredes do CNT, resultando em um contato íntimo entre o PB e o CNT. Desta forma,

obtem-se um sensor de H_2O_2 com boa sensibilidade, resposta rápida e linearidade nas curvas de calibração. O sensor CNT / PB modificado também é um material de baixo custo e com pouca manutenção (Husmann *et al.*, 2014).

Outros hexacianoferratos de metal análogos ao PB foram também usados, exibindo uma boa atividade eletrocatalítica para redução de H_2O_2 e mostrando serem mais estáveis em soluções tampão neutras ou alcalinas e com um comportamento eletroquímico menos afetado pela presença de catiões em meios biológicos. Destaca-se o hexacianoferrato de rutênio, também conhecido como roxo de rutênio (RP) que, foi utilizado recentemente em microelétrodos RP de filme fino baseados em microelétrodos de fibra de carbono de baixo custo para monitorizar concentrações extracelulares de H_2O_2 no tecido cerebral (Ledo *et al.*, 2020).

Metais de transição como o Ag, o Pd, o Cu e a Pt podem atuar como locais ativos para a ação catalítica na oxidação ou redução do H_2O_2 . Assim, a sua utilização conjunta com nanoestruturas (nanofios, nanopartículas e nanotubos) aumentam a cinética da reação devido ao aumento da área ativa sendo possível, desta forma, o fabrico de sensores de H_2O_2 com um melhor desempenho (Patella *et al.*, 2017).

Um dos metais mais utilizados para a detecção eletroanalítica de H_2O_2 é a Pt, pois este metal tem sido considerado um substituto perfeito para a catalase. Para além disso, as nanopartículas de Pt (PtNPs) possuem uma grande área de superfície específica e boa estabilidade química diminuindo a sobrepotencial de oxidação / redução do H_2O_2 de maneira eficiente (Zhang *et al.*, 2014; Agrisuelas e Valero, 2017).

Por forma a aumentar a carga de Pt e obter NPs de tamanho pequeno e uniforme, nanoestruturas de carbono, grafeno, nanofios e polímeros têm sido explorados como modelos para dispersar homoganeamente PtNPs na superfície do eléctrodo (Xiao *et al.*, 2015).

Um dos nanomateriais com relevância é o grafeno. Este possui propriedades interessantes tais como alta condutividade elétrica, grande superfície específica, cinética de transferência de eletrões heterogênea rápida e biocompatibilidade. Os óxidos de grafeno (GO) ou nanofolhas de grafeno exibem uma combinação de propriedades térmicas, mecânicas e elétricas excepcionais, que são superiores a outros materiais de papel à base de carbono (Zhang *et al.*, 2014; Sun *et al.*, 2015).

Um dos exemplos da utilização do grafeno é no biossensor amperométrico de nanocompósitos de grafeno-Pt. Este biossensor constituído por GO reduzido (RGO) e PtNPs

modificados em elétrodo de carbono vítreo (GCE) por adsorção física e eletrodeposição, respetivamente, demonstra que o elétrodo modificado com nanocompósitos RGO-Pt exibiu uma alta corrente de pico e baixo potencial para a redução de H_2O_2 , tendo uma maior sensibilidade muito quando comparado com elétrodo modificado só de nanopartículas de Pt ou só de grafeno (Zhang *et al.*, 2014).

Noutro estudo foi utilizado igualmente GO reduzido (RGO) e PtNPs adicionando-se nanotubos de carbono (CNT). Assim, a incorporação de CNT em papel grafeno evita a aglomeração de nanofolhas de grafeno, melhora a condutividade elétrica e a resistência mecânica bem como o aumento da rugosidade da superfície e o fornecimento de mais locais de ligação para as PtNPs. Desta forma, o papel Pt/grafeno-CNT mostra um excelente desempenho aquando da deteção de H_2O_2 com alta sensibilidade, seletividade, estabilidade e reprodutibilidade e de forma melhorada em comparação com papel Pt / rGO (Sun *et al.*, 2015).

No entanto, elétrodos modificados com PtNPs podem ter um limite de deteção insatisfatório, uma linha de base instável e a interferência do O_2 é difícil de ser evitada, devido ao seu potencial de redução negativo. Assim, a adição de um segundo metal, como o Au, melhora o desempenho electrocatalítico e de deteção da Pt, devido às propriedades electroquímicas das AuNPs (nanopartículas de ouro). Desta forma, foi produzido um elétrodo com NPs bimetálicos de Pt-Au em GCE modificado por RGO (por método de deposição electroquímica simples) com um limite de deteção baixo e com alta seletividade, mesmo na presença de compostos coexistentes comuns como glicose, ácido ascórbico ou o oxigénio. Em suma, as nanopartículas bimetálicas comparadas com as nanopartículas monometais correspondentes possuem maior catálise, melhor resistência à desativação e maior seletividade (Yu *et al.*, 2015)

Também os metais nanoporosos têm mostrado grande interesse devido às suas propriedades únicas. Um destes casos é a utilização de ouro nanoporoso (NPG) para o fabrico de sensores de H_2O_2 (Meng *et al.*, 2011).

Um dos exemplos é a utilização de NPG em microelétrodos de NPG/PtNPs. Estes microelétrodos permitem a produção de microssensor com excelente electrocatálise para a redução de H_2O_2 e com o baixo limite de deteção. Devido ao seu tamanho geométrico ultrapequeno e alta sensibilidade, o monitoramento em tempo real da liberação de H_2O_2 de uma única célula foi obtido tornando este biossensor uma ferramenta potencialmente útil para outras aplicações fisiológicas e patológicas (Xiao *et al.*, 2015).

Outro dos metais de transição utilizados na produção de sensores de H_2O_2 é o Pd. Tendo em conta o referido, foram produzidos sensores de Pd constituídos por nanofios (NWs) depositados por reação galvânica nos poros de uma membrana. Os sensores de nanofios de Pd exibem as propriedades na deteção, pois mostram uma ampla faixa linear, baixo LOD e elevada seletividade (Patella *et al.*, 2017).

5. Algumas aplicações dos sensores e biossensores em sistemas biológicos

Como já referenciado o H_2O_2 é uma molécula que permeia a membrana plasmática e atua como uma molécula de sinalização intercelular e intracelular (Ledo *et al.*, 2020).

No cérebro, o H_2O_2 apresenta diversas funções regulando não só a atividade e o crescimento neuronal, mas também desempenhando um papel importante nos processos normais de sinalização celular. Vários estudos demonstraram também que o H_2O_2 produzido endogenamente pode modular a neurotransmissão dopaminérgica no estriado (Ledo *et al.*, 2020; Patel e Rice, 2012; Spanos *et al.*, 2013).

Assim, foram aplicadas diversas metodologias analíticas para compreensão da sua bioatividade no tecido cerebral. Uma destas metodologias foi a utilização de microelétrodos RP de filme fino baseados em microelétrodos de fibra de carbono de baixo custo (CFM) para a medição de H_2O_2 aplicado exogenamente em fatias do estriado de cérebro de rato. É de realçar que este sensor demonstrou uma boa resposta linear e alta sensibilidade permitindo a deteção de H_2O_2 em fatias de estriado a pH fisiológico até três horas (Ledo *et al.*, 2020).

Ao nível do cancro, existem também alguns estudos que descrevem que as células cancerígenas podem libertar uma quantidade substancial de H_2O_2 sendo assim relevante uma vez mais a monitorização e deteção desta molécula (Aziz *et al.*, 2019).

Deste modo, foi desenvolvido um biossensor de H_2O_2 utilizando microelétrodos de ouro nano porosos decorados com nanopartículas de platina com alta sensibilidade, tamanho geométrico ultrapequeno e como alta resolução espacial e temporal. Este sensor permitiu a monitorização em tempo real de H_2O_2 libertado por células humanas individuais de cancro da mama tornando este sensor uma ferramenta potencialmente útil para outras aplicações fisiológicas e patológicas (Xiao *et al.*, 2015).

Outro exemplo associado a células cancerígenas humanas é o biossensor composto por nano fibras bimetálicas de Au-Ag/ Co_3O_4 . Este biossensor apresenta uma boa capacidade

electrocatalítica causada pelo Au-Ag admirável e uma ótima relação superfície-volume causada pelas nanofibras de Co_3O_4 sugerindo de igual forma um futuro potencial fisiológico e patológico (Zhang *et al.*, 2018).

Foi também desenvolvido um biossensor de nanopartículas de platina decoradas com um eléctrodo de papel de grafeno-nanotubo de carbono flexível para o rastreamento em tempo real da secreção de H_2O_2 por macrófagos de células vivas. Este sensor demonstrou uma diversidade de propriedades eletroquímicas desejáveis, como a grande área de superfície eletroquímica ativa, excelente atividade electrocatalítica, alta estabilidade e uma boa flexibilidade podendo ser relevante para um desenvolvimento de unidades de sensor de alto desempenho para diversas aplicações práticas (Sun *et al.*, 2015).

6. Conclusão

Em muitos casos os alvos iniciais para H_2O_2 e as reações específicas envolvidas na sinalização são ainda mal compreendidos, existindo também incertezas sobre como as vias de sinalização redox operam em células que são ricas em defesas antioxidantes, e que podem estar gerando uma quantidade substancial de H_2O_2 como produto final metabólico (Veal, Day e Morgan, 2007). Por outro lado, o *oxidative eustress* e o *oxidative distress* é altamente dependente do contexto biológico, e precisa de ser melhor caracterizado. Assim, para usar com sucesso a modulação redox como uma estratégia terapêutica é necessário perceber o equilíbrio redox nos diferentes contextos (Sies e Jones, 2020).

No que respeita aos diversos métodos utilizados a maioria apresenta como desvantagens, o facto da duração, da complexidade e instrumentação dispendiosa. No entanto, os sensores eletroquímicos têm-se mostrado bem-sucedidos na deteção de H_2O_2 isto devido à sua sensibilidade, seletividade, resposta rápida, facilidade de uso e custo/benefício. Sendo que o progresso e a utilização da nanotecnologia assume-se com uma excelente escolha na produção de sensores para a realização de uma deteção precisa e sensível de H_2O_2 (Sies e Jones, 2020).

No entanto, o fabrico de sensores apresenta alguns inconvenientes como o facto de exigir várias etapas para a sua elaboração (sendo que cada etapa introduz variabilidade no desempenho dos sensores resultantes) e a utilização de materiais cuja biocompatibilidade não é conhecida. Outro problema que os sensores de H_2O_2 ainda enfrentam são a seletividade e ampla faixa linear de determinação sendo que, dentro dos ambientes biológicos a glicose, o

ácido úrico, o ácido ascórbico e a dopamina atuam como interferentes anódicos e o oxigênio endógeno como interferente catódico coexistindo com H_2O_2 (Sies e Jones, 2020; Veal, Day e Morgan, 2007).

7.Referências

AGRISUELAS, Jerónimo; VALERO, Edelmira - Sensors and Actuators B : Chemical Hydrogen peroxide sensor based on in situ grown Pt nanoparticles from waste screen-printed electrodes. **Sensors & Actuators: B. Chemical**. . ISSN 0925-4005. 249:2017) 499-505. doi: 10.1016/j.snb.2017.04.136.

ANTUNES, Fernando; BRITO, Paula Matos - Quantitative biology of hydrogen peroxide signaling. **Redox Biology**. . ISSN 22132317. 13:March (2017) 1-7. doi: 10.1016/j.redox.2017.04.039.

AZIZ, Ayesha *et al.* - Advancements in electrochemical sensing of hydrogen peroxide, glucose and dopamine by using 2D nanoarchitectures of layered double hydroxides or metal dichalcogenides. A review. **Microchimica Acta**. . ISSN 14365073. 186:10 (2019). doi: 10.1007/s00604-019-3776-z.

BELLEZZA, Ilaria *et al.* - BBA - Molecular Cell Research Nrf2-Keap1 signaling in oxidative and reductive stress. **BBA - Molecular Cell Research**. . ISSN 0167-4889. 1865:5 (2018) 721-733. doi: 10.1016/j.bbamcr.2018.02.010.

COUTO, Narciso; WOOD, Jennifer; BARBER, Jill - The role of glutathione reductase and related enzymes on cellular redox homeostasis network. **Free Radical Biology and Medicine**. . ISSN 18734596. 95:2016) 27-42. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2016.02.028.

GANSAUGE, F. - **Pr oo fs**. ISBN 9781612097732.

GULABOSKI, Rubin *et al.* - Review—Quantification of Hydrogen Peroxide by Electrochemical Methods and Electron Spin Resonance Spectroscopy. **Journal of The Electrochemical Society**. . ISSN 0013-4651. 166:8 (2019) G82-G101. doi: 10.1149/2.1061908jes.

HUSMANN, Samantha *et al.* - Sensors and Actuators B : Chemical Carbon nanotube / Prussian blue paste electrodes : Characterization and study of key parameters for application as sensors for determination of low concentration of hydrogen peroxide. 192:2014) 782-790.

LEDO, Ana *et al.* - Sensors and Actuators B : Chemical Enhanced selectivity and stability of ruthenium purple-modified carbon fiber microelectrodes for detection of hydrogen peroxide in brain tissue. **Sensors & Actuators: B. Chemical**. . ISSN 0925-4005. 311:January (2020) 127899. doi: 10.1016/j.snb.2020.127899.

LEE, Dongwon *et al.* - *In vivo* imaging of hydrogen peroxide with chemiluminescent

nanoparticles. **Nature Materials**. . ISSN 14764660. 6:10 (2007) 765-769. doi: 10.1038/nmat1983.

LISMONT, Célien; REVENCO, Iulia - Peroxisomal Hydrogen Peroxide Metabolism and Signaling in Health and Disease. 1:2019).

LU, Si Yuan *et al.* - Hydrogen peroxide sensor based on electrodeposited Prussian blue film. **Journal of Applied Electrochemistry**. . ISSN 15728838. 47:11 (2017) 1261-1271. doi: 10.1007/s10800-017-1113-y.

MARZO, Noemi Di; CHISCI, Elisa; GIOVANNONI, Roberto - The Role of Hydrogen Peroxide in Redox-Dependent Signaling: Homeostatic and Pathological Responses in Mammalian Cells. 2018). doi: 10.3390/cells7100156.

MEIER, Jakob *et al.* - Hydrogen peroxide sensors for biomedical applications. **Chemosensors**. . ISSN 22279040. 7:4 (2019). doi: 10.3390/chemosensors7040064.

MENG, Fanhui *et al.* - *Electrochimica Acta* Nanoporous gold as non-enzymatic sensor for hydrogen peroxide. 56:2011) 4657-4662. doi: 10.1016/j.electacta.2011.02.105.

PATEL, Jyoti C.; RICE, Margaret E. - Classification of H₂O₂ as a neuromodulator that regulates striatal dopamine release on a subsecond time scale. **ACS Chemical Neuroscience**. . ISSN 19487193. 3:12 (2012) 991-1001. doi: 10.1021/cn300130b.

PATELLA, Bernardo *et al.* - A nanostructured sensor of hydrogen peroxide. **Sensors and Actuators, B: Chemical**. . ISSN 09254005. 245:2017) 44-54. doi: 10.1016/j.snb.2017.01.106.

PUGANOVA, E. A.; KARYAKIN, A. A. - New materials based on nanostructured Prussian blue for development of hydrogen peroxide sensors. 109:2005) 167-170. doi: 10.1016/j.snb.2005.03.094.

PUNDIR, Chandra S.; DESWAL, Ritu; NARWAL, Vinay - Quantitative analysis of hydrogen peroxide with special emphasis on biosensors. **Bioprocess and Biosystems Engineering**. . ISSN 16157605. 41:3 (2018) 313-329. doi: 10.1007/s00449-017-1878-8.

QIAN, Pengcheng *et al.* - A hierarchical cobalt/carbon nanotube hybrid nanocomplex-based ratiometric fluorescent nanosensor for ultrasensitive detection of hydrogen peroxide and glucose in human serum. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**. . ISSN 16182650. 411:8 (2019) 1517-1524. doi: 10.1007/s00216-019-01573-z.

SALAZAR, P. *et al.* - Improvement and characterization of surfactant-modified Prussian blue screen-printed carbon electrodes for selective H₂O₂ detection at low applied potentials.

674:2012) 48-56. doi: 10.1016/j.jelechem.2012.04.005.

SCIENTIFICA, Ricerca - Development of a Hydrogen Peroxide Sensor Based on Screen-Printed Electrodes Modified with Inkjet-Printed Prussian Blue Nanoparticles. 2014) 14222-14234. doi: 10.3390/s140814222.

SHENG, Yingying *et al.* - Silver nanoclusters-catalyzed luminol chemiluminescence for hydrogen peroxide and uric acid detection. **Talanta**. . ISSN 00399140. 166:December 2016 (2017) 268-274. doi: 10.1016/j.talanta.2017.01.066.

SIES, Helmut - Role of metabolic H₂O₂ generation: Redox signaling and oxidative stress. **Journal of Biological Chemistry**. . ISSN 1083351X. 289:13 (2014) 8735-8741. doi: 10.1074/jbc.R113.544635.

SIES, Helmut - Redox Biology Hydrogen peroxide as a central redox signaling molecule in physiological oxidative stress: Oxidative eustress ☆. **Redox Biology**. . ISSN 2213-2317. 11:November 2016 (2017) 613-619. doi: 10.1016/j.redox.2016.12.035.

SIES, Helmut; JONES, Dean P. - Reactive oxygen species (ROS) as pleiotropic physiological signalling agents. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**. . ISSN 1471-0072. 2020). doi: 10.1038/s41580-020-0230-3.

SPANOS, Marina *et al.* - Quantitation of hydrogen peroxide fluctuations and their modulation of dopamine dynamics in the rat dorsal striatum using fast-scan cyclic voltammetry. **ACS Chemical Neuroscience**. . ISSN 19487193. 4:5 (2013) 782-789. doi: 10.1021/cn4000499.

SUN, Yimin *et al.* - Biosensors and Bioelectronics Real-time electrochemical detection of hydrogen peroxide secretion in live cells by Pt nanoparticles decorated graphene - carbon nanotube hybrid paper electrode. **Biosensors and Bioelectronic**. . ISSN 0956-5663. 68:2015) 358-364. doi: 10.1016/j.bios.2015.01.017.

SUN, Yimin *et al.* - Real-time electrochemical detection of hydrogen peroxide secretion in live cells by Pt nanoparticles decorated graphene-carbon nanotube hybrid paper electrode. **Biosensors and Bioelectronics**. . ISSN 18734235. 68:2015) 358-364. doi: 10.1016/j.bios.2015.01.017.

VEAL, Elizabeth A.; DAY, Alison M.; MORGAN, Brian A. - Hydrogen Peroxide Sensing and Signaling. **Molecular Cell**. . ISSN 10972765. 26:1 (2007) 1-14. doi: 10.1016/j.molcel.2007.03.016.

WINTERBOURN, Christine C. - **The biological chemistry of hydrogen peroxide** [Em

linha]. 1. ed. [S.l.] : Elsevier Inc., 2013 doi.org/10.1016/B978-0-12-405881-1.00001-X>. ISBN 9780124058811.

WINTERBOURN, Christine C. - Hydrogen peroxide reactivity and specificity in thiol-based cell signalling. May (2020) 745-754.

XIAO, Chong *et al.* - Real-time monitoring of H₂O₂ release from single decorated with platinum nanoparticles †. **Analyst.** . ISSN 0003-2654. 2015) 3-8. doi: 10.1039/c4an02056a.

XU, Jian *et al.* - Mitochondria-Targeted Fluorescent Probe for Imaging Hydrogen Peroxide in Living Cells. **Analytical Chemistry.** . ISSN 15206882. 88:2 (2016) 1455-1461. doi: 10.1021/acs.analchem.5b04424.

Y, Barry Halliwell; VERONIQUE, Marie; HUA, Lee - Hydrogen peroxide in the human body. 486:2000) 14-17.

YU, Dalong *et al.* - Iodophenol blue-enhanced luminol chemiluminescence and its application to hydrogen peroxide and glucose detection. **Talanta.** . ISSN 00399140. 146:2016) 655-661. doi: 10.1016/j.talanta.2015.06.059.

YU, Guangxia *et al.* - High Sensitive and Selective Sensing of Hydrogen Peroxide Released from Pheochromocytoma Cells Based on Pt-Au Bimetallic Nanoparticles Electrodeposited on Reduced Graphene Sheets. *Pc* 12 (2015) 2709-2722. doi: 10.3390/s150202709.

ZHANG, Yuanyuan *et al.* - Highly Sensitive Graphene – Pt Nanocomposites Amperometric Biosensor and Its Application in Living Cell H₂O₂ Detection. 2014).

ZHANG, Yuting *et al.* - Electrospun bimetallic Au-Ag/Co₃O₄ nanofibers for sensitive detection of hydrogen peroxide released from human cancer cells. **Analytica Chimica Acta.** . ISSN 18734324. 1042:2018) 20-28. doi: 10.1016/j.aca.2018.07.065.