



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA**

Desenvolvimento de biossensor eletroquímico para detecção de glutamato

Aluna: Lívia Maria Alves

Orientadora: Prof. Dra. Ana Graci Brito Madurro

Co-Orientador: Prof. Dr. João Marcos Madurro

**Uberlândia -MG
2014**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA**

Desenvolvimento de biossensor eletroquímico para detecção de glutamato

Aluna: Lívia Maria Alves

Orientadora: Prof. Dra. Ana Graci Brito Madurro

Co-Orientador: Prof. Dr. João Marcos Madurro

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Uberlândia como parte dos requisitos para obtenção do Título de Mestre em Genética e Bioquímica (Área Bioquímica)

**Uberlândia -MG
2014**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

A474d
2014 Alves, Livia Maria, 1989-
 Desenvolvimento de biossensor eletroquímico para detecção de
 glutamato / Livia Maria Alves. - 2014.
 67 f. : il.

 Orientadora: Ana Graci Brito Madurro.
 Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia,
 Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica.
 Inclui bibliografia.

 1. Biossensores - Teses. 2. Peptídeos - Teses. 3. Neuroreguladores -
 Teses. 4. Sistema nervoso - Doenças - Teses. I. Madurro, Ana Graci
 Brito. II. Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-
 Graduação em Genética e Bioquímica. III. Título.

CDU: 577.1



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

Desenvolvimento de biossensor eletroquímico para detecção de glutamato

ALUNA: Livia Maria Alves

COMISSÃO EXAMINADORA

Presidente: Dra. Ana Graci Brito Madurro

Examinadores: Dra. Etel Rodrigues Pereira Gimba

Dr. Luiz Fernando Moreira Izidoro

Data da Defesa: 29/07/2014

As sugestões da Comissão Examinadora e as Normas PGGB para o formato da Dissertação/Tese foram contempladas

Ana Graci Brito Madurro



Dedico este trabalho ao meu filho
João Vitor, autor das minhas alegrias.

AGRADECIMENTOS

- ▣ À Deus por estar presente em todos os momentos.
- ▣ Aos meus pais Dirce e Leondeniz, minha irmã Ana Flávia e ao João Vitor por todo amor, carinho e compreensão.
- ▣ À todos os meus familiares pelos contatos e vivências. Ao Artur pelas sugestões.
- ▣ Aos meus queridos amigos Mírian, Luiz Fernando, Ana Míriam, Maria Aline, Alexandra, Alessandra, Daiane, Tianinha e Lamartine que mesmo distantes e seguindo caminhos diferentes fizeram parte dessa etapa.
- ▣ À professora Ana Graci pela oportunidade de fazer parte de seu grupo de pesquisa, pela orientação e confiança. Um exemplo a ser seguido como profissional, quando "crescer", quero ser como você!
- ▣ Ao professor João Marcos pelas sugestões e ensinamentos.
- ▣ Ao professor Carlos Ueira por disponibilizar as amostras de peptídeo, e ao seu aluno Carlos Júnior pela prestatividade.
- ▣ À todos do LAFIP/LABIOMAT que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho: Ana Cristina, Anderson, Danielle, Deusmaque, Diego, Driely, Erick, Felipe, Fellipy, Heden, Heliane, José Manuel, Jussara, Kellen, Laíse, Larissa, Leandro, Lídia, Lucas, Luciano, Marina, Patrick, Renata, Thalles, Vinícius.
- ▣ Agradeço em especial a Ana Cristina por me acompanhar na construção deste trabalho, ao Vinícius e Leandro pelas revisões do inglês e a Hélen pela convivência nesses dois anos, e pelas trocas de conhecimento e experiências.
- ▣ Aos membros da banca que aceitaram participar e contribuir para o aprimoramento deste trabalho.

- ▣ À todos professores e técnicos do Programa de Pós Graduação em Genética e Bioquímica pelo suporte dado a esse trabalho.
- ▣ Ao técnico Guilherme (INFIS-UFU) pela ajuda com as imagens de AFM.
- ▣ À UFU, Capes, Fapemig e CNPq pelo apoio financeiro.
- ▣ À todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho. Muito Obrigada!

SUMÁRIO

APRESENTAÇÃO	1
CAPÍTULO 1 Fundamentação Teórica	2
1. Introdução	3
1.1. Glutamato	3
1.2. Glutamato e doenças neurológicas.....	6
1.3. Relação entre os níveis de glutamato no cérebro e no sangue	8
1.4. Biossensores.....	8
1.4.1. Classificação baseada no elemento de reconhecimento biológico	11
1.4.2. Classificação dos biossensores quanto a transdução do sinal	16
1.4.3. Detecção direta e indireta	19
1.5. Biossensores para detecção de glutamato	20
2. Referências	22
CAPÍTULO 2 Development of a mimetic biosensor for detection of glutamate.....	31
1. Introduction.....	34
2. Experimental	35
2.1 Materials	35
2.2 Apparatus.....	36
2.3. Sensor preparation and detection of the glutamate target	36
2.4. Calibration curve	36
2.5. Performance of biomimetic sensor using real sample.....	37
2.6. Electrochemical impedance spectroscopy	37
3. Results and discussion.....	37
3.1. Immobilization of peptide onto graphite electrodes	37
3.2. Detection of glutamate	39

3.3. Electrochemical impedance spectroscopy	42
3.4. Chronoamperometric response.....	43
3.5. Application to biological samples	44
3.6. Morphological characterization of the biosensor using atomic force microscopy	46
4. Conclusion.....	47
Acknowledgments	47
References	47
ANEXOS	52

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

Figura 1. Forma estrutural (a) e modelo bola e bastão (b) do aminoácido glutamato em pH 7,4.....3

Figura 2. Representação esquemática de uma sinapse glutamatérgica, representando a liberação do glutamato para a fenda sináptica, sua síntese, e seu transporte entre os neurônios, astrócitos e sangue. Adaptado de NEDERGAARD *et al.* (2002) e KATZUNG *et al.* (2014).....5

Figura 3. Representação esquemática de um biossensor. Adaptado de RONKAINEN *et al.* (2010).....9

Figura 4. Diferentes categorias de biossensores. Adaptado de PERUMAL e HASHIM (2014).....11

Figura 5. Representações de biossensores baseados na imobilização de anticorpos (a), enzimas (b), DNA (c), células (d) e peptídeos (e).....12

Figura 6. Estrutura química do isotiocianato de fluoresceína.....20

CAPÍTULO 2

Figure 1. Cyclic voltammograms of graphite electrode (a) and graphite electrode modified with peptide probe (b) in 10 mmol.L⁻¹ K₃Fe(CN)₆/K₄Fe(CN)₆ solution containing 0.1 mol.L⁻¹ KCl. Scan rate: 100 mV.s⁻¹.....38

Figure 2. Differential pulse voltammograms of FITC (a) and peptide conjugated with FITC (b). Electrolyte: 0.1 mol.L⁻¹ phosphate buffer, pH 7.4. Modulation amplitude: 25 mV. Pulse interval: 0.2 s; 20 mV.s⁻¹.....39

Figure 3. (A) Differential pulse voltammograms of bare graphite electrode containing peptide-FITC in absence (a) or presence of the glutamate in different concentrations: 1 nmol.L⁻¹ (b), 1 μmol.L⁻¹ (c) 1 mmol.L⁻¹ (d) and 10 mmol.L⁻¹ (e) . Electrolyte: 0.10 mol.L⁻¹ phosphate buffer, pH 7.4. Modulation amplitude: 25 mV. Pulse interval: 0.2 s; 20 mV.s⁻¹. (B) Calibration data for the oxidation signal of FITC obtained after incubation in different concentrations of glutamate.....40

Figure 4. Proposed mechanism for the electrochemical peptide-based biosensing platform for glutamate detection. Peptide: Ac-NHWLSPL[Lys(FITC)], Glu: glutamate.....41

Figure 5. Impedance response of graphite electrode (a), graphite electrode/peptide (b), graphite electrode/peptide:glutamate 1 mmol.L⁻¹ (c) obtained in aqueous solution containing K₃Fe(CN)₆/K₄Fe(CN)₆ 10 mmol.L⁻¹ in KCl 0.1 mol.L⁻¹. Frequency range from 50 KHz to 10 mHz, amplitude of 10 mV.....42

Figure 6. Chronoamperograms of graphite electrode (a), graphite/peptide (b) and graphite/peptide:glutamate 1 mmol.L⁻¹ (c). Detection was conducted in phosphate buffer, pH 7.4, at 0,8 V. Inset: Bar chart of charge density.....43

Figure 7. Relative response (%) of the biosensor. Serum not enriched (a) and serum enriched with glutamate 1 nmol.L⁻¹ (b), 1 μmol.L⁻¹ (c) 1 mmol.L⁻¹ (d) and 10 mmol.L⁻¹ (e).....44

Figure 8. Relative response (%) of the biosensor. Pool of serum from healthy patients (a) and pool of serum from patients with Alzheimer's (b).....45

Figure 9. AFM topographical images of graphite electrode (A); graphite/peptide (B) and graphite/ peptide: glutamate (C).....46

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

Tabela 1. Características ideais de um biossensor (GRIFFIN e STRATIS-CULLUM,2009).....10

Tabela 2. Características de alguns biossensores descritos na literatura para a detecção do glutamato.....21

LISTA DE ABREVIATURAS

AFM - *atomic force microscopy* (microscopia de força atômica)

Arg - *arginine* (arginina)

DNA - *deoxyribonucleic acid* (ácido desóxirribunucleico)

EIS - *electrochemical impedance spectroscopy* (espectroscopia de impedância eletroquímica)

FITC - *fluorescein isothiocyanate* (isotiocianato de fluoresceína)

Glu - *glutamate* (glutamato)

His - *histidine* (histidina)

Lys - *lysine* (lisina)

MRI - *magnetic resonance imaging* (imagem por ressonância magnética)

Phe - *phenylalanine* (fenilalanina)

SNC - *central nervous system* (sistema nervoso central)

Trp - *tryptophan* (triptofano)

Tyr - *tyrosine* (tirosina)

APRESENTAÇÃO

O glutamato é considerado o principal neurotransmissor excitatório presente no sistema nervoso central, está amplamente distribuído nesse sistema e desempenha importante papel na manutenção de aspectos funcionais do cérebro. Alterações nos níveis de glutamato têm sido associado a diferentes doenças neurológicas, sendo então esse aminoácido um importante analito alvo para auxiliar no diagnóstico dessas patologias.

O desenvolvimento de biossensores para auxiliar o diagnóstico de doenças é uma importante ferramenta devido às vantagens que estes dispositivos apresentam, tais como: baixo custo, sensibilidade, seletividade e possibilidade de miniaturização.

Sendo assim, este trabalho visou à construção de um bioeletrodo para a detecção do glutamato, por meio da imobilização de um peptídeo mimético ligante de glutamato em eletrodos de grafite.

A apresentação deste trabalho foi realizada segundo as normas da Pós-Graduação em Genética e Bioquímica da Universidade Federal de Uberlândia (anexo, página 52). A dissertação foi dividida em: **Capítulo 1** - Fundamentação Teórica; e **Capítulo 2** - Development of a mimetic biosensor for detection of glutamate.

CAPÍTULO 1

FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

1. Introdução

1.1. Glutamato

Os sinais nervosos são transmitidos entre os neurônios por meio de junções interneuronais denominadas sinapses. Nesta região, os neurônios pré e pós-sinápticos comunicam-se quando ocorre alteração no potencial elétrico no terminal pré sináptico e consequente liberação de neurotransmissores (GUYTON e HALL, 1997).

O glutamato, ou ácido glutâmico (Figura 1), é um aminoácido não essencial que carrega uma carga líquida negativa, em pH neutro, a cadeia lateral desse aminoácido encontra-se completamente ionizada, contendo um grupo carboxilato carregado negativamente ($-\text{COO}^-$) (CHAMPE *et al*, 2006).

Possui várias funções biológicas e é um dos cinco aminoácidos que possuem função neurotransmissora (SHEN, 2014). É considerado o principal neurotransmissor excitatório presente no sistema nervoso central (SNC) de mamíferos (PLATT, 2007). Está amplamente distribuído nesse sistema e desempenha importante papel na manutenção de aspectos funcionais do cérebro, tais como: cognição, aprendizagem, memória e controle motor (FRANCIS, 2003; TSAPAKIS, 2002).

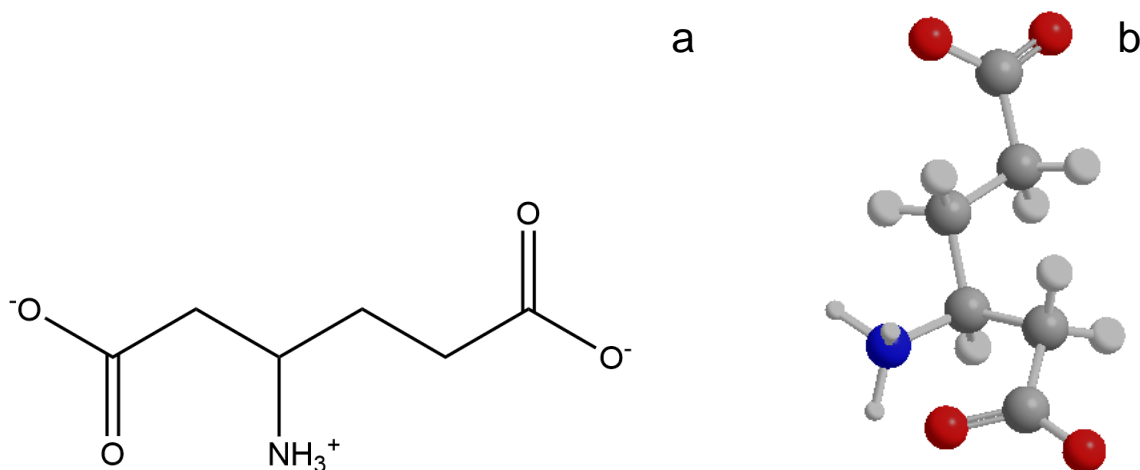


Figura 1. Forma estrutural (a) e modelo bola e bastão (b) do aminoácido glutamato em pH 7,4.

No início dos anos 50, a descoberta de altas concentrações de glutamato livre no encéfalo, gerou questões sobre seu papel no SNC. Em 1959 foi observado que esse aminoácido causava convulsões e propuseram que ele poderia ser um neurotransmissor, neste mesmo ano sua ação excitatória foi comprovada, mas vários aspectos de sua ação pareciam argumentar contra sua função. Essa visão negativa permaneceu por mais duas décadas, e nos últimos trinta anos várias pesquisas revelaram uma variedade de subtipos de receptores glutamatérgicos, desempenhando várias funções na transmissão sináptica excitatória, sendo assim, hoje ele é reconhecido como o principal neurotransmissor excitatório (KAPCZINSKI *et al.*, 2011).

Quase todos os neurônios testados são excitados pelo glutamato, e essa excitação é causada pela ativação dos receptores tanto ionotrópicos, quanto metabotrópicos, extensamente caracterizados (KATZUNG *et al.*, 2014).

A síntese do glutamato no cérebro ocorre através de duas vias distintas, a partir do α -cetoglutarato formado no ciclo de Krebs, que é transaminado a glutamato; e através do ciclo glutamato/glutamina que ocorre nos astrócitos, onde a glutamina produzida e secretada pelas células da glia (gliócitos) é transportada nas terminações nervosas e convertida em glutamato pela glutaminase (GOLAN *et al.*, 2009).

A Figura 2 apresenta uma representação esquemática de uma sinapse glutamatérgica.

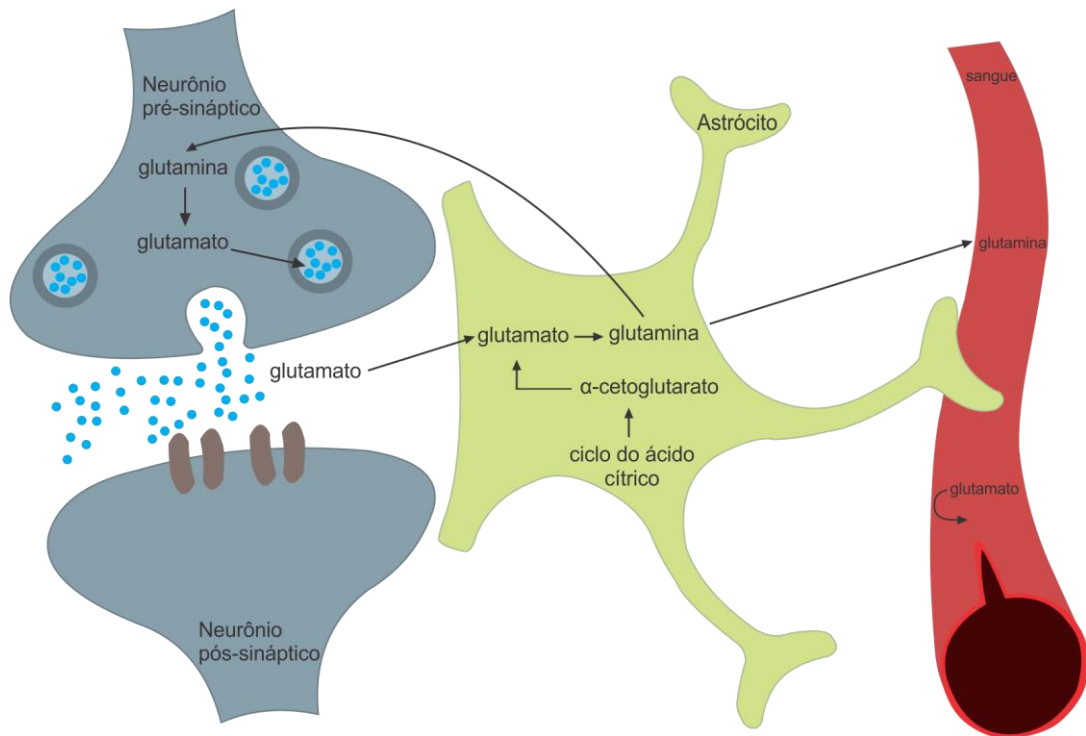


Figura 2. Representação esquemática de uma sinapse glutamatérgica, representando a liberação do glutamato para a fenda sináptica, sua síntese, e seu transporte entre os neurônios, astrócitos e sangue. Adaptado de NEDERGAARD *et al.* (2002) e KATZUNG *et al.* (2014).

Quando o neurônio está em repouso, o glutamato é armazenado em vesículas sinápticas, que se localizam em regiões terminais do axônio denominadas zonas ativas. Em resposta a um potencial de ação, há uma excitação neuronal que leva a abertura de canais de Ca^{2+} dependentes de voltagem. O influxo de Ca^{2+} gerado promove a fusão das vesículas na membrana plasmática e formação de um poro para liberação do glutamato na fenda sináptica (GUYTON e HALL, 1997).

Após a liberação do glutamato da célula pré-sináptica, ele interage com os receptores na célula pós-sináptica desencadeando cascatas intracelulares que se reproduzirão em respostas celulares e é rapidamente removido por alguns mecanismos desempenhados pelo cérebro.

Um desses mecanismos está diretamente associado aos transportadores de glutamato dependentes de Na^+ encontrados nos neurônios e nas células da glia, as quais desempenham um papel importante na regulação da concentração do glutamato no fluido extracelular, mantendo abaixo do limiar de

excitotoxicidade. Um segundo mecanismo é facilitado por alguns desses transportadores presentes na membrana abluminal (lado cerebral) da barreira hematoencefálica. A ligação ao transportador conduzirá esse neurotransmissor a um processo de reciclagem, para que ele seja usado novamente em resposta a um potencial de ação num neurônio glutamatérgico e também regulará a concentração desse transmissor no meio extracelular (O'KANE *et al.*, 1999; HAWKINS, 2009; KATZUNG *et al.*, 2014).

O termo excitotoxicidade foi criado para descrever a ação do glutamato de provocar dano neuronal por estimulação excessiva dos seus receptores pós-sinápticos (OLNEY, 1969; SATTLER e TYMIANSKI, 2000).

Essa capacidade do glutamato de ser altamente tóxico em grandes concentrações e ao mesmo tempo fundamental para a neurotransmissão excitatória estabelece um equilíbrio entre fisiologia e patologia.

Quando a sua concentração no fluido extracelular torna-se elevada, o glutamato pode ser tóxico para os neurônios causando excitotoxicidade, e a ativação excessiva dos receptores de glutamato pode contribuir para a fisiopatologia de certas doenças neurodegenerativas (GOLAN *et al.*, 2009), sendo então um importante analito alvo para auxiliar no diagnóstico de desordens neurológicas.

1.2. Glutamato e doenças neurológicas

Patologias neurológicas são doenças do sistema nervoso central e periférico, que incluem desordens do cérebro, da medula espinhal, dos nervos periféricos e da junção neuromuscular. Esses distúrbios não somente estão entre as doenças mais onerosas para a sociedade, mas também a sua prevalência crescente representa um grave problema de saúde pública. De acordo com a Organização Mundial de Saúde distúrbios neurológicos são uma importante causa de mortalidade e constituem 12% do total de mortes no mundo (WHO, 2006).

Dados da literatura revelam uma relação entre os níveis de glutamato no sangue e diferentes doenças neurológicas, como injúria cerebral traumática, acidente vascular cerebral, doença do neurônio motor, depressão, demência,

esquizofrenia, autismo, epilepsia, doenças de Alzheimer, Parkinson e Huntington (BABU *et al.*, 1998; HASSAN *et al.*, 2013; LEIBOWITZ *et al.*, 2012).

Um estudo realizado com crianças autistas indicou um aumento nos níveis de glutamato no sangue e no cérebro nessa patologia (HASSAN *et al.*, 2013). Em pacientes com doença do neurônio motor (ou Esclerose Lateral Amiotrófica) também foi observado um aumento significativo de glutamato plasmático (BABU *et al.*, 1998).

Estudos *in vivo* utilizando microdialise em pacientes com epilepsia mostram um aumento significativo nos níveis extracelulares de glutamato, que atingem concentrações neurotóxicas no hipocampo, antes e durante o início dos ataques epiléticos (CAVUS *et al.*, 2005). Testes utilizando espectroscopia por ressonância magnética também demonstraram esse perfil de aumento dos níveis extracelulares de glutamato em pacientes com epilepsia (PAN *et al.*, 2008).

Foi observado um decréscimo nos níveis de glutamato no plasma de pacientes com diagnóstico de esquizofrenia, transtorno bipolar ou psicose não-especificada no primeiro episódio psicótico e esses níveis foram restaurados após o tratamento (BELSHAM, 2001; PALOMINO *et al.*, 2007).

Doenças neurodegenerativas são caracterizadas pela perda neuronal no sistema nervoso central, levando ao comprometimento cognitivo, distúrbios de movimento, e distúrbios psiquiátricos (IRANZO, 2013).

O papel do glutamato e dos receptores de glutamato na aprendizagem e memória é amplamente reconhecido (FRANCIS, 2003). A doença de Alzheimer é o tipo mais comum de demência, este distúrbio é caracterizado por redução progressiva na memória e das funções cognitivas em idosos (DAVYDOVA *et al.*, 2009; HYND *et al.*, 2004). Vários trabalhos têm demonstrado que a função de transporte do glutamato é significativamente reduzida nos cérebros de pacientes diagnosticados com Alzheimer e essa redução está correlacionada com a perda de sinapses e a morte neuronal (LIN *et al.*, 2012). Estudos mostram uma diminuição no nível de glutamato no cérebro (FAYED *et al.*, 2011; FRANCIS, 2003; RUPSINGH *et al.*, 2011) e no plasma (BASUN, 1990; WANG *et al.*, 2014) desses pacientes.

1.3. Relação entre os níveis de glutamato no cérebro e no sangue

Os níveis de glutamato no plasma sanguíneo podem refletir a concentração de glutamato extracelular no sistema nervoso central, uma vez que o efluxo desse aminoácido do cérebro para o sangue ocorre por meio da barreira hematoencefálica (O'KANE *et al.*, 1999; SMITH, 2000).

O'KANE *et al.* (1999) propuseram um mecanismo para a eliminação do glutamato do cérebro para o sangue a partir de um gradiente de concentração desfavorável entre fluido intersticial do cérebro e o líquido cefalorraquidiano.

Estudos demonstraram a existência desse efluxo de glutamato do cérebro para o sangue pela barreira hematoencefálica, através de injeções de glutamato marcado radioativamente em ventrículos cerebrais de rato e posteriormente mostraram a sua rápida detecção no sangue e desaparecimento no líquido cefalorraquidiano (GOTTLIEB *et al.*, 2003).

ZLOTNIK *et al.* (2012) demonstraram que a captação de glutamato no sangue utilizando piruvato e oxaloacetato, forneceram neuroproteção em ratos após lesão cerebral traumática, sugerindo que com a diminuição da concentração de glutamato no sangue, há uma aceleração no efluxo do cérebro para o sangue, reforçando assim a existência desse mecanismo de eliminação de glutamato através da barreira hematoencefálica.

Diferentes técnicas têm sido utilizadas para a determinação de glutamato, tais como cromatográficas (CAMPOS *et al.*, 2012), espectrofotométricas, fluorimétricas (GRAHAM e APRISON, 1996), eletroforese capilar, microdiálise (CAVUS *et al.*, 2005), espectroscopia de ressonância magnética *in vivo* (PAN *et al.*, 2008; CAMPOS *et al.*, 2012), mas estes métodos requerem tempo de preparação da amostra, equipamentos de alto custo e pessoas qualificadas para operar.

1.4. Biossensores

Um sensor químico é definido como um dispositivo que transforma a informação química em um sinal analítico, podendo ser utilizado para a determinação da concentração de um componente de uma amostra específica, mas também, para determinar a composição total da amostra. Os biossensores podem ser definidos como dispositivos que convertem um sinal bioquímico em um

sinal mensurável, constituídos de um material biológico como elemento de reconhecimento (THEVENOT *et al.*, 2001; GRIFFIN e STRATIS-CULLUM, 2009).

Os biossensores são constituídos por três componentes principais (Figura 3), o elemento de reconhecimento biológico, o qual identifica o estímulo; o transdutor, que converte este estímulo em um sinal mensurável e o sistema de processamento de sinal, que envolve a amplificação e exibição dos dados em um formato apropriado (PERUMAL e HASHIM, 2014).

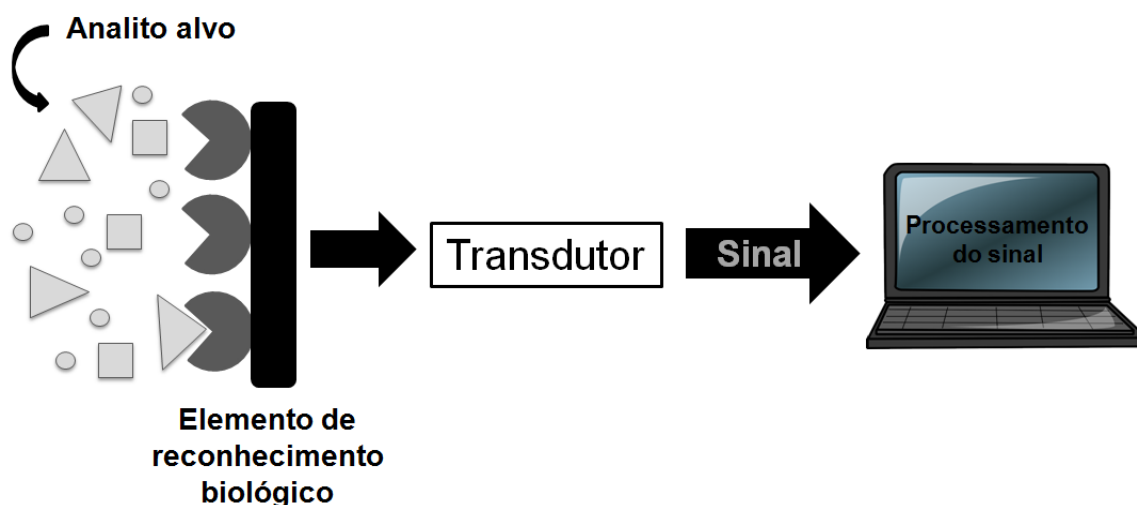


Figura 3. Representação esquemática de um biossensor. Adaptado de RONKAINEN *et al.* (2010).

O termo biossensor começou a aparecer na literatura científica no final dos anos 70, no entanto o conceito de base e até mesmo a sua comercialização foi anterior a essa data (D’ORAZIO, 2003). Os biossensores representam um campo em rápida expansão, desde o desenvolvimento do biossensor para a detecção da glicose em 1962, por Clark e Lyon (MEHRVAR e ABDI, 2004). A Tabela 1 apresenta algumas características ideais de um biossensor.

Tabela 1. Características ideais de um biossensor (GRIFFIN e STRATIS-CULLUM,2009).

Características	Descrição
Tempo de análise	Análises rápidas com respostas para o analito alvo em "tempo real"
Sensibilidade	Alta sensibilidade permite a detecção de baixas concentrações do analito alvo e baixas análises falso-negativas
Seletividade	A análise específica permite a discriminação entre o analito alvo e outras espécies relacionadas e minimiza análises falso-negativas
Reprodutibilidade	A análise deve ser altamente reprodutível, a fim de fornecer uma análise confiável e de fácil calibração
Precisão	O dispositivo deve ser altamente preciso, ou seja, resultados falso-positivos e falso-negativos são minimizados
Robustez	O biossensor deve ser insensível às condições ambientais (temperatura, pH, interferências eletrônicas, e outros)
Custo unitário e operacional	Baixo custo unitário e operacional para reagentes e outros materiais, permitindo uma aplicação mais ampla do sistema de biossensores
Tamanho e peso	Possibilidade de miniaturização
Regeneração	A capacidade de regeneração da superfície de ligação, permitindo múltiplas medições pelo mesmo elemento é ideal, embora plataformas de uso único é suficiente
Detecção de multianalitos	Um biossensor que pode detectar vários analitos simultaneamente, é altamente desejável
Interface com o usuário	Idealmente, são desejados sistemas totalmente automatizados, ou que exigem pouco conhecimento e habilidades do operador

Os principais campos de aplicação dos biossensores são: diagnóstico de doenças (GOULART *et al.*, 2010, D'ORAZIO, 2011; QURESHI *et al.*, 2012, MURUGAIYAN *et al.*, 2014), segurança alimentar (MCGRATH *et al.*, 2013), monitoramento ambiental (WANG *et al.*, 2014) e análises forense (YÁÑEZ-SEDEÑO *et al.*, 2014).

Vários parâmetros são utilizados para a classificação dos biossensores (Figura 4), tais como, o elemento de reconhecimento biológico utilizado e o método de transdução do sinal (FARRÉ e BARCELÓ, 2007; GRIFFIN e STRATIS-CULLUM, 2009; PERUMAL e HASHIM, 2014).

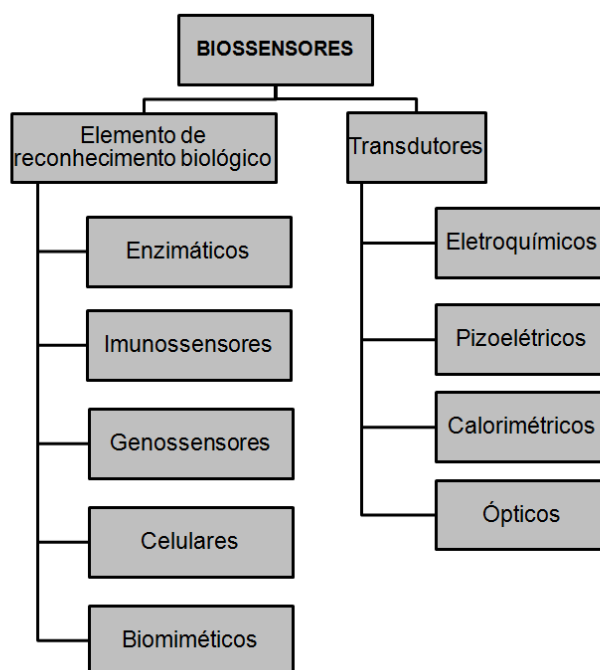


Figura 4. Diferentes categorias de biossensores. Adaptado de PERUMAL e HASHIM (2014).

1.4.1. Classificação baseada no elemento de reconhecimento biológico

Um elemento de reconhecimento biológico ou biorreceptor geralmente consiste de uma biomolécula imobilizada que é capaz de detectar o analito alvo específico (PERUMAL e HASHIM, 2014).

Devido aos grandes avanços na biologia molecular, bioquímica, genética e imunologia, uma vasta gama de biomoléculas são comumente utilizadas como elemento de reconhecimento biológico para a construção de biossensores, tais como, enzimas (BATRA *et al.*, 2014), anticorpos (HENNESSEY *et al.*, 2009), ácidos nucleicos (SILVA *et al.*, 2009), células e peptídeos (GÓMARA *et al.*, 2000; LI *et al.*, 2013), cada um com suas próprias vantagens na detecção do analito alvo.

É crucial um elemento de reconhecimento ser seletivo e sensível para o analito alvo específico a fim de evitar a interferência de outras substâncias presentes nas amostras (PERUMAL e HASHIM, 2014). A seletividade e sensibilidade do biossensor são determinadas pela afinidade entre elemento de

reconhecimento e a molécula alvo, além também do transdutor utilizado (WANG *et al.*, 2014).

Baseando-se no elemento de reconhecimento biológico, os biossensores podem ser classificados em: imunossensores, biossensores enzimáticos, genossensores, biossensores celulares e sensores biomiméticos (Figura 5).

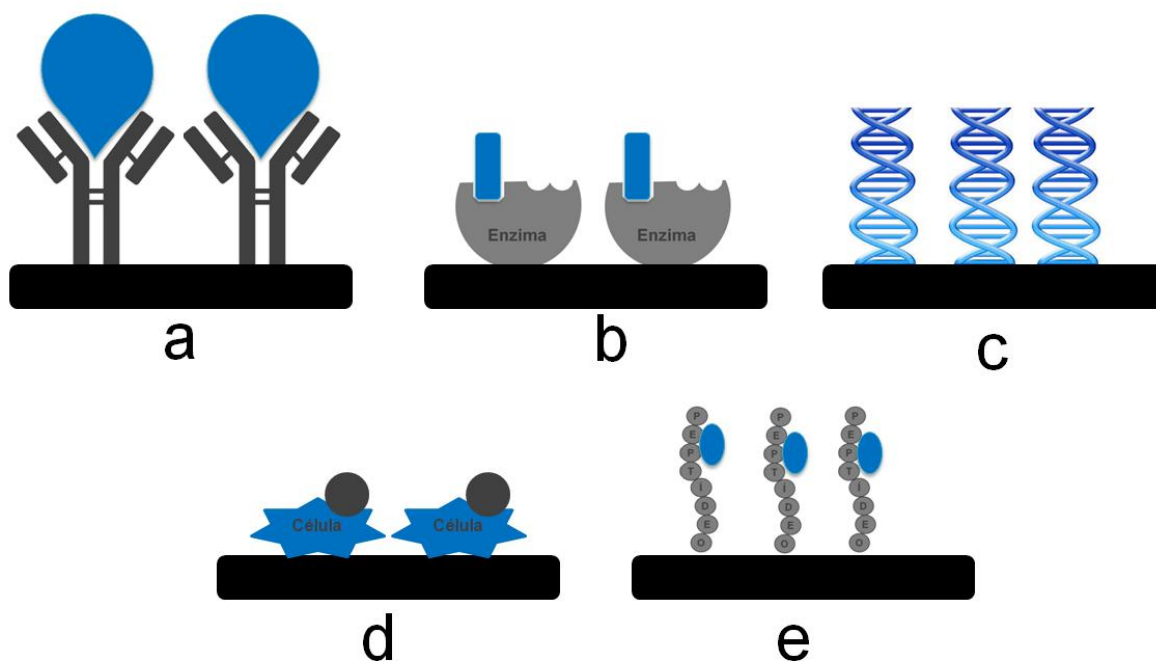


Figura 5. Representações de biossensores baseados na imobilização de anticorpos (a), enzimas (b), DNA (c), células (d) e peptídeos (e).

1.4.1.1. Imunossensores

Os imunossensores são biossensores que monitoram a interação antígeno-anticorpo, nos quais o anticorpo ou o antígeno são imobilizados sobre a superfície do transdutor (RICCI *et al.*, 2012; WAN *et al.*, 2013).

Os anticorpos são elementos de reconhecimento ideais devido as suas especificidades, como a forte afinidade pelo antígeno (CONROY *et al.*, 2009). Durante várias décadas, os anticorpos têm sido considerados potenciais analitos ou ligantes para ensaios de detecção e são bastante explorados no desenvolvimento de biossensores (WANG *et al.*, 2008).

O sucesso de um imunossensor depende de vários fatores, incluindo a funcionalização da superfície, a orientação dos anticorpos, a densidade dos anticorpos sobre a plataforma do sensor e a configuração do imunossensor (GOPINATH *et al.*, 2014). A detecção de antígenos pode ser feita por diversas maneiras, diretamente ou indiretamente, utilizando-se por exemplo, anticorpos marcados com enzimas, moléculas eletroativas ou fluorescentes (LIN e JU, 2005; PEI *et al.*, 2013).

Os imunossensores tem desempenhado um papel importante na melhoria da saúde pública, por proporcionar aplicações para uma detecção rápida, sensível e específica, em áreas como a química clínica, qualidade dos alimentos e monitoramento ambiental (RAMÍREZ *et al.*, 2009).

1.4.1.2. Biossensores enzimáticos

As enzimas são biocatalisadores muito eficientes, que possuem a capacidade de reconhecer especificamente os seus substratos e catalisar a sua transformação. Estas propriedades únicas tornam as enzimas ferramentas poderosas para o desenvolvimento de dispositivos analíticos, como os biossensores (PERUMAL e HASHIM, 2014). Os biossensores baseados na imobilização da enzima glicose oxidase foram os primeiros biossensores enzimáticos reportados na literatura (SONG *et al.*, 2006).

A imobilização de enzimas sobre a superfície do transdutor é um passo necessário e crucial na concepção de biossensores enzimáticos, pois um dos maiores problemas na utilização de enzimas é a manutenção de sua estabilidade. As principais estratégias de imobilização de enzimas são adsorção, ligação covalente, aprisionamento, encapsulamento, ligação cruzada e afinidade (GRIESHABER *et al.*, 2008; SASSOLAS *et al.*, 2012).

Os métodos de detecção realizados pelos sensores enzimáticos podem ser classificados de acordo com a interação entre a enzima e o analito alvo: (1) se a enzima metaboliza o analito, a concentração do analito pode ser determinada através da medição da transformação catalítica do analito pela enzima imobilizada e (2) se a atividade da enzima é inibida pelo analito, um outro método de determinação é detectar a diminuição da formação do produto enzimático (FARRÉ e BARCELÓ, 2007).

1.4.1.3. Genossensores

Os genossensores são baseados em processos de reconhecimento de ácidos nucleicos visando a detecção de alvos envolvidos em doenças genéticas, infecciosas e também para permitir o monitoramento de danos e interações ao DNA (MURUGAIYAN *et al.*, 2014). São geralmente desenvolvidos por meio da imobilização de fita simples de DNA (sonda) sobre a superfície do transdutor. A detecção do alvo complementar e do evento de hibridização pode ser realizada por medida direta ou por medida indireta utilizando um indicador de hibridização (PERUMAL e HASHIM, 2014).

A etapa de imobilização deve levar a uma orientação da sonda bem definida e facilmente acessível para o alvo, e vários métodos podem ser utilizados para imobilizar a sonda de DNA sobre a superfície do transdutor (TELES e FONSECA, 2008; LI *et al.*, 2009; SILVA *et al.*, 2009; ZHANG *et al.*, 2013a).

Os ácidos nucleicos oferecem vantagens para serem utilizados como sonda, pois são facilmente sintetizados, altamente específicos e podem ser reutilizáveis (MURUGAIYAN *et al.*, 2014).

1.4.1.4. Biossensores celulares

Biossensores celulares são um tipo de biossensor, que utilizam células vivas como o elemento de reconhecimento, baseiam-se na capacidade da célula em detectar as condições do microambiente intracelular ou extracelular e os parâmetros fisiológicos, e produzir uma resposta por meio da interação entre o estímulo e a célula (PERUMAL e HASHIM, 2014). Esses dispositivos também são conhecidos como biossensores microbianos (D'ORAZIO, 2011).

Os microrganismos, tais como bactérias e fungos são geralmente utilizados como biorreceptores para a detecção de moléculas específicas ou o estado geral de um ambiente circundante, e proteínas presentes nas células, como as enzimas, podem também ser utilizadas como biorreceptores para a detecção de um analito específico (D'SOUZA, 2001; PERUMAL e HASHIM, 2014).

A principal aplicação dos biossensores celulares e microbianos está no monitoramento ambiental (FARRÉ e BARCELÓ, 2007), além da indústria alimentícia e de fermentação, e diagnóstico clínico (DAI e CHOI, 2013).

1.4.1.5. Sensores biomiméticos

Os sensores biomiméticos são aqueles que utilizam como elemento de reconhecimento biológico, biomoléculas sintéticas ou artificiais que mimetizam uma biomolécula natural. Nesta categoria podemos incluir os biossensores baseados na imobilização de aptâmeros, que são oligonucleotídeos de fita simples que se ligam a seus alvos com alta afinidade e especificidade, e biossensores baseados na imobilização de peptídeos ligantes como elemento de reconhecimento (PERUMAL e HASHIM, 2014; WANG, *et al.*, 2014).

Os peptídeos são utilizados para mimetizar o mecanismo de reconhecimento molecular que ocorre nas biomoléculas, como enzimas, anticorpos, receptores, transportadores e as proteínas transmembranas. Apresentam vantagens para o desenvolvimento de sondas, como a possibilidade de se obter um grande número de moléculas por meio da combinação dos 21 aminoácidos naturais, diversidade química (acidez, basicidade, hidrofobicidade, hidrofobicidade e outros), disponibilidade de bibliotecas de peptídeos, possibilidade de síntese e o baixo custo (CUI *et al.*, 2012; PAVAN e BERTI, 2012). Com a utilização de técnicas moleculares desenvolvidas nos últimos anos, é possível a produção de peptídeos/proteínas com forte afinidade de ligação à alvos específicos (GRIFFIN e STRATIS-CULLUM, 2009).

Um número crescente de biossensores baseados em sistemas biomiméticos utilizando peptídeos têm sido relatados na literatura, com uma ampla variedade de analitos alvo e campos de aplicação.

GÓMARA *et al.* (2000) demonstraram a aplicação de um biossensor óptico para a detecção de anticorpos contra o vírus da hepatite A em soros de pacientes utilizando peptídeos sintéticos como elemento de reconhecimento. ZHANG *et al.* (2013b) desenvolveram um sistema baseado em peptídeos curtos para a detecção de imunoglobulina G.

DROUVALAKIS *et al.* (2008) descreveram um novo método utilizando nanotubos de carbono como plataformas para imobilização de peptídeos para a detecção de anticorpos específicos no soro de pacientes com artrite reumatóide, uma doença auto-imune.

Um biossensor para a detecção do marcador cardíaco, a troponina I, foi desenvolvido através da imobilização de um peptídeo sintético em uma superfície de ouro (WU *et al.*, 2010). Um sensor foi desenvolvido utilizando um peptídeo específico para a enzima alanina aminotransferase, um biomarcador de hepatotoxicidade (WU *et al.*, 2011).

HUAN *et al.* (2009) desenvolveram um biossensor eletroquímico baseado na imobilização de peptídeos seletivos para um biomarcador de Antraz. LI *et al.* (2013) utilizaram peptídeos ligantes para a construção de um biossensor eletroquímico para a detecção do receptor do fator de crescimento epidérmico, envolvido em diferentes tipos de câncer.

Algumas estratégias têm sido desenvolvidas para a detecção dos alvos em biossensores miméticos, como a conjugação dos peptídeos com moléculas eletroativas. LI *et al.* (2014) descreveram um biossensor impedimétrico para a detecção de uma cepa de *Escherichia coli* baseado na imobilização de peptídeo conjugado com ferroceno, uma molécula que apresenta um comportamento eletroquímico simples e sensível.

Peptídeos específicos foram conjugados com o marcador redox azul de metileno e utilizados no desenvolvimento de um biossensor eletroquímico para a detecção de anticorpos anti- p24, uma proteína presente no nucleocapsídeo do vírus da imunodeficiência humana tipo I (HIV-1) (GERASIMOV e LAI, 2010). ZAITOUNA e LAI (2014) desenvolveram um sensor para a detecção de anticorpos anti-Ara h 2, uma proteína presente no amendoim, baseado também na imobilização de peptídeo conjugado com azul de metileno.

1.4.2. Classificação dos biossensores quanto a transdução do sinal

Os biossensores podem ser classificados de acordo com o princípio de transdução do sinal. O transdutor é um componente do biossensor que desempenha um importante papel no processo de detecção do sinal, por isso o transdutor pode ser definido como um dispositivo que converte uma vasta gama de efeitos biológicos, físicos e químicos, em um sinal elétrico mensurável (PERUMAL e HASHIM, 2014). Podem ser de diversos tipos, tais como, eletroquímicos, piezoelétricos, calorimétricos e ópticos.

1.4.2.1. Eletroquímicos

Os biossensores eletroquímicos são baseados no consumo e/ou geração de espécies eletroativas durante uma interação química e biológica (MEHRVAR e ABDI, 2004), nesse processo o transdutor mensura o sinal eletroquímico produzido por essa interação.

As técnicas eletroquímicas possibilitam o estabelecimento de relações diretas entre a concentração do analito e alguma propriedade elétrica como corrente, potencial, condutividade, resistência ou carga. Como as medidas destas propriedades são facilmente acessíveis experimentalmente, são adequadamente utilizadas na quantificação de espécies de interesse nas diferentes áreas de estudo (SOUZA *et al.*, 2003). Os biossensores eletroquímicos são os mais comuns e estudados para o uso em análises clínicas (SONG *et al.*, 2006).

Entre os biossensores eletroquímicos podemos citar os potenciométricos, amperométricos e de espectroscopia de impedância eletroquímica. As técnicas utilizadas para a detecção da resposta eletroquímica neste trabalho foram a voltametria, cronoamperometria e espectroscopia de impedância eletroquímica.

Na voltametria, um potencial em função do tempo é aplicado a um eletrodo de trabalho, mudando o seu potencial em relação a um potencial fixo de um eletrodo de referência. A corrente resultante, que flui entre o eletrodo de trabalho e um eletrodo auxiliar, é medido em função do potencial. Esta técnica foi desenvolvida pela primeira vez por Jaroslav Heyrovsky em 1922, o que resultou no Prêmio Nobel de Química em 1959. O eletrodo auxiliar é geralmente feito de platina, o eletrodo de referência pode ser de prata/cloreto de prata, calomelanos ou, mais raramente, eletrodo de hidrogênio, e diferentes materiais são utilizados como eletrodo de trabalho, incluindo ouro, prata, platina, mercúrio, e grafite (HOUSSIN e SENEZ, 2014). A escolha da técnica voltamétrica a ser utilizada, tais como voltametria cíclica e voltametria de pulso diferencial, está relacionada com o tipo e a qualidade de informação quantitativa e/ou qualitativa que se quer obter a respeito do analito ou do processo que envolve a interação entre o analito e o eletrodo de trabalho (PACHECO *et al.*, 2013).

A cronoamperometria é uma técnica eletroquímica que determina a corrente que flui através do eletrodo de trabalho, como função do tempo, em um

potencial fixo. Esse fluxo de corrente é relacionado com o gradiente de concentração das espécies oxidadas na superfície do eletrodo de trabalho. A transferência de massa para o eletrodo de trabalho ocorrerá por meio de difusão, e a curva corrente- tempo resultante será uma curva de decaimento exponencial da corrente com o tempo (QUEIROZ e AVACA, 2008).

A utilização da cronoamperometria é geralmente observada na literatura no desenvolvimento de biossensores enzimáticos (KANYONG *et al.*, 2012; MONOŠÍK *et al.*, 2012), provavelmente, devido as suas vantagens, tais como simplicidade e rapidez (KANG *et al.*, 2012), e é frequentemente utilizada em conjunto com outras técnicas para a caracterização do sistema em relação ao tempo de resposta do biossensor (GRIESHABER *et al.*, 2008).

A espectroscopia de impedância eletroquímica (EIS) combina a análise de ambas as propriedades resistivas e capacitivas de materiais, com base na perturbação de um sistema em equilíbrio por um sinal de excitação sinusoidal de amplitude pequena (GUAN *et al.*, 2004). É uma técnica que permite a observação da alteração da superfície através da mudança da resistência e conseqüentemente da transferência de elétrons, utilizando geralmente a sonda redox $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{-3/4}$ (HENNESSEY *et al.*, 2009; RUSHWORTH *et al.*, 2014; TSIERKEZOS *et al.*, 2014).

1.4.2.2. Piezoelétricos

Biossensores que detectam a mudança na massa devido a interação do alvo ao elemento de reconhecimento são denominados biossensores piezoelétricos. Estes dispositivos se baseiam em uma mudança de frequência produzida por um estresse mecânico em um cristal de quartzo oscilante, que está correlacionada com a ligação do alvo causando uma mudança na massa (FARRÉ e BARCELÓ, 2007).

1.4.2.3. Calorimétricos

Os biossensores calorimétricos exploram uma das propriedades fundamentais das reações biológicas, a absorção ou liberação do calor. O princípio calorimétrico envolve a medição das variações de temperatura na reação entre o elemento de reconhecimento e um analito alvo, esta alteração de

temperatura pode ser correlacionada com a quantidade de reagentes consumidos ou produtos formados, com a medição do calor liberado ou consumido (RAMANATHAN e DANIELSSON, 2001).

1.4.2.4. Ópticos

Os biossensores ópticos são baseados em diferentes tecnologias de fenômenos ópticos, que são o resultado de uma interação de um analito, com a parte do receptor. Um grande número de técnicas de transdução ópticas pode ser usado para desenvolvimento de biossensores. Estes podem empregar vários fenômenos ópticos incluindo absorvância, refletância, fluorescência, fosforescência, índice de refração, polarização, rotação, interferência e a ressonância plasmônica de superfície (FARRÉ e BARCELÓ, 2007).

1.4.3. Detecção direta e indireta

Uma variedade de ensaios podem ser utilizados com os diversos elementos de reconhecimento e diferentes transdutores. Resumidamente os ensaios podem ser diretos ou indiretos, nos métodos diretos a ligação do analito ao elemento de reconhecimento é detectado diretamente. Nos métodos indiretos há a utilização de biomoléculas conjugadas com elementos catalíticos (enzimas peroxidase e fosfatase alcalina, por exemplo), indicadores da interação ou moléculas fluorescentes (THEVENOT *et al.*, 2001; GRIFFIN e STRATIS-CULLUM, 2009).

O isotiocianato de fluoresceína (FITC, Figura 6) é uma molécula de fluoresceína acrescida com o grupo funcional isotiocianato, este derivado é capaz de se ligar a peptídeos e proteínas, reagindo com o grupamento amino e têm sido amplamente utilizado no desenvolvimento de biossensores. BIANYING *et al.* (2013) desenvolveram um biossensor para a análise da interação peptídeo-receptor utilizando grafeno e um peptídeo marcado com FITC envolvido em várias patologias, SARI (2013), descreveu a utilização do FITC conjugado com óxido de grafeno para a detecção de dopamina, todos utilizando detecções fluorimétricas.

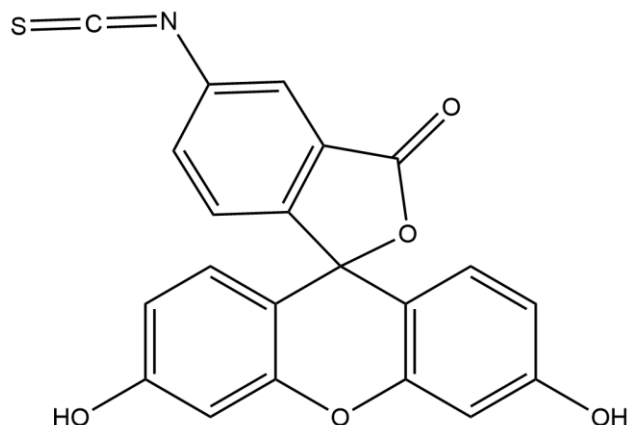


Figura 6. Estrutura química do isotiocianato de fluoresceína.

1.5. Biossensores para detecção de glutamato

A literatura dispõe de vários trabalhos que descrevem o desenvolvimento de biossensores para a detecção de glutamato, utilizando várias metodologias para obtenção de alto desempenho.

Vários métodos analíticos têm sido relatados para a detecção de glutamato, ópticos (DOONG e SHIH, 2006; MUSLIM *et al.*, 2012), e eletroquímicos (CUI *et al.*, 2007a; TIAN *et al.*, 2009; BATRA e PUNDIR, 2013; BATRA *et al.*, 2014).

DOONG *et al.* (2010) desenvolveram um biossensor óptico para a análise simultânea de potenciais marcadores para a doença de Alzheimer, a proteína β -amilóide, a acetilcolina e o glutamato, sendo a detecção do último a partir da imobilização da enzima glutamato desidrogenase.

Os sensores desenvolvidos para a detecção do glutamato são geralmente baseados na imobilização das enzimas glutamato desidrogenase (CHAKRABORTY e RAJ, 2007; TANG *et al.*, 2007; DOONG *et al.*, 2010), glutamato oxidase (TIAN *et al.*, 2009; BATRA e PUNDIR, 2013; BATRA *et al.*, 2014) e a co-imobilização das duas (BASU *et al.*, 2006), com diversas estratégias de imobilização.

A Tabela 2 apresenta o elemento de reconhecimento, a faixa linear, o limite de detecção, e a amostra utilizada no desenvolvimento de alguns biossensores para glutamato descritos na literatura.

Tabela 2. Características de alguns biossensores descritos na literatura para a detecção do glutamato.

Elemento de reconhecimento	Faixa linear (mM)	Limite de detecção (µM)	Aplicação	Referência
glutamato desidrogenase	0.02-10	6,7	Amostra biológica	(DOONG e SHIH, 2006)
glutamato desidrogenase/salicilato hidroxilase	0,01-1,5	3	-	(CUI, <i>et al.</i> , 2007a)
glutamato desidrogenase/p-hidroxibenzoato hidroxilase	0,01-1,5	5	-	(CUI <i>et al.</i> , 2007b)
glutamato desidrogenase	0,01-10	0,53	Amostras de soro	(DOONG <i>et al.</i> , 2010)
glutamato oxidase	0,005-0,5	1,6	Amostras de soro	(BATRA e PUNDIR, 2013)
glutamato oxidase	0,00002-0,4	0,0001	Amostras de soro	(BATRA <i>et al.</i> , 2014)
glutamato oxidase	0,02-20	1	-	(JAMAL <i>et al.</i> , 2010)
glutamato oxidase	0,01-0,30	5	Amostras de alimentos	(MUSLIM <i>et al.</i> , 2012)

Baseado também na utilização de enzimas como elemento de reconhecimento molecular, existe disponível comercialmente um biossensor capaz de fornecer em tempo real alterações na concentração de glutamato no cérebro de roedores (Pinnacle Technology, Inc.).

A principal desvantagem dos biossensores enzimáticos é a possível perda da atividade da enzima durante a imobilização, sendo necessário a utilização de estratégias para melhorar a sua estabilidade operacional e de armazenamento. De forma que dispositivos mais adequados, simples e de baixo custo são necessários.

2. Referências

BABU, G.N.; BAWARI, M., MATHUR, V.N.; KALITA, J.; MISRA, U.K. Blood glutamate levels in patients with motor neuron disease. **Clinica Chimica Acta**, v. 273, n. 2, p. 195–200, 1998.

BASU, A.K.; CHATTOPADHYAY, P.; ROYCHUDHURI, U.; CHAKRABORTY, R. A biosensor based on co-immobilized L-glutamate oxidase and L-glutamate dehydrogenase for analysis of monosodium glutamate in food. **Biosensors & Bioelectronics**, v. 21, n. 10, p. 1968–1972, 2006.

BASUN, H., FORSSELL, L.G.; ALMKVIST, O.; COWBURN, R.F.; EKLOF, R.; WINBLAD, B.; WETTERBERG, L. Amino acid concentrations in cerebrospinal fluid and plasma in Alzheimer's disease and healthy control subjects. **Journal of Neural Transmission**, v. 2, p. 295–304, 1990.

BATRA, B.; KUMARI, S.; PUNDIR, C.S. Construction of glutamate biosensor based on covalent immobilization of glutamate oxidase on polypyrrole nanoparticles/polyaniline modified gold electrode. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 57, p. 69–77, 2014.

BATRA, B.; PUNDIR, C.S. An amperometric glutamate biosensor based on immobilization of glutamate oxidase onto carboxylated multiwalled carbon nanotubes/gold nanoparticles/chitosan composite film modified Au electrode. **Biosensors & Bioelectronics**, v. 47, p. 496–501, 2013.

BELSHAM, B. Glutamate and its role in psychiatric illness. **Human Psychopharmacology**, v. 16, n. 2, p. 139–146, 2001.

BIANYING, F.; LINJIE, G.; LIHUA, W.; FAN, L.; JIANXIN, L.; JIMIN, G.; CHUNHAI, F.; QING, H. A Graphene oxide-based fluorescent biosensor for the analysis of peptide–receptor interactions and imaging in somatostatin receptor subtype 2 overexpressed tumor cells. **Analytical Chemistry**, v. 85, p. 7732–7737, 2013.

CAMPOS, F.; PÉREZ-MATO, M.; AGULLA, J.; BLANCO, M.; BARRAL, D.; ALMEIDA, A.; BREA, D.; WAEBER, C.; CASTILLO, J.; RAMOS-CRABER, P. Glutamate excitotoxicity is the key molecular mechanism which is influenced by body temperature during the acute phase of brain stroke. **PloS One**, v. 7, n. 8, p. e44191, 2012.

CAVUS, I.; KASOFF, W.; CASSADAY, M.; JACOB, R., GUEORGUIEVA, R.; SHERWIN, R. Extracellular metabolites in the cortex and hippocampus of epileptic patients. **Annals of Neurology**, v. 57, n. 2, p. 226–235, 2005.

CHAKRABORTY, S.; RAJ, C.R. Amperometric biosensing of glutamate using carbon nanotube based electrode. **Electrochemistry Communications**, v. 9, n. 6, p. 1323–1330, 2007.

CHAMPE, P.C.; HARVEY, R.A.; FERRIER, D.R. **Bioquímica ilustrada**. 3.ed., Porto Alegre: Artmed, 2006.

CONROY, P.J.; HEARTY, S.; LEONARD, P.; O'KENNEDY, R.J. Antibody production, design and use for biosensor-based applications. **Seminars in Cell & Developmental Biology**, v. 20, n. 1, p. 10–26, 2009.

CUI, Y.; KIM, S.N.; NAIK, R.R.; MCALPINE, M.C. Biomimetic Peptide Nanosensors. **Accounts of Chemical Research**, v. 45, n. 5, p. 696–704, 2012.

CUI, Y.; BARFORD, J.P.; RENNEBERG, R. Development of an interference-free biosensor for l-glutamate using a bienzyme salicylate hydroxylase/l-glutamate dehydrogenase system. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 41, n. 6-7, p. 689–693, 2007a.

CUI, Y.; BARFORD, J.P.; RENNEBERG, R. Development of an l-glutamate biosensor using the coimmobilization of l-glutamate dehydrogenase and p-hydroxybenzoate hydroxylase on a Clark-type electrode. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 127, n. 2, p. 358–361, 2007b.

D'ORAZIO, P. Biosensors in clinical chemistry. **Clinica Chimica Acta**, v. 334, p. 41–69, 2003.

D'ORAZIO, P. Biosensors in clinical chemistry - 2011 update. **Clinica Chimica Acta**, v. 412, n. 19-20, p. 1749–61, 2011.

D'SOUZA, S. F. Microbial biosensors. **Biosensors & Bioelectronics**, v. 16, n. 6, p. 337–53, 2001.

DAI, C. e CHOI, S. Technology and Applications of Microbial Biosensor. **Open Journal of Applied Biosensor**, v. 2, p. 83–93, 2013.

DAVYDOVA, T. V., VOSKRESENSKAYA, N.I.; GORBATOV, V.Y.; FOMINA, V.G.; DORONINA, O.A., MAKSUNOVA, I.V. Production of Autoantibodies to Glutamate during Alzheimer's Dementia. **Bulletin of Experimental Biology and Medicine**, v. 147, n. 4, p. 405–407, 2009.

DOONG, R.; LEE, P.-S.; ANITHA, K. Simultaneous determination of biomarkers for Alzheimer's disease using sol-gel-derived optical array biosensor. **Biosensors & Bioelectronics**, v. 25, n. 11, p. 2464–2469, 2010.

DOONG, R.; SHIH, H. Glutamate optical biosensor based on the immobilization of glutamate dehydrogenase in titanium dioxide sol-gel matrix. **Biosensors & Bioelectronics**, v. 22, n. 2, p. 185–91, 2006.

DROUVALAKIS, K. A.; BANGSARUNTIP, S.; HUEBER, W.; KOZAR, L.G.; UTZ, P.J.; DAI, H. Peptide-coated nanotube-based biosensor for the detection of disease-specific autoantibodies in human serum. **Biosensors & Bioelectronics**, v. 23, n. 10, p. 1413–21, 2008.

FARRÉ, M.; BARCELÓ, D. Sensor , biosensors and MIP based sensors. In: PICÓ, Y. (ed.). **Food Toxicants Analysis**, Elsevier: Amsterdam, 2007, p. 599–636.

FAYED, N.; MODREGO, P.J.; ROJAS-SALINAS, G.; AGUILAR, K. Brain glutamate levels are decreased in Alzheimer's disease: a magnetic resonance spectroscopy study. **American Journal of Alzheimer's Disease and Other Dementias**, v. 26, n. 6, p. 450–456, 2011.

FRANCIS, P. T. Glutamatergic systems in Alzheimer ' s disease. **International Journal of Geriatric Psychiatry**, v.18, p. S15-S21, 2003.

GERASIMOV, J.Y.; LAI, R.Y. An electrochemical peptide-based biosensing platform for HIV detection. **Chemical communications**, v. 46, n. 3, p. 395–377, 2010.

GOLAN, E.D.; TASHJIAN, A.H.; ARMSTRONG, E.J.; ARMSTRONG, A.W. **Princípios de Farmacologia: A base fisiopatológica da farmacoterapia**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2009.

GÓMARA, M.J.; ERCILLA, G.; ALSINA, M.A.; HARO, I. Assessment of synthetic peptides for hepatitis A diagnosis using biosensor technology. **Journal of Immunological Methods**, v. 246, n. 1-2, p. 13–24, 2000.

GOPINATH, S.C.B.; TANG, T.-H.; CITARTAN, M.; CHEN, Y.; LAKSHMIPRIYA, T. Current aspects in immunosensors. **Biosensors & Bioelectronics**, v. 57, p. 292–302, 2014.

GOTTLIEB, M.; WANG, Y.; TEICHBERG, V.I. Blood-mediated scavenging of cerebrospinal fluid glutamate. **Journal of Neurochemistry**, v. 87, n. 1, p. 119–126, 2003.

GRAHAM, L.; APRISON, M. Fluorometric determination of aspartate, glutamate, and γ -aminobutyrate in nerve tissue using enzymic method. **Analytical Biochemistry**, v. 15, n. 3, p. 487–497, 1996.

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

GRIFFIN, G.; STRATIS-CULLUM, D. **Biosensors**. In: SCHAECHTER, M. (ed.) *Encyclopedia of Microbiology* (Third Edition). Academic Press, 2009, p. 88–103.

GUAN, J.-G.; MIAO, Y.-Q. e ZHANG, Q.-J. Impedimetric biosensors. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 97, n. 4, p. 219–26, 2004.

GUYTON, A. C.; HALL, J. **Tratado De Fisiologia Médica**. 9ª edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1997.

HASSAN, T. H.; ABDELRAHMAN, H.M.; FATTAH, N.R.A.; EL-MASRY, N.M.; HASHIM, H.M.; EL-GERBY, K.M.; FATTAH, N.R.A. Blood and brain glutamate levels in children with autistic disorder. **Research in Autism Spectrum Disorders**, v. 7, n. 4, p. 541–548, 2013.

HAWKINS, R. A. The blood-brain barrier and glutamate. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 90, n.3, p. 867S–874S, 2009.

HENNESSEY, H.; AFARA, N.; OMANOVIC, S.; PADJEN, A.L. Electrochemical investigations of the interaction of C-reactive protein (CRP) with a CRP antibody chemically immobilized on a gold surface. **Analytica Chimica Acta**, v. 643, n. 1-2, p. 45–53, 2009.

HOUSSIN, T.; SENEZ, V. **Electrochemical Detection**. In: BRIDLE, H. (ed.) *Waterborne Pathogens Detection Methods and Applications*. Academic Press, 2014, p. 147–188.

HUAN, T.N.; HA, V.T.T.; HUNG, L.Q.; YOON, M.-Y., HAN, S.-H., CHUNG, H. Square wave voltammetric detection of Anthrax utilizing a peptide for selective recognition of a protein biomarker. **Biosensors & Bioelectronics**, v. 25, n. 2, p. 469–474, 2009.

HYND, M.R.; SCOTT, H. L.; DODD, P.R. Glutamate-mediated excitotoxicity and neurodegeneration in Alzheimer's disease. **Neurochemistry International**, v. 45, n. 5, p. 583–595, 2004.

IRANZO, A. Neurodegenerative Diseases and Sleep. In: KUSHIDA, C. (ed.) **Encyclopedia of Sleep**. Academic Press, 2013, p. 362–369.

JAMAL, M.; XU, J.; RAZEEB, K. M. Disposable biosensor based on immobilisation of glutamate oxidase on Pt nanoparticles modified Au nanowire array electrode. **Biosensors & Bioelectronics**, v. 26, n. 4, p. 1420–4, 2010.

KANG, X.B.; PANG, G.C.; LIANG, X.Y.; WANG, M.; LIU, J.; ZHU, W.M. Study on a hydrogen peroxide biosensor based on horseradish peroxidase/GNPs-thionine/chitosan. **Electrochimica Acta**, v. 62, n. 2012, p. 327–334, 2012.

KANYONG, P.; PEMBERTON, R.M.; JACKSON, S.K.; HART, J.P. Development of a sandwich format, amperometric screen-printed uric acid biosensor for urine analysis. **Analytical Biochemistry**, v. 428, n. 1, p. 39–43, 2012.

KAPCZINSKI, F.; QUEVEDO, J.; IZQUIERDO, I. **Bases Biológicas dos Transtornos Psiquiátricos: Uma Abordagem Translacional**. Porto Alegre: Artmed, 2011.

KATZUNG, B. G.; MASTERS, S. B.; TREVOR, A. J. **Farmacologia Básica e Clínica**. 12^a ed. Porto Alegre: AMGH, 2014.

LEIBOWITZ, A.; BOYKO, M.; SHAPIRA, Y.; ZLOTNIK, A. Blood glutamate scavenging: insight into neuroprotection. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 13, n. 8, p. 10041–10066, 2012.

LI, F.; CHEN, W.; DONG, P.; ZHANG, S. A simple strategy of probe DNA immobilization by diazotization-coupling on self-assembled 4-aminothiophenol for DNA electrochemical biosensor. **Biosensors & Bioelectronics**, v. 24, n. 7, p. 2160–2164, 2009.

LI, R.; HUANG, H.; HUANG, L.; LIN, Z.; GUO, L.; QIU, B.; CHEN, G. Electrochemical biosensor for epidermal growth factor receptor detection with peptide ligand. **Electrochimica Acta**, v. 109, p. 233–237, 2013.

LI, Y.; AFRASIABI, R.; FATHI, F.; WANG, N.; XIANG, C.; LOVE, R.; SHE, Z.; KRAATZ, H.B. Impedance based detection of pathogenic E. coli O157:H7 using a ferrocene-antimicrobial peptide modified biosensor. **Biosensors & Bioelectronics**, v. 58, p. 193–199, 2014.

LIN, C.; KONG, Q.; CUNY, G.; GLICKSMAN, M. Glutamate transporter EAAT2: a new target for the treatment of neurodegenerative diseases. **Future Medicinal Chemistry**, v. 4, n. 13, p. 1689–1700, 2012.

LIN, J. e JU, H. Electrochemical and chemiluminescent immunosensors for tumor markers. **Biosensors & Bioelectronics**, v. 20, n. 8, p. 1461–70, 2005.

MCGRATH, T. F.; ANDERSSON, K.; CAMPBELL, K.; FODEY, T.L.; ELLIOTT, C.T. Development of a rapid low cost fluorescent biosensor for the detection of food contaminants. **Biosensors & Bioelectronics**, v. 41, n. 2013, p. 96–102, 2013.

MUSLIM, N. Z. M.; AHMAD, M.; HENG, L.Y.; SAAD, B. Optical biosensor test strip for the screening and direct determination of l-glutamate in food samples. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 161, n. 1, p. 493–497, 2012.

MEHRVAR, M.; ABDI, M. Recent developments, characteristics, and potential applications of electrochemical biosensors. **Analytical sciences**, v. 20, n. 8, p. 1113–1126, 2004.

MONOŠÍK, R.; STREĎANSKÝ, M.; GREIF, G.; ŠTURDÍK, E. A rapid method for determination of l-lactic acid in real samples by amperometric biosensor utilizing nanocomposite. **Food Control**, v. 23, n. 1, p. 238–244, 2012.

MURUGAIYAN, S.B.; RAMASAMY, R.; GOPAL, N.; KUZHANDAIVELU, V. Biosensors in clinical chemistry: An overview. **Advanced Biomedical Research**, v. 3, n. 67, p. 1-22, 2014.

NEDERGAARD, M.; TAKANO, T.; HANSEN, A. J. Beyond the role of glutamate as a neurotransmitter. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 3, n. 9, p. 748–55, 2002.

O'KANE, R.L.O.; MARTÍNEZ-LOPEZ, I.; DEJOSEPH, M.R.; VIÑA, J.R.; HAWKINS, R.A. Na⁺-dependent glutamate transporters (EAAT1, EAAT2, and EAAT3) of the blood-brain barrier, a mechanism for glutamate removal. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 274, p. 31891–31895, 1999.

OLNEY, J.W. Brain lesions, obesity, and other disturbances in mice treated with monosodium glutamate. **Science**, v. 164, n. 3880, p. 719–721, 1969.

PACHECO, W. F.; SEMAAN, F.S.; ALMEIDA, V.G.K.; RITA, A.G.S.L.; AUCÉLIO, R.Q. Voltametrias : Uma Breve Revisão Sobre os Conceitos. **Revista Virtual de Química.**, v. 5, n. 4, p. 516–537, 2013.

PALOMINO, A.; GONZÁLEZ-PINTO, A.; ALDAMA, A.; GONZÁLEZ-GÓMEZ, C.; MOSQUERA, F.; GONZÁLEZ-GARCÍA, G.; MATUTE, C. Decreased levels of plasma glutamate in patients with first-episode schizophrenia and bipolar disorder. **Schizophrenia Research**, v. 95, n. 1-3, p. 174–8, 2007.

PAN, J.W.; WILLIAMSON, A. CAVUS, I.; HETHERINGTON, H.P.; ZAVERI, H.; PETROFF, O.A.; SPENCER, D.D. Neurometabolism in human epilepsy. **Epilepsia**, v. 49, p. 31–41, 2008.

PAVAN, S.; BERTI, F. Short peptides as biosensor transducers. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 402, n. 10, p. 3055–70, 2012.

PEI, X.; ZHANG, B.; TANG, J.; LIU, B.; LAI, W.; TANG, D. Sandwich-type immunosensors and immunoassays exploiting nanostructure labels: A review. **Analytica Chimica Acta**, v. 758, p. 1–18, 2013.

PERUMAL, V.; HASHIM, U. Advances in biosensors: Principle, architecture and applications. **Journal of Applied Biomedicine**, v. 12, n. 1, p. 1–15, 2014.

PLATT, S. R. The role of glutamate in central nervous system health and disease--a review. **The Veterinary Journal**, v. 173, n. 2, p. 278–86, 2007.

FERREIRA, R.Q.; AVACA, L.A. Determinação eletroquímica da capacidade antioxidante de sucos de frutas industrializadas usando o CRAC assay. **Química Nova**. v. 31, n. 8, p. 2169–2173, 2008.

RAMANATHAN, K.; DANIELSSON, B. Principles and applications of thermal biosensors. **Biosensors & Bioelectronics**, v. 16, n. 6, p. 417–23, 2001.

RAMÍREZ, N.; SALGADO, A. M.; VALDMAN, B. The evolution and developments of immunosensors for health and environmental monitoring: problems and perspectives. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 26, n. 2, p. 227–249, 2009.

RICCI, F., ADORNETTO, G.; PALLESCHI, G. A review of experimental aspects of electrochemical immunosensors. **Electrochimica Acta**, v. 84, p. 74–83, 2012.

RUPSINGH, R.; BORRIE, M.; SMITH, M.; WELLS, J.L.; BARTHA, R. Reduced hippocampal glutamate in Alzheimer disease. **Neurobiology of Aging**, v. 32, n. 5, p. 802–10, 2011.

RUSHWORTH, J. V.; AHMED, A.; GRIFFITHS, H.H.; POLLOCK, N.M.; HOOPER, N.M.; MILLNER, P.A. A label-free electrical impedimetric biosensor for the specific detection of Alzheimer's amyloid-beta oligomers. **Biosensors & Bioelectronics**, v. 56, n. 2014, p. 83–90, 2014.

SARI, M. M. Fluorescein isothiocyanate conjugated graphene oxide for detection of dopamine. **Materials Chemistry and Physics**, v. 138, n. 2-3, p. 843–849, 2013.

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

SATTLER, R.; TYMIANSKI, M. Molecular mechanisms of calcium-dependent excitotoxicity. **Journal of Molecular Medicine**, v. 78, n. 1, p. 3–13, 2000.

SHEN, J. Glutamate. In: STAGG, C.; ROTHMAN, D. **Magnetic Resonance Spectroscopy**. Academic Press, 2014, p. 111-121.

SILVA, T.A.R.; FERREIRA, L.F.; SOUZA, L.M.; GOULART, L.R.; MADURRO, J.M.; BRITO-MADURRO, A.G. New approach to immobilization and specific-sequence detection of nucleic acids based on poly(4-hydroxyphenylacetic acid). **Materials Science and Engineering: C**, v. 29, n. 2, p. 539–545, 2009.

SMITH, Q. R. Transport of glutamate and other amino acids at the blood-brain barrier. **The Journal of Nutrition**, v. 130, p. 1016S–1022S, 2000.

SONG, S.; XU, H.; FAN, C. Potential diagnostic applications of biosensors: current and future directions. **International Journal of Nanomedicine**, v. 1, n. 4, p. 433–40, 2006.

SOUZA, D.; MACHADO, S.A.S.; AVACA, L.A. Voltametria de onda quadrada. Primeira parte: aspectos teóricos. **Química Nova**, v. 26, n. 1, p. 81–89, 2003.

TANG, L.; ZHU, Y.; XU, L.; YANG, X.; LI, C. Amperometric glutamate biosensor based on self-assembling glutamate dehydrogenase and dendrimer-encapsulated platinum nanoparticles onto carbon nanotubes. **Talanta**, v. 73, n. 3, p. 438–443, 2007.

TELES, F.; FONSECA, L. Trends in DNA biosensors. **Talanta**, v. 77, n. 2, p. 606–623, 2008.

THEVENOT, D.R.; TOTH, K.; DURST, R.A.; WILSON, G.S. Technical report Electrochemical biosensors: recommended definitions and classification. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 16, p. 121–131, 2001.

TIAN, F. GOURINE, A.V.; HUCKSTEPP, R.T.R.; DALE, N. A microelectrode biosensor for real time monitoring of L-glutamate release. **Analytica Chimica Acta**, v. 645, n. 1-2, p. 86–91, 2009.

TSAPAKIS, E. M. Glutamate and psychiatric disorders. **Advances in Psychiatric Treatment**, v. 8, n. 3, p. 189–197, 2002.

TSIERKEZOS, N. G.; KNAUER, A.; RITTER, U. Thermodynamic investigation of ferrocyanide/ferricyanide redox system on nitrogen-doped multi-walled carbon nanotubes decorated with gold nanoparticles. **Thermochimica Acta**, v. 576, n. 2014, p. 1–8, 2014.

WAN, Y.; SU, Y.; ZHU, X.; LIU, G.; FAN, C. Development of electrochemical immunosensors towards point of care diagnostics. **Biosensors & Bioelectronics**, v. 47, p. 1–11, 2013.

WANG, G.; ZHOU, Y.; HUANG, F.J.; TANG, H.D.; XU, X.H.; LIU, J.J.; WANG, Y.; DENG, Y.L.; REN, R.J.; XU, W.; MA, J.F.; ZHANG, Y.N.; ZHAO, A.H.; CHEN, S.D.; JIA, W. Plasma metabolite profiles of Alzheimer's Disease and Mild Cognitive Impairment. **Journal of Proteome Research**, v. 13, n. 5, p. 2649-2658, 2014.

WANG, H.; SHEN, G.; YU, R. Aspects of recent development of immunosensors. In: ZHANG, X.; JU, H.; WANG, J. **Electrochemical Sensors, Biosensors and their Biomedical Applications**. Academic Press, 2008, p. 237-260.

WANG, K.; TAO, Z.-H.; XU, L.; LIU, Y.-Q. Research and development of functionalized aptamer based biosensor. **Chinese Journal of Analytical Chemistry**, v. 42, n. 2, p. 298–304, 2014.

WANG, X.; LU, X.; CHEN, J. Development of biosensor technologies for analysis of environmental contaminants. **Trends in Environmental Analytical Chemistry**, v. 2, p. 25-32, 2014.

WHO (World Health Organization), Neurological disorders: public health challenges. Geneva, 2006.

WU, J.; CROPEK, D.M.; WEST, A.C.; BANTA, S. development of a troponin I biosensor using a peptide obtained through phage display. **Analytical Chemistry**, v. 82, p. 8235–8243, 2010.

WU, J.; PARK, J.P.; DOOLEY, K.; CROPEK, D.M.; WEST, A.C.; BANTA, S. Rapid development of new protein biosensors utilizing peptides obtained via phage display. **PloS One**, v. 6, n. 10, p. e24948, 2011.

YÁÑEZ-SEDEÑO, P.; AGÜÍ, L.; VILLALONGA, R.; PINGARRÓN, J. Biosensors in forensic analysis. A review. **Analytica Chimica Acta**, v. 823, p. 1-19, 2014.

ZAITOUNA, A. J.; LAI, R.Y. An electrochemical peptide-based Ara h 2 antibody sensor fabricated on a nickel(II)-nitriloacetic acid self-assembled monolayer using a His-tagged peptide. **Analytica Chimica Acta**, v. 828, p. 85–91, 2014.

ZHANG, X.; GAO, F.; CAI, X.; ZHENG, M.; GAO, F.; JIANG, S.; WANG, Q. Application of graphene-pyrenebutyric acid nanocomposite as probe oligonucleotide immobilization platform in a DNA biosensor. **Materials Science & Engineering. C**, v. 33, n. 7, p. 3851–3857, 2013a.

ZHANG, Y.; ISLAN, N.; CARBONELL, R.G.; ROJAS, O.J. specificity and regenerability of short peptide ligands supported on polymer layers for immunoglobulin G binding and detection. **ACS Applied Materials & Interfaces**, v. 5, p. 8030-8037, 2013b.

CAPÍTULO 2

DEVELOPMENT OF A MIMETIC BIOSENSOR FOR DETECTION OF GLUTAMATE

O capítulo 2 está de acordo com as normas da revista Materials Science and Engineering: C - Materials for Biological Applications

(<http://www.journals.elsevier.com/materials-science-and-engineering-c/>)

Development of a mimetic biosensor for detection of glutamate

Lívia M. Alves^a, Ana C. H. Castro^a, Luiz C. de Oliveira Júnior^a, Carlos U. Vieira^a,
Luiz R. Goulart^a, Ana M. Bonetti^a, João M. Madurro^b, Ana G. Brito-Madurro^{a*}

a. Institute of Genetics and Biochemistry, Federal University of Uberlândia,
Uberlândia, Brazil

b. Institute of Chemistry, Federal University of Uberlândia, Uberlândia, Brazil

*Author to whom correspondence should be addressed. Tel. +55 34 32182203;
Fax: +55 3432182203; E-mail: agbrito@iqufu.ufu.br

Abstract

A mimetic biosensor was developed for the detection of glutamate, the main excitatory neurotransmitter present in the central nervous system of mammals. This sensor is based on the immobilization of the mimetic peptide for glutamate onto graphite electrodes. The biosensor showed interesting characteristics, such as short response time (about 10 s), limits of detection of 1 nmol.L^{-1} ($n=3$) and linear response range between 1 nmol.L^{-1} and 10 mmol.L^{-1} for glutamate, indicating to be a promising approach for the diagnosis of neurological diseases. In addition, it was possible to observe differences in charge transfer resistance and in surface topography of the electrode, after the interaction with the glutamate target. The mimetic biosensor discriminates samples from patients with neurological disorders.

Keywords: mimetic biosensor, glutamate, peptide ligand, fluorescein isothiocyanate

Resumo

Um biossensor mimético foi desenvolvido para a detecção de glutamato, principal neurotransmissor excitatório presente no sistema nervoso central dos mamíferos. Este sensor é baseado na imobilização de peptídeo mimético para glutamato em eletrodos de grafite. O biossensor apresenta características interessantes, tais como, rápida resposta (cerca de 10 s), limite de detecção de 1 nmol.L^{-1} ($n=3$) e faixa linear de resposta entre 1 nmol.L^{-1} e 10 mmol.L^{-1} de glutamato, indicando ser uma abordagem promissora para o diagnóstico de doenças neurológicas. Em adição, foi possível observar diferenças na resistência à transferência de carga e na topografia da superfície do eletrodo, após interação com o alvo glutamato. O biossensor mimético discrimina amostras de pacientes com distúrbios neurológicos.

Palavras- chave: biossensor mimético, glutamato, peptídeo ligante, isotiocianato de fluoresceína

1. Introduction

The amino acid glutamate (Glu) is the main excitatory neurotransmitter widely distributed in the central nervous system of mammals [1], and plays an important role in maintaining the functional aspects of the brain, such as cognition, learning, memory and motor control [2, 3].

Neurodegenerative disorders are characterized by neuronal loss in the central nervous system, leading to progressive cognitive impairment, movement disorders, and psychiatric disturbances [4].

These disorders are costly to the society, presenting an increasing prevalence and representing a serious public health issue. According to the World Health Organization, neurological disorders are an important cause of mortality which constitute 12% of total deaths globally [5]. Some studies show a relationship between glutamate levels in the blood and several neurological diseases such as traumatic brain injury, stroke, motor neuron disease, depression, dementia, schizophrenia, autism, epilepsy, Alzheimer's, Parkinson's and Huntington's disease [6-9]. Therefore, this amino acid is an important target analyte to aid in the diagnosis of these diseases.

A study of autistic children showed an increase in glutamate levels in the blood and brain [8]. In patients with motor neuron disease (or Amyotrophic Lateral Sclerosis) a significant increase in plasma glutamate were also observed [6]. Studies using *in vivo* microdialysis in epilepsy patients show a significant increase in extracellular levels of glutamate, neurotoxic concentrations that affect the hippocampus before and during the onset of seizures [10]. Tests using magnetic resonance spectroscopy also showed this profile of increased extracellular glutamate levels in epilepsy patients [11].

Different techniques have been described and used for the analysis of glutamate, such as chromatography [12], spectrophotometry, fluorometry [13], capillary electrophoresis, microdialysis [10] and magnetic resonance imaging (MRI) *in vivo* [11,12]. Although sensitive, these methods have some limitations, including the time for sample preparation, expensive equipment and skilled personnel to operate.

Among several techniques developed, biosensors are one of the most rapidly growing techniques for the detection of glutamate [14–17]. Electrochemical biosensors are able to perform direct transduction of the biomolecular recognition event and convert it into an electronic signal that presents real-time response and low detection limits. Therefore, these devices are attractive due to the sensitive and specific detection of a target analyte [18–20].

Due to the great advances in molecular biology, biochemistry, genetics, and immunology, a wide range of biomolecules is commonly used as a biological recognition element in the construction of biosensors, such as enzymes [17], antibodies [21], nucleic acids [22], cells and peptides [23, 24].

In recent years, small synthetic peptides that mimic the mechanism of molecular recognition in biomolecules, such as enzymes, antibodies, receptors, transmembrane proteins and transporters, have been used as a biological recognition element in the development of biosensors with a wide variety of target analytes [25–28]. Gómara et al. [23] demonstrated the use of an optical biosensor for the detection of antibodies for hepatitis A virus in sera from patients using synthetic peptides as a recognition element. Zhang et al. [29] developed a method based on short peptides for the detection of immunoglobulin G. Li et al. [24] used binding peptides for the development of an electrochemical biosensor for epidermal growth factor receptor, involved in different types of cancers.

In order to monitor glutamate, researchers have developed biosensors using various methods and materials to obtain suitable performance. This work describes an approach of mimetic peptide immobilization onto graphite electrodes and its application in the construction of an electrochemical biosensor for the determination of glutamate.

2. Experimental

2.1 Materials

All reagents used were of analytical grade without previous purification. Ultra high purity water (Master System, Gehaka, Brazil) was used for the preparation of all solutions. L-glutamic acid (monosodium salt, 99%) was

purchased from Sigma-Aldrich (USA). The detection of glutamate was performed in 0.1 mol.L⁻¹ phosphate buffer (Na₂HPO₄ 0.061 mol.L⁻¹, NaH₂PO₄ 0.039 mol.L⁻¹, pH = 7.4). All solutions were deoxygenated by ultra-pure nitrogen bubbling for at least 45 minutes before use. Experiments were conducted at room temperature (25 ± 1)°C.

The glutamate-binding mimetic peptide employed in this study was isolated (unpublished results), and the specific peptide sequence with an attached fluorescein isothiocyanate (FITC) moiety (Ac-NHWLSPL[Lys(FITC)]) was synthesized by GenScript USA Inc.

2.2 Apparatus

The electrochemical studies were performed in a potentiostat (Autolab PGSTAT302N, Eco Chemie). A graphite disk (6.15 mm diameter, purity 99.9995%) from Alfa Aesar was used as working electrode. A platinum plate and silver/silver chloride (3.0 mol.L⁻¹) were used as auxiliary and reference electrodes, respectively. Surface morphology in the absence or presence of biomolecules was assessed by atomic force microscopy (AFM) (SPM 9600, Shimadzu).

2.3. Sensor preparation and detection of the glutamate target

The bare graphite electrode was polished mechanically with alumina (0.3 µm) slurry, sonicated, washed with deionized water, dried in air and preconditioned in 0.5 mol.L⁻¹ H₂ClO₄ solution by cyclic voltammetry between -0.5 and +1.1V, for 4 cycles, at a scan rate of 50 mV.s⁻¹. The solution containing 200 µg/mL of peptide probes was dropped onto electrode surface and dried at 35°C for 30 minutes. The modified electrodes were incubated with different concentrations of glutamate (1 nmol.L⁻¹, 1 µmol.L⁻¹, 1 mmol.L⁻¹ and 10 mmol.L⁻¹) at 35°C, for 30 minutes. After each modification and binding step, the electrodes were washed with phosphate buffer, for 5 seconds, under agitation and dried with ultra pure nitrogen to remove unbound materials on the electrode surface.

2.4. Calibration curve

To evaluate the sensitivity and detection limit of the biosensor, 10 µL of different concentrations of glutamate (1 nmol.L⁻¹, 1 µmol.L⁻¹, 1 mmol.L⁻¹ and 10 mmol.L⁻¹) were added to the biosensor, and maintained at 35°C, for 30 minutes.

For the detection, phosphate buffer, pH 7.4 was used as electrolyte. The factors 3.0 and 10.0 were used for the determinations of the detection limit and quantification limit using three independent experiments.

2.5. Performance of biomimetic sensor using real sample

Serum samples from healthy individuals and patients diagnosed with Alzheimer's were collected from the Clinics Hospital of the Federal University of Uberlândia (Uberlândia, MG- Brazil). Samples from healthy individuals were enriched with glutamate in order to evaluate the applicability of the system to real sample analysis, and samples from patients diagnosed with Alzheimer's were analyzed for Glu. The samples were applied to the mimetic sensor at 35°C, for 30 minutes. After the binding step of the target, the electrodes were rinsed by immersion in phosphate buffer for 5 s under agitation. Phosphate buffer pH 7.4 was used as electrolyte for the detection assay.

2.6. Electrochemical impedance spectroscopy

Electrochemical impedance spectra were measured at 0.2 V in 10 mmol.L⁻¹ K₃Fe(CN)₆/K₄Fe(CN)₆ solution containing 0.1 mol.L⁻¹ KCl for graphite electrodes modified with probe peptide in absence or presence of the target glutamate. The solution was deaerated with ultra pure nitrogen 45 minutes, and the measurements were performed at room temperature (25 ± 1)°C, in conventional three electrode cell, using a platinum plate as counter electrode and a silver/silver chloride (3.0 mol.L⁻¹) as reference electrode. The open circuit potential was monitored and the electrochemical impedance spectra measured after its stabilization. The frequency range accessed covered the 50 KHz and 10 mHz interval. A sinusoidal excitation amplitude of 10 mV (p/p) was used.

3. Results and discussion

3.1. Immobilization of peptide onto graphite electrodes

The interactions that occur on the electrode surface can be observed by monitoring the alterations in the electron transfer of a well-known redox system, [Fe(CN)₆]⁴⁻/[Fe(CN)₆]³⁻ [30-31]. This redox pair was used as probe to demonstrate

the adsorption of peptide on the surface of the transducer by cyclic voltammetry (Fig. 1).

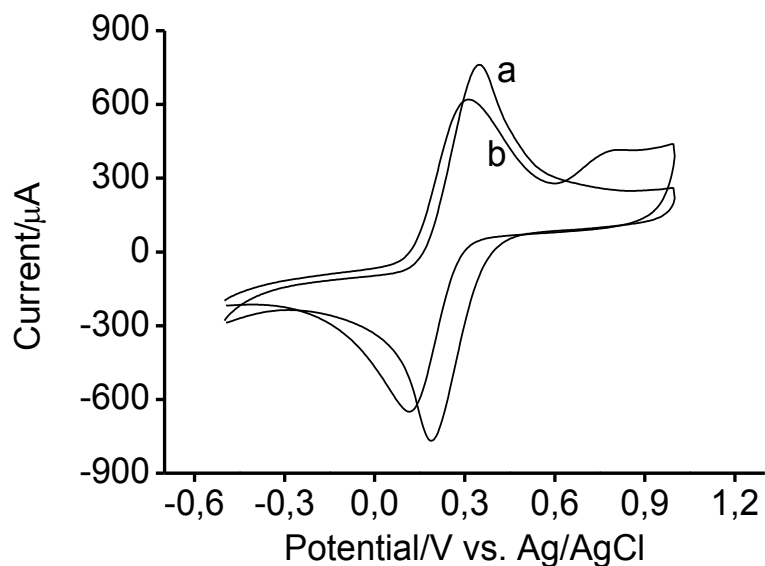


Figure 1. Cyclic voltammograms of graphite electrode (a) and graphite electrode modified with peptide probe (b) in $10 \text{ mmol.L}^{-1} \text{ K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6/\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ solution containing $0.1 \text{ mol.L}^{-1} \text{ KCl}$. Scan rate: 100 mV.s^{-1} .

Fig. 1 shows a decrease in the current values of the redox couple in presence of the peptide, indicating that the biomolecule was immobilized onto bare graphite electrode, reducing the electron transfer of the redox couple to the electrode.

The Fig. 2 shows the immobilization of the peptide-FITC onto bare graphite electrode.

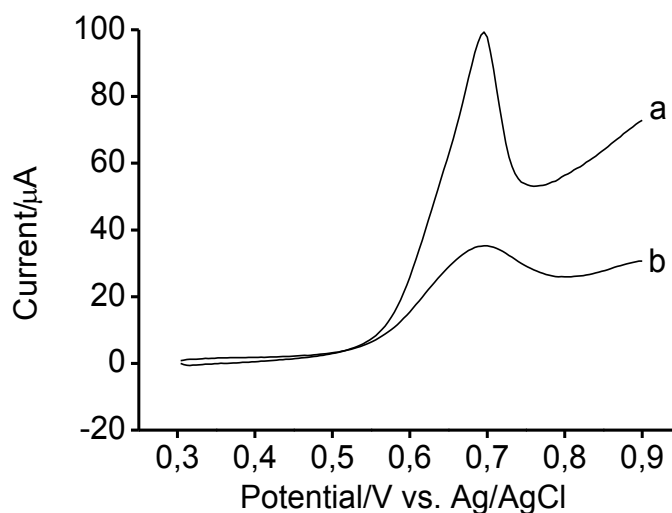


Figure 2. Differential pulse voltammograms of FITC (a) and peptide conjugated with FITC (b). Electrolyte: 0.1 mol.L^{-1} phosphate buffer, pH 7.4. Modulation amplitude: 25 mV. Pulse interval: 0.2 s; 20 mV.s^{-1} .

Figure 2 shows a peak at +0.7 V for FITC (Fig. 2a) and peptide-FITC (Fig. 2b). The peak was attributed to oxidation of fluorescein isothiocyanate and used as indicator for the construction of the biosensor.

Some studies report the behavior of peptide adsorption onto the graphene surface by basic amino acids (Lys, His, and Arg) and aromatic amino acids (Trp, Tyr, and Phe). These structures contribute to the electrostatic force and π - π interaction with negative-charged graphene [32, 33].

In this work, the peptide-FITC was incorporated on the graphite electrode surface, after electrochemical preconditioning, allowing electrostatic interactions with the amino acids of the peptide probe.

3.2. Detection of glutamate

Bare graphite electrode sensitized with peptide-FITC was applied to the detection of glutamate, using FITC as an indicator of the interaction peptide: glutamate (Fig. 3).

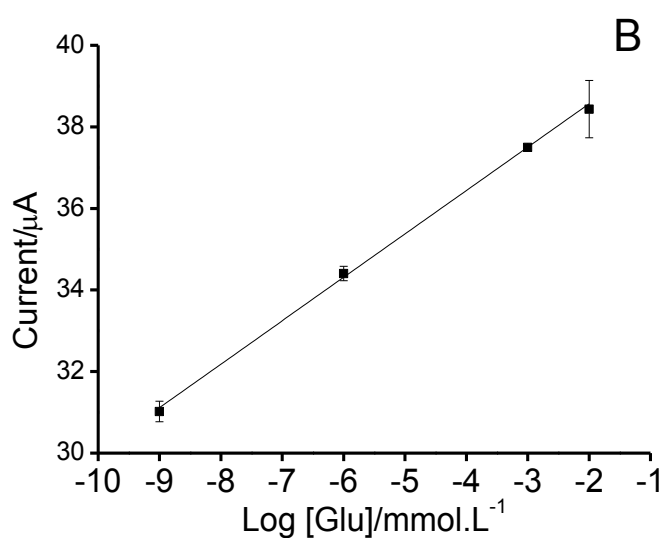
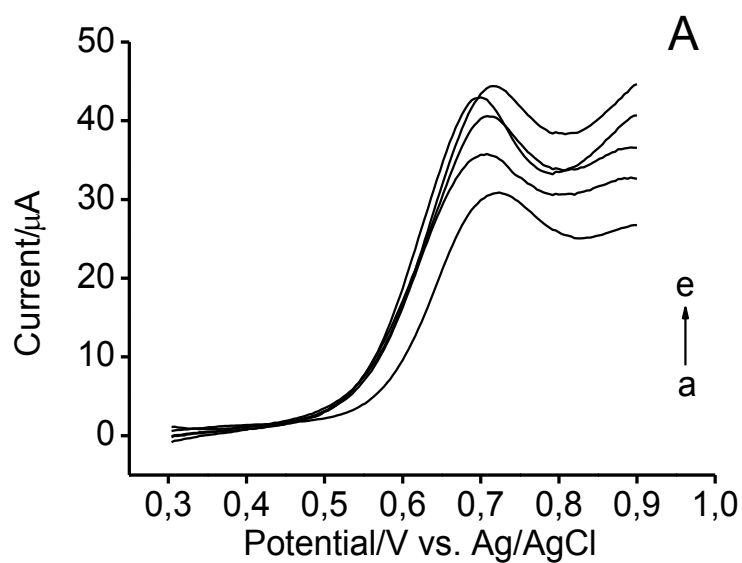


Figure 3. (A) Differential pulse voltammograms of bare graphite electrode containing peptide-FITC in absence (a) or presence of the glutamate in different concentrations: 1 nmol.L⁻¹ (b), 1 µmol.L⁻¹ (c) 1 mmol.L⁻¹ (d) and 10 mmol.L⁻¹ (e) . Electrolyte: 0.10 mol.L⁻¹ phosphate buffer, pH 7.4. Modulation amplitude: 25 mV. Pulse interval: 0.2 s; 20 mV.s⁻¹. (B) Calibration data for the oxidation signal of FITC obtained after incubation in different concentrations of glutamate.

Fig. 3A shows an increase in current with the increase of glutamate concentration. Fig. 3B shows a linear relationship of current with the logarithm of

the glutamate concentration in the range of 1 nmol.L⁻¹ at 10 mmol.L⁻¹. The limits of detection and quantification for glutamate were 1 nmol.L⁻¹ with correlation coefficient of 0.999.

Different methods for detection of glutamate have been described in the literature but all based on the immobilization of enzymes [16-34]. The platform developed in this work using mimetic peptide presented a lower limit of detection than other electrochemical sensors described in the literature for detection of glutamate [35-36].

The mechanism proposed for the electrochemical peptide biosensor is represented in Fig. 4.

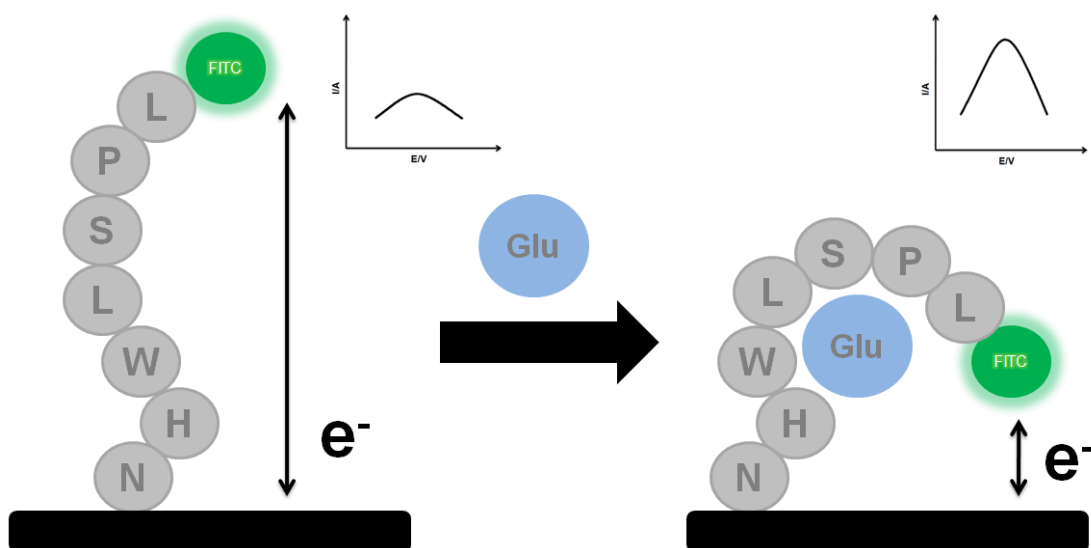


Figure 4. Proposed mechanism for the electrochemical peptide-based biosensing platform for glutamate detection. Peptide: Ac-NHWLSPL[Lys(FITC)], Glu: glutamate.

As represented in Fig. 4, the interaction between peptide-FITC (probe) and glutamate (target) promotes conformational changes in the peptide structure. This alteration reduces the electron-transfer distance between the graphite electrode and the electroactive molecule (FITC), causing an increase in the current values.

3.3. Electrochemical impedance spectroscopy

Electrochemical impedance spectroscopy (EIS) is a non-destructive steady-state technique that is capable of probing the relaxation phenomena over a wide range of frequencies [37].

Many studies using impedimetric techniques are focused on the monitoring of affinity reactions [38, 39]. Electrochemical approaches may be used for monitoring the interactions that occur on the electrode surface through the use of redox pair potassium ferrocyanide/ferricyanide, being EIS one of the most sensitive [21].

Impedance measurements were used to characterize and investigate the electrical behavior of the biomimetic sensor in the absence or presence of the target, in solution containing the redox pair potassium ferrocyanide/ferricyanide (Fig. 5).

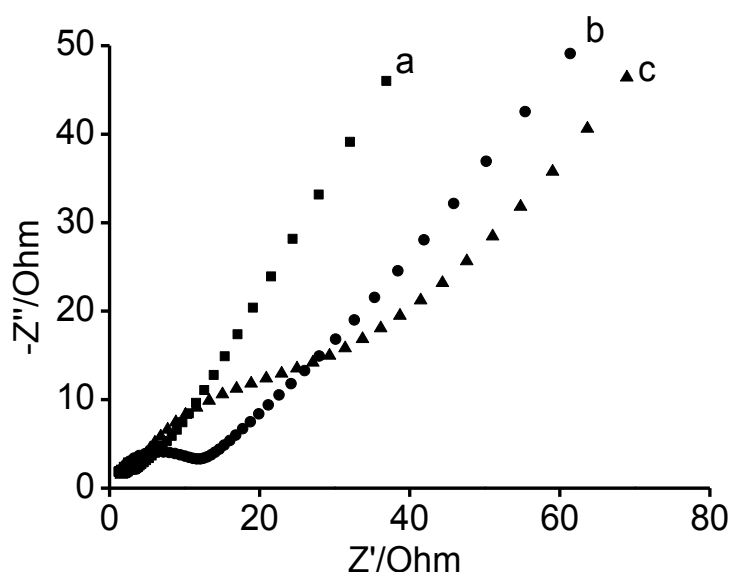


Figure 5. Impedance response of graphite electrode (a), graphite electrode/peptide (b) and graphite electrode/peptide:glutamate 1 mmol.L^{-1} (c) obtained in aqueous solution containing $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6/\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ 10 mmol.L^{-1} in KCl 0.1 mol.L^{-1} . Frequency range from 50 KHz to 10 mHz, amplitude of 10 mV.

In order to monitor the modification procedures on electrodes, the impedance at each stage was detected. Impedance plots had been constructed of

a semicircle with different charge transfer resistance (R_{ct}) and a straight line. The electrode reaction for the graphite (Fig 5a), graphite/peptide (Fig 5b), and graphite/peptide:glutamate (Fig 5c), is under kinetic control at high frequencies and is under mass transfer control at low frequencies [40]. The charge transfer resistance values obtained were 4.1, 16.5 and 53.4 Ω , respectively. Comparisons of this parameter indicated that the complex graphite/peptide:glutamate, presented a significant increase in R_{ct} value, resulting in a increase in 3.3-fold in relation to graphite/peptide.

This increase in the R_{ct} values, after the binding of target, may be result from the obstruction of the electron transfer reaction to the redox probe $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ onto the graphite electrode surface.

3.4. Chronoamperometric response

The characterization of the interaction between glutamate and the peptide mimetic was also performed using chronoamperometry (Fig. 6). The chronoamperometry is often used together with other technique for characterizing the system relative to the sensor response time [41]. Hennessey et al. [21] used chronoamperometry to show the interaction between antigen and antibody.

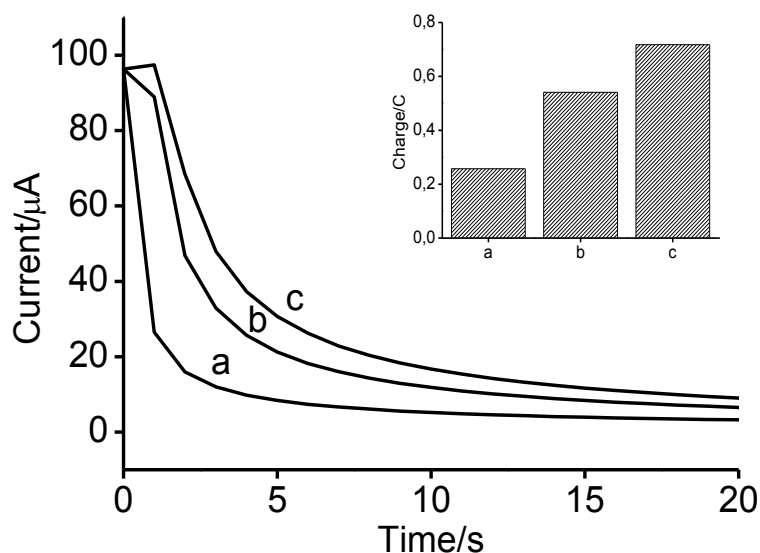


Figure 6. Chronoamperograms of graphite electrode (a), graphite/peptide (b) and graphite/peptide:glutamate 1 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ (c). Detection was conducted in phosphate buffer, pH 7.4, at 0,8 V. Inset: Bar chart of charge density.

The results show that the charge density values increase after immobilization of the peptide on the electrode surface. In addition, it was observed an increase in the charge density values to the biosensor in the presence of the target (Glu) of 1.3-fold compared with the biosensor without the target. These results are consistent with the voltammetric studies (Fig. 3), where the presence of the target causes an increase in the amplitude of the current signal. Also, it was determined by chronoamperometry that the response time was less than 10s when the current was practically stable (Fig. 6).

3.5. Application to biological samples

The evaluation of the applicability to real samples analysis was carried out using serum from healthy individuals enriched with glutamate (1 nmol.L^{-1} , $1 \text{ }\mu\text{mol.L}^{-1}$, 1 mmol.L^{-1} and 10 mmol.L^{-1}) (Fig. 7).

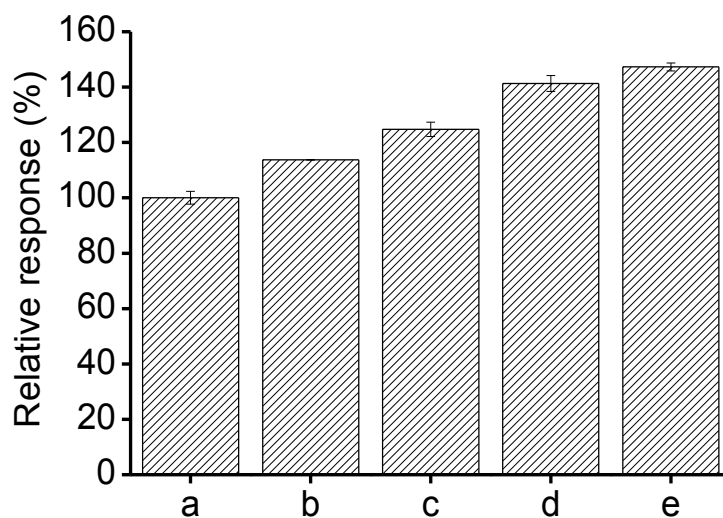


Figure 7. Relative response (%) of the biosensor. Serum not enriched (a) and serum enriched with glutamate 1 nmol.L^{-1} (b), $1 \text{ }\mu\text{mol.L}^{-1}$ (c) 1 mmol.L^{-1} (d) and 10 mmol.L^{-1} (e).

The relative response (%) was calculated by normalizing the signal caused by serum enriched with glutamate to the signal originated by serum was not enriched. In serum samples enriched with glutamate it was observed an increase of about 14%, 25%, 42% and 48% in response to addition of 1 nmol.L^{-1} , $1 \text{ }\mu\text{mol.L}^{-1}$

1,1 mmol.L⁻¹, and 10 mmol.L⁻¹, respectively, when compared with not enriched serum, indicating that the biosensor can discriminate the increase in glutamate concentration in real samples.

The role of glutamate and glutamate receptors in learning and memory is widely recognized [2]. Alzheimer's disease is the most common type of dementia, this disorder is characterized by a progressive reduction in memory and cognitive functions in the elderly [42,43].

Samples from patients with neurological disease were tested using the sensor, as shown in Figure 8, a decrease of approximately 14% was observed in patients with disease response compared to negative control. Several studies have demonstrated that the function of glutamate transport is significantly reduced in the brains of patients diagnosed with Alzheimer's and this decrease is correlated with the loss of synapses and neuronal death [44]. Studies show a decrease in the level of glutamate in the brain [2,45,46] and plasma [9,47] of these patients, corroborating our results.

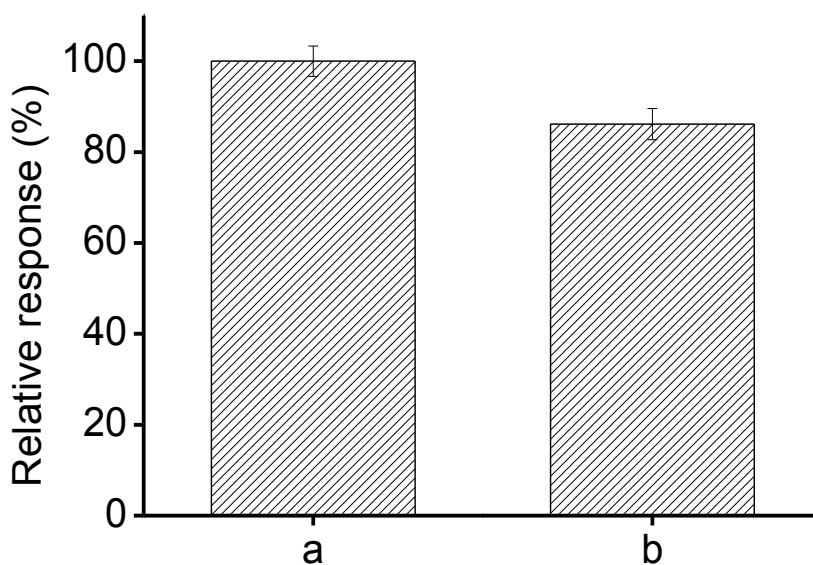


Figure 8. Relative response (%) of the biosensor. Pool of serum from healthy patients (a) and pool of serum from patients with Alzheimer's (b).

3.6. Morphological characterization of the biosensor using atomic force microscopy

AFM measurements were carried out to characterize the morphological changes of modified electrode with or without biomolecules. Fig. 9 shows representative 3D AFM images of these surfaces.

Images of bare graphite, graphite/peptide and graphite/peptide:glutamate presents roughness values of 90.9 nm, 37.2 nm and 56.2 nm, respectively. The surface of the electrode modified with peptide is smoother than the graphite electrode. These values indicate a greater uniformity of the modified electrode surface, due to the fact that the peptide fills the valleys contained in the graphite electrode. After incubation with glutamate target an increase in roughness values was observed, probably due to a conformational change after interaction with the peptide. These results indicate that the amino acid was successfully incorporated on the biosensor, in accordance with the voltammetric studies.

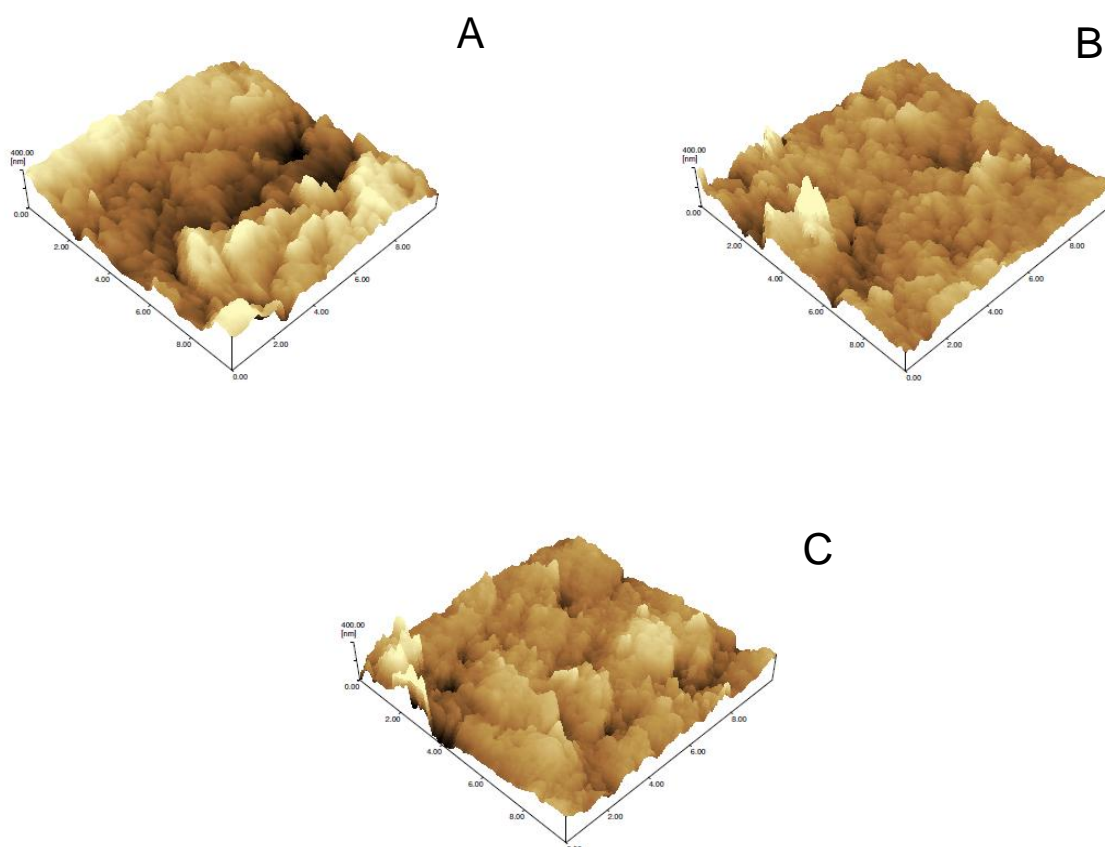


Figure 9. AFM topographical images of graphite electrode (A); graphite/peptide (B) and graphite/ peptide: glutamate (C).

4. Conclusion

A novel electrochemical biomimetic sensor for glutamate detection employing a peptide-FITC conjugate was demonstrated in this study. The system showed desirable characteristics including good reproducibility, satisfactory sensitivity, selectivity and fast response time. The linear response range was 1 nmol.L⁻¹ to 10 mmol.L⁻¹, with detection and quantification limits of 1 nmol.L⁻¹ and time response of about 10 s.

The produced biomaterial was successfully applied for glutamate determination in real samples and was shown to be a promising approach towards the development of a diagnosis kit for neurological diseases. The biosensor discriminates samples for neurological diseases.

Acknowledgments

The authors are grateful for the financial support from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES). Also, we would like to thank teacher Abílio Borghi for the review of the English manuscript.

References

- [1] S. R. Platt, The role of glutamate in central nervous system health and disease - a review. *Vet. J.* 173 (2007) 278-286.
- [2] P. T. Francis, Glutamatergic systems in Alzheimer's disease. *Int. J. Geriatr. Psych.* 18 (2003) S15-S21.
- [3] E. M. Tsapakis, M. J. Travis, Glutamate and psychiatric disorders. *Adv. Psychiatr. Treat.* 8 (2002) 189-197.
- [4] A. Iranzo, Neurodegenerative Diseases and Sleep, in C. Kushida (ed.), *Encyclopedia of Sleep*, Academic Press, 2013, pp. 362-369.
- [5] WHO (World Health Organization), *Neurological disorders: public health challenges*. Geneva, 2006.

- [6] G. N. Babu, M. Bawari, V. N. Mathur, J. Kalita, U. K. Misra, Blood glutamate levels in patients with motor neuron disease. *Clin. Chim. Acta.* 273 (1998) 195-200.
- [7] A. Leibowitz, M. Boyko, Y. Shapira, and A. Zlotnik, Blood glutamate scavenging: insight into neuroprotection. *Int. J. Mol. Sci.* 13 (2012) 10041-10066.
- [8] T. H. Hassan, H. M. Abdelrahman, N. R. Abdel Fattah, N. M. El-Masry, H. M. Hashim, K. M. El-Gerby, N. R. Abdel Fattah, Blood and brain glutamate levels in children with autistic disorder. *Res. Autism. Spect. Dis.* 7 (2013) 541-548.
- [9] G. Wang, Y. Zhou, F. Huang, H. Tang, X. Xu, J. Liu, Y. Wang, Y. Deng, R. Ren, W. Xu, Y. Zhang, A. Zhao, S. Chen, W. Jia, Plasma metabolite profiles of Alzheimer's disease and mild cognitive impairment. *J. Proteom. Res.* 13 (2014) 2649-2658.
- [10] I. Cavus, W. Kasoff, M. Cassaday, R. Jacob, R. Gueorguieva, R. Sherwin, J. Krystal, D. Spencer, W. Abi-Saab, Extracellular metabolites in the cortex and hippocampus of epileptic patients. *Ann. Neurol.* 57 (2005) 226-235.
- [11] J. W. Pan, A. Williamson, I. Cavus, H. P. Hetherington, H. Zaveri, O. a C. Petroff, D. D. Spencer, Neurometabolism in human epilepsy. *Epilepsia* 49 (2008) 31-41.
- [12] F. Campos, M. Pérez-Mato, J. Agulla, M. Blanco, D. Barral, A. Almeida, D. Brea, C. Waeber, J. Castillo, P. Ramos-Cabrer, Glutamate excitotoxicity is the key molecular mechanism which is influenced by body temperature during the acute phase of brain stroke. *PLoS One* 7 (2012) e44191.
- [13] L. Graham, M. Aprison, Fluorometric determination of aspartate, glutamate, and γ -aminobutyrate in nerve tissue using enzymic method. *Anal. Biochem.* 15 (1996) 487-497.
- [14] Y. Cui, J. P. Barford, R. Renneberg, Development of an l-glutamate biosensor using the coimmobilization of l-glutamate dehydrogenase and p-hydroxybenzoate hydroxylase on a Clark-type electrode. *Sensor. Actuat. B-Chem.* 127 (2007) 358-361.
- [15] F. Tian, A. V Gourine, R. T. R. Huckstepp, N. Dale, A microelectrode biosensor for real time monitoring of L-glutamate release. *Anal. Chim. Acta.* 645 (2009) 86-91.
- [16] N. Z. M. Muslim, M. Ahmad, L. Y. Heng, B. Saad, Optical biosensor test strip for the screening and direct determination of l-glutamate in food samples. *Sensor Actuat. B-Chem.* 161 (2012) 493-497.

- [17] [17] B. Batra, S. Kumari, C. S. Pundir, Construction of glutamate biosensor based on covalent immobilization of glutamate oxidase on polypyrrole nanoparticles/polyaniline modified gold electrode. *Enzyme Microb. Tech.* 57 (2014) 69-77.
- [18] Y. Wan, Y. Su, X. Zhu, G. Liu, C. Fan, Development of electrochemical immunosensors towards point of care diagnostics. *Biosens. Bioelectron.* 47 (2013) 1-11.
- [19] M. Arredondo, M. Stoytcheva, R. Zlatev, V. Gochev, Some clinical applications of the electrochemical biosensors. *Mini-Rev. Med. Chem.* 12 (2012) 1301-1313.
- [20] D. W. Kimmel, G. Leblanc, M. E. Meschievitz, D. E. Cliffel, Electrochemical Sensors and Biosensors. *Anal. Chem.* 84 (2012) 685-707.
- [21] H. Hennessey, N. Afara, S. Omanovic, A. L. Padjen, Electrochemical investigations of the interaction of C-reactive protein (CRP) with a CRP antibody chemically immobilized on a gold surface. *Anal. Chim. Acta.* 643 (2009) 45–53.
- [22] T. A. R. Silva, L. F. Ferreira, L. M. Souza, L. R. Goulart, J. M. Madurro, A. G. Brito-Madurro, New approach to immobilization and specific-sequence detection of nucleic acids based on poly(4-hydroxyphenylacetic acid) *Mat. Sci. Eng. C.* 29 (2009) 539–545.
- [23] M. J. Gómara, G. Ercilla, M. a Alsina, I. Haro, Assessment of synthetic peptides for hepatitis A diagnosis using biosensor technology. *J. Immunol. Methods.* 246 (2000) 13–24.
- [24] R. Li, H. Huang, L. Huang, Z. Lin, L. Guo, B. Qiu, G. Chen, Electrochemical biosensor for epidermal growth factor receptor detection with peptide ligand. *Electrochim. Acta.* 109 (2013) 233–237.
- [25] Y. Cui, S. Kim, R. Naik, M. Mcalpine, Biomimetic Peptide Nanosensors. *Acc. Chem. Res.* 45 (2012) 696–704.
- [26] S. Pavan, F. Berti, Short peptides as biosensor transducers. *Anal. Bioanal. Chem.* 402 (2012) 3055–3070.
- [27] J. H. Choi, H. S. Kim, J.-W. Choi, J. W. Hong, Y.-K. Kim, B.-K. Oh, A novel Au-nanoparticle biosensor for the rapid and simple detection of PSA using a sequence-specific peptide cleavage reaction. *Biosens. Bioelectron.* 49 (2013) 415–419.
- [28] S. Scarano, A. Vestri, M. L. Ermini, M. Minunni, SPR detection of human hepcidin-25: a critical approach by immuno- and biomimetic-based biosensing. *Biosens. Bioelectron.* 40 (2013) 135-140.

- [29] Y. Zhang, N. Islam, R. G. Carbonell, O. J. Rojas, Specificity and Regenerability of Short Peptide Ligands Supported on Polymer Layers for Immunoglobulin G Binding and Detection. *ACS Appl. Mater. Interfaces*. 5 (2013) 8030-8037.
- [30] S. D. Collyer, F. Davis, A. Lucke, C. J. M. Stirling, S. P. J. Higson, The electrochemistry of the ferri/ferrocyanide couple at a calix[4]resorcinarenetetrathiol-modified gold electrode as a study of novel electrode modifying coatings for use within electro-analytical sensors. *J. Electroanal. Chem.* 549 (2003) 119-127.
- [31] N. G. Tsierkezos, A. Knauer, U. Ritter, Thermodynamic investigation of ferrocyanide/ferricyanide redox system on nitrogen-doped multi-walled carbon nanotubes decorated with gold nanoparticles. *Thermochim. Acta*. 576 (2014) 1-8.
- [32] M. Zhang, B. Yin, X. Wang, B. Ye, Interaction of peptides with graphene oxide and its application for real-time monitoring of protease activity. *Chem. Commun.* 47 (2011) 2399-2401.
- [33] F. Bianying, G. Linjie, W. Lihua, L. Fan, L. Jianxin, G. Jimin, F. Chunhai, and H. Qing, A Graphene Oxide-Based Fluorescent Biosensor for the Analysis of Peptide-Receptor Interactions and Imaging in Somatostatin Receptor Subtype 2 Overexpressed Tumor Cells. *Anal. Chem.* 85 (2013) 7732-7737.
- [34] R. Doong, P.S. Lee, K. Anitha, Simultaneous determination of biomarkers for Alzheimer's disease using sol-gel-derived optical array biosensor. *Biosens. Bioelectron.* 25 (2010) 2464-2469.
- [35] M. Jamal, J. Xu, and K. M. Razeeb, Disposable biosensor based on immobilisation of glutamate oxidase on Pt nanoparticles modified Au nanowire array electrode. *Biosens. Bioelectron.* 26 (2010) 1420-1424.
- [36] B. Batra, C. S. Pundir, An amperometric glutamate biosensor based on immobilization of glutamate oxidase onto carboxylated multiwalled carbon nanotubes/gold nanoparticles/chitosan composite film modified Au electrode. *Biosens. Bioelectron.* 47 (2013) 496-501.
- [37] B. Pejčić and R. De Marco, Impedance spectroscopy: Over 35 years of electrochemical sensor optimization. *Electrochim. Acta*. 51 (2006) 6217-6229.
- [38] J.-G. Guan, Y.-Q. Miao, Q.-J. Zhang, Impedimetric biosensors. *J. Biosci. Bioeng.* 97 (2004) 219-226.
- [39] M. I. Prodromidis, Impedimetric immunosensors- A review. *Electrochim. Acta*. 55 (2010) 4227-4233.

- [40] J. Zhang, D. Shan, S. Mu, Electrochemical copolymerization of aniline with m-aminophenol and novel electrical properties of the copolymer in the wide pH range. *Electrochim. Acta.* 51 (2006) 4262-4270.
- [41] D. Grieshaber, R. Mackenzie, J. Voros, E. Reimhult, Electrochemical Biosensors - Sensor Principles and Architectures. *Sensors.* 8 (2008) 1400-1458.
- [42] T. V. Davydova, N. I. Voskresenskaya, V. Y. Gorbatov, V. G. Fomina, O. a. Doronina, I. V. Maksunova, Production of Autoantibodies to Glutamate during Alzheimer's Dementia. *Bull. Exp. Biol. Med.* 147 (2009) 405–407.
- [43] M. R. Hynd, H. L. Scott, P. R. Dodd, Glutamate-mediated excitotoxicity and neurodegeneration in Alzheimer's disease. *Neurochem. Int.* 45 (2004) 583–95.
- [44] C. Lin, Q. Kong, G. Cuny, M. Glicksman, Glutamate transporter EAAT2: a new target for the treatment of neurodegenerative diseases. *Futur. Med Chem.* 4 (2012) 1689–1700.
- [45] N. Fayed, P. J. Modrego, G. Rojas-Salinas, K. Aguilar, Brain glutamate levels are decreased in Alzheimer's disease: a magnetic resonance spectroscopy study. *Am. J. Alzheimers. Dis. Other Demen.* 26 (2011) 450–456.
- [46] R. Rupsingh, M. Borrie, M. Smith, J. L. Wells, R. Bartha, Reduced hippocampal glutamate in Alzheimer disease. *Neurobiol. Aging.* 32 (2011) 802–810.
- [47] H. Basun, L.G. Forssell, O. Almkvist, R.F. Cowburn, R. Eklof, B. Winblad, L. Wetterberg, Amino acid concentrations in cerebrospinal fluid and plasma in Alzheimer's disease and healthy control subjects. *J. Neural Transm.* 2 (1990) 295–304.

ANEXOS



Ministério da Educação e do Desporto
Universidade Federal de Uberlândia
Instituto de Genética e Bioquímica
Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica

NORMAS PARA CONFEÇÃO DA VERSÃO FINAL DO MESTRADO/DOCTORADO

(Disponível em: <http://www.cogeb.ufu.br/>)

I. Capa

deve constar:

- Universidade Federal de Uberlândia
- Instituto de Genética e Bioquímica
- Pós-Graduação em Genética e Bioquímica
- Título da Tese
- Nome do aluno
- Uberlândia-MG
- Ano da Defesa

II. Papel: Tamanho A4

Margens

Superior	3,0cm
Inferior	2,5cm
Esquerda	3,0cm
Direita	2,5cm ou 24 pt

Fonte: Arial 12, espaço 1,5

II.1. Numeração

Os números das páginas devem aparecer no canto inferior direito da página e seguem a seguinte organização:

1. Na capa não aparece número, porém ela é contada na numeração que irá aparecer a partir da contra capa;
2. Da contra capa até o índice/sumário, a numeração é romana minúscula (ii, iii, iv ...) (não esqueça de numerar a partir do número ii pois o número i refere-se a capa, conforme descrito no item 1 acima);
3. A partir da APRESENTAÇÃO, a numeração é arábica (1, 2, 3, 4 ...)

III. Ordenação do Conteúdo

O Mestrado e o Doutorado serão escritos sob a forma de Capítulo(s). Tanto o boneco quanto a versão final deverão ter a seguinte forma:

1 Capa (Anexo I)

- **1 Contra capa identificando:**
Curso, Título, Aluno, Orientador, Informes sobre a titulação, cidade e ano. (Anexo II)
- **Ficha Catalográfica:**
Deve ser colocada nas costas da CONTRA CAPA (Anexo III). A ficha catalográfica será elaborada pela Biblioteca do St^a. Mônica.
- **Palavras-chave:**
Devem ser colocadas abaixo da Ficha Catalográfica na CONTRA CAPA (Anexo III)
- **Folha de Rosto com:**
Curso, Título, Aluno, Comissão Examinadora, Cidade e Data (Anexo IV)
- **Dedicatória**
- **Agradecimentos**
- **Índice/Sumário;**
- **Apresentação**
 1. deverá ser uma síntese do tema pesquisado, situando-o em um contexto geral sobre o conhecimento atual do assunto.
 2. Não deverá trazer citações bibliográficas.
 3. Será finalizada com a apresentação do(s) capítulo(s) com enfoque no(s) objetivo(s) do(s) capítulo(s).
- **Capítulo I Fundamentação Teórica**
Este capítulo é composto pela fundamentação teórica e suas referências bibliográficas
- **Capítulo(s):**
 - ✓ Título
 - ✓ resumo (com palavras chaves) e abstract (com key words) referentes ao capítulo
 - ✓ Se o Capítulo foi publicado, pode ser apresentado tanto na forma de separata quanto na forma do texto original do editor de texto, se foi ou está para ser submetido, constar a Revista.
 - ✓ Cada Capítulo (01 ou mais) deve ser escrito em conformidade com uma Revista de Divulgação Científica escolhida pelo Aluno e seu Orientador.
 - ✓ O Capítulo deverá ser escrito em Português **ou** Inglês.
 - ✓
- **Opcional**
 1. Anexar, ao final da Dissertação/Tese, os Protocolos utilizados em Metodologia para desenvolvimento da Pesquisa
 2. Fazer um Capítulo com RESULTADOS COMPLEMENTARES - para resultados que ainda serão completados para fins de publicação, mas que são relevantes e merecem uma Short Communication (nota prévia)