

Parte 1:

Introdução Geral aos Biossensores e Reconhecimento de Receptores

1.1 Introdução aos Biossensores

Existem testes laboratoriais e protocolos para a detecção de vários biomarcadores, que pode ser usado para diagnosticar ataque cardíaco, acidente vascular cerebral, câncer, esclerose múltipla, ou quaisquer outras condições. No entanto, esses protocolos de laboratório geralmente exigem equipamentos caros, e pessoal técnico qualificado, e atendimento hospitalar e têm restrições de tempo. Métodos muito mais baratos podem fornecer análise econômica em casa, em um consultório médico ou em uma ambulância. O diagnóstico rápido também ajudará na o tratamento de muitas condições. Os biossensores oferecem genericamente análises para uma variedade de aplicações biomédicas [1-8] e industriais [9, 10]. Devido a isso, a tecnologia de biossensores continuou a se desenvolver em um campo em constante expansão e multidisciplinar durante as últimas décadas.

A definição da IUPAC de um biossensor é “um dispositivo que usa reações bioquímicas específicas mediadas por enzimas isoladas, sistemas imunológicos, tecidos, organelas ou células inteiras para detectar compostos químicos geralmente por eletricidade, temperatura ou sinais ópticos”. A partir dessa definição, podemos entender o que um biossensor requer.

A maioria dos sensores consiste em três componentes principais:

- 1) Primeiramente deve haver um componente, que reconhecerá seletivamente o analito de interesse. Normalmente, isso requer que um evento de ligação ocorra entre o elemento de reconhecimento e o destino.
- 2) Em segundo lugar, é necessária alguma forma de elemento transdutor, que converta o evento de ligação bioquímica em um sinal facilmente mensurável. Isso pode ser uma geração de uma

espécie mensurável eletroquimicamente, como prótons ou H_2O_2 , uma alteração na condutividade, uma alteração na massa ou uma alteração nas propriedades ópticas, como índice de refração.

3) Em terceiro lugar, deve haver algum método para detectar e quantificar a mudança física, como medir uma corrente elétrica ou uma massa ou mudança óptica e converter isso em informações úteis.

Existem muitos métodos para detectar eventos de ligação, como métodos eletroquímicos, incluindo potenciometria, amperometria e impedância AC; métodos ópticos como ressonância de plasmônica de superfície; e métodos piezoelétricos que medem mudanças de massa, como microbalança de cristal de quartzo (QCM) e técnicas de onda acústica de superfície. Uma descrição detalhada deles estaria fora do escopo desta introdução, mas eles são descritos em muitas revisões e em outras partes deste livro. Em vez disso, este capítulo se concentra na introdução dos receptores de reconhecimento usados em biossensores.

1.2 Biossensores baseados em enzimas

Leyland Clark revestiu um eletrodo de oxigênio com um filme contendo a enzima glucose oxidase e uma membrana de diálise para desenvolver um dos primeiros biossensores [11]. Isso poderia ser usado para medir os níveis de glucose no sangue; a enzima converteu a glucose em gluconolactona e peróxido de hidrogênio com um consumo simultâneo de oxigênio. A queda no oxigênio dissolvido podia ser medida no eletrodo e, com calibração cuidadosa, os níveis de glucose no sangue calculados. Isso levou ao uso generalizado de enzimas em biossensores, impulsionado principalmente pelo desejo de fornecer detecção de glucose no sangue. O diabetes é um dos principais problemas de saúde no mundo atual e estima-se que afetará cerca de 300 milhões de pessoas até 2045 [12]. O mercado mundial de biossensores foi de aproximadamente US\$ 15 a 16 bilhões em 2016. Em 2009, aproximadamente metade do mercado mundial de biossensores foi para aplicações no ponto

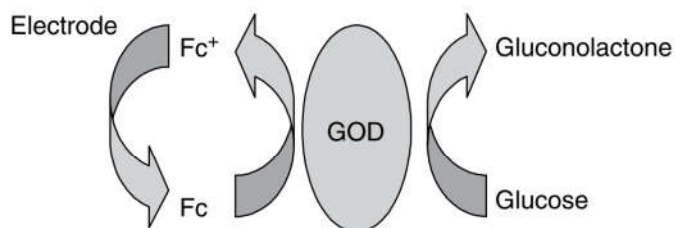
de atendimento e cerca de 32% do mercado comercial mundial para monitoramento de glicose no sangue [13].

As enzimas são excelentes candidatas para uso em biossensores, por exemplo, possuem altas seletividades; a glicose oxidase só irá interagir com a glicose e não é afetada por outros açúcares. Sendo altamente catalíticas, as enzimas exibem rotações rápidas de substrato, o que é importante, pois, caso contrário, elas podem rapidamente se tornar saturadas ou deixar de gerar espécies ativas suficientes para serem detectadas. No entanto, apresentam algumas desvantagens: por exemplo, uma enzima adequada para o alvo de interesse pode simplesmente não existir. Além disso, as enzimas podem ser difíceis e caras de extrair em quantidades suficientes e podem ser instáveis, desnaturando-se rapidamente e tornando-se inúteis. Eles também podem estar sujeitos a envenenamento por uma variedade de espécies. Além disso, a detecção do turnover enzimático pode ser um problema, por exemplo, na reação da glicose oxidase; é possível detectar diretamente eletroquimicamente o consumo de oxigênio [11] ou a produção de peróxido de hidrogênio.

Porém em amostras de sangue e saliva, pode haver outras substâncias eletroativas como o ascorbato, que também sofre uma reação redox e leva a leituras falsas. Esses tipos de biossensores são frequentemente chamados de “biossensores de primeira geração”. Para resolver esta questão de interferência, uma segunda geração de biossensores de glicose foi desenvolvida, onde uma pequena molécula mediadora redox-ativa, como um derivado de ferroceno, foi usada para transportar elétrons entre a enzima e um eletrodo [14]. O mediador reage prontamente com a enzima, evitando assim a competição com o oxigênio ambiente. Isso permitiu que potenciais muito mais baixos fossem usados na detecção de glicose, reduzindo assim o problema de oxidação de interferentes e aumentando a precisão e a confiabilidade do

sinal. A Figura 1.1 mostra um esquema de um biossensor de glucose de segunda geração.

Figure 1.1 Schematic of a second-generation biosensor.



Fc = ferrocene derivative, God = glucose oxidase

Biossensores de terceira geração também foram desenvolvidos onde a enzima é conectada diretamente ao eletrodo, usando materiais como polímeros redox contendo ósmio [15] ou polímeros condutores, como polianilina [16]. Mais recentemente, materiais nanoestruturados, como nanopartículas metálicas, nanotubos de carbono e grafeno, têm sido usados para facilitar a transferência direta de elétrons entre a enzima e o eletrodo, conforme descrito nos capítulos posteriores. Como alternativa à glucose oxidase, os sensores baseados na glucose desidrogenase têm também foi desenvolvido. As técnicas de detecção de glucose usando glucose oxidase pode ser aplicadas a quase todas as enzimas oxidase, permitindo o desenvolvimento de sensores baseados em colesterol oxidase, lactato oxidase, enzimas peroxidase e muitos outros. Sensores também foram construídos usando urease, que converte ureia em amônia, causando uma mudança no pH local que pode ser detectada potenciométricamente ou opticamente combinando a enzima com um corante óptico adequado. Cascatas de enzimas também foram desenvolvidas; por exemplo, ésteres de colesterol podem ser determinados usando eletrodos contendo colesterol esterase e colesterol oxidase. Aplicações de biossensores contendo enzimas têm sido amplamente revisadas [16-18].

1.3 Biossensores baseados em DNA e RNA

O DNA está contido em todas as células vivas como um modelo para a produção de proteínas e pode ser considerado um dispositivo de armazenamento de informações moleculares. O RNA também tem muitas aplicações nos seres vivos, inclusive atuando como mensageiro entre o DNA e os ribossomos que sintetizam proteínas e como regulador de expressão genética. Tanto o DNA quanto o RNA são espécies poliméricas baseadas em um esqueleto de açúcar-fosfato com bases nucleicas como cadeias laterais, no DNA, ou seja, adenina, citosina, guanina e timina. No RNA, o uracilo é utilizado em vez da timina. É a ligação específica entre pares de bases, ou seja, guanina a citosina ou adenina a timina (uracila), que determina a estrutura desses polímeros, no caso do DNA levando a uma estrutura de dupla hélice (Figura 1.2) [19].

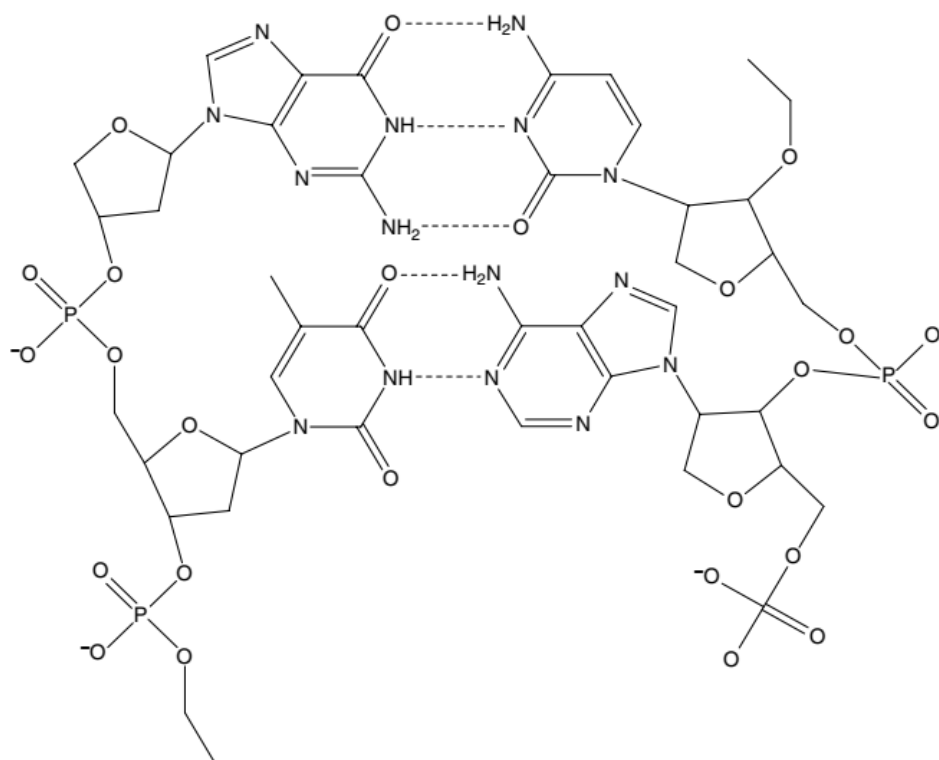


Figure 1.2 Schematic of interstrand binding in DNA.

Os sensores de DNA geralmente têm um formato em que uma cadeia oligonucleotídica é ligada a um transdutor adequado, ou seja,

um eletrodo, chip de ressonância plasmon de superfície (SPR), microbalança de cristal de quartzo (QCM) e assim por diante, e é exposto a uma solução contendo uma fita oligonucleotídica de interesse [20]. O oligonucleotídeo ligado à superfície é selecionado para ser complementar ao oligonucleotídeo de interesse, e as fitas ligadas e em solução passarão por hibridação específica de sequência como evento de reconhecimento.

Uma revisão aprofundada da detecção de DNA está fora do escopo desta introdução e foi revisada em outro lugar [20-24]; no entanto, alguns exemplos são dados aqui. Um método baseado na oxidação de guanina mediada por rutênio permitiu a detecção eletroquímica seletiva de RNA mensageiro de tumores em níveis de 500 zmol L^{-1} ($z = \text{zepto}, 10^{-21}, \text{sextilionésimo}$) [25].

micro	μ	10^{-6}	Milionésimo	Milionésimo
nano	n	10^{-9}	Bilionésimo	Milésimo de milionésimo
pico	p	10^{-12}	Trilionésimo	Bilionésimo
femto	f	10^{-15}	Quadrilionésimo	Milésimo de bilionésimo
atto	a	10^{-18}	Quintilionésimo	Trilionésimo
zepto	z	10^{-21}	Sextilionésimo	Milésimo de trilionésimo
yocto	y	10^{-24}	Septilionésimo	Quadrilionésimo
ronto	r	10^{-27}	Octilionésimo	Milésimo de quadrilionésimo

quecto	q	10^{-30}	Nonilionésimo	Quintilionésimo
--------	---	------------	---------------	-----------------

Um ensaio do tipo sanduíche usando esferas magnéticas e análise de fluorescência utilizou um nucleotídeo complementar ao vírus da dengue RNA para permitir a detecção em níveis tão baixos quanto 50 pmol L^{-1} [26]. Cinco sondas de DNA diferentes podem ser imobilizadas em um chip de imagem SPR e usadas simultaneamente para determinar a ligação de sequências de RNA encontradas em várias bactérias patogênicas, como *Brucella abortus*, *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* [27] para uso em segurança alimentar.

1.4 Biossensores baseados em anticorpos

Anticorpos são proteínas naturais em forma de Y produzidas por sistemas vivos, geralmente como um mecanismo de defesa contra bactérias ou vírus invasores. Eles se ligam a espécies específicas (antígenos) com um grau extremamente alto de especificidade por uma mistura de pontes de hidrogênio e outras interações não covalentes, com a ligação ocorrendo na fenda da molécula de proteína [28]. Uma grande vantagem dos anticorpos é que eles podem ser “aumentados” pela inoculação de animais de laboratório com o alvo em questão; os mecanismos naturais de defesa do animal devem desenvolver anticorpos contra o antígeno. Esses anticorpos podem então ser colhidos de animais. Uma variedade de animais é usada, incluindo camundongos, ratos, coelhos e animais maiores, como ovelhas ou lhamas. Portanto, é possível desenvolver um anticorpo seletivo para quase qualquer alvo. Essa alta seletividade levou primeiro ao desenvolvimento do radioensaio ganhador do Prêmio Nobel [29] e, posteriormente, do ensaio imunoenzimático (ELISA) [30], que é comumente usado hoje para quantificar uma ampla gama de alvos em medicina e meio ambiente.

Uma vez desenvolvido, o anticorpo pode ser imobilizado em um transdutor para desenvolver um biossensor, mostrado esquematicamente na Figura 1.3. Uma questão é que, quando os anticorpos se ligam a seus antígenos para formar um complexo, não são produzidos subprodutos facilmente mensuráveis, como elétrons ou espécies redox-ativas.

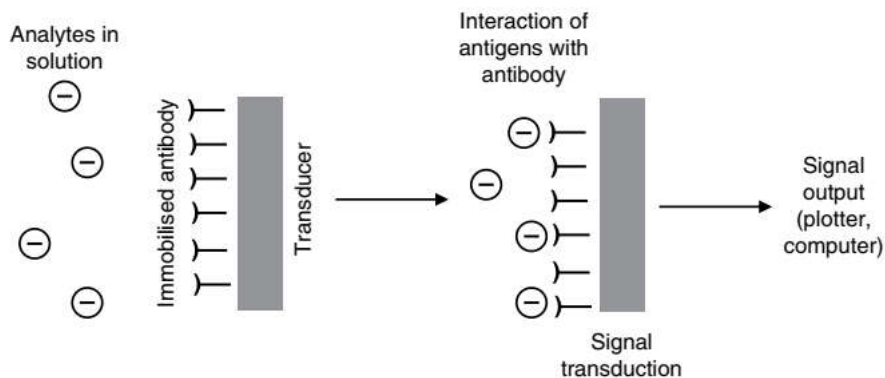


Figure 1.3 Schematic of an antibody-based immunosensor.

Existem vários métodos para lidar com essa desvantagem. Por exemplo, um formato de imunoensaio em sanduíche pode ser usado onde um anticorpo é ligado à superfície e um antígeno ligado a ela a partir da solução a ser analisada. O desenvolvimento então ocorre expondo o sensor a um anticorpo secundário marcado, que se liga ao antígeno, e então a presença do marcador é detectada; pode ser uma enzima ou uma espécie fluorescente ou eletroativa. Ensaios competitivos em que a amostra é enriquecida com um antígeno marcado e, em seguida, os antígenos marcados e da amostra competem para se ligar ao anticorpo imobilizado. No entanto, isso requer a marcação do anticorpo/antígeno, o que pode ser problemático, levando à perda de atividade e exigindo etapas adicionais com suas implicações de tempo e custo. Portanto, os métodos de detecção livre de rótulos têm sido amplamente estudados e podem simplesmente detectar o evento de ligação diretamente, sem a necessidade de rotulagem. Isso inclui técnicas eletroquímicas, como impedância AC, técnicas ópticas, como SPR, e técnicas sensíveis à massa, como QCM [28].

Outra questão é que a forte ligação entre o anticorpo e o antígeno significa que não há renovação do substrato; a ligação é essencialmente irreversível. Nesse caso, os sensores costumam ficar saturados e só podem ser usados uma vez. Embora a reação anticorpo-antígeno possa ser revertida por extremos de pH ou soluções fortemente iônicas, elas podem danificar o anticorpo, levando à perda permanente de atividade. No

entanto, se os custos puderem ser reduzidos o suficiente, as possibilidades de testes simples para uso doméstico tornam-se possíveis. Isso levou ao primeiro imunoenensaio comercialmente disponível, o teste de gravidez caseiro, que detecta a presença de gonadotrofina coriônica humana (hCG). Os testes iniciais simplesmente detectam sua presença mostrando uma linha azul, ou seja, grávida ou não grávida; porém modelos posteriores incorporam um leitor óptico que mede a intensidade da cor, avaliando assim o nível de hCG e dando uma estimativa do tempo desde a concepção.

1.5 Aptassensores

Os aptâmeros são uma família de oligonucleotídeos do tipo RNA/DNA capazes de se ligar a uma ampla variedade de alvos [31], incluindo proteínas, drogas, peptídeos e células. Quando eles ligam seus alvos, o evento de ligação geralmente é acompanhado por mudanças conformacionais no aptâmero; por exemplo, pode dobrar-se em torno de uma pequena molécula.

Essas mudanças estruturais geralmente são fáceis de detectar, tornando os aptâmeros candidatos ideais para fins de detecção. Os aptâmeros também exibem outras vantagens sobre outros elementos de reconhecimento, como enzimas e anticorpos. Eles podem ser sintetizados *in vitro*, sem a necessidade de hospedeiros animais e geralmente com alta especificidade e seletividade para praticamente qualquer alvo, desde pequenas moléculas até peptídeos, proteínas e até células inteiras [31]. A falta de um hospedeiro animal significa que os aptâmeros podem ser sintetizados em compostos altamente tóxicos. Uma vez que um determinado aptâmero ideal para um determinado alvo tenha sido determinado, ele pode ser sintetizado comercialmente no estado puro e frequentemente exibem estabilidade superior a outras moléculas biológicas, daí seu apelido de “anticorpos químicos”. Os aptâmeros podem ser obtidos primeiramente utilizando uma biblioteca de oligonucleotídeos aleatórios. É possível que dentro desta biblioteca vários oligonucleotídeos exibam uma afinidade com o

alvo, enquanto a maioria deles não. Eles são então submetidos a um processo chamado evolução sistemática de ligantes por enriquecimento exponencial (SELEX). Neste processo, a biblioteca é incubada com o alvo e depois as moléculas ligadas, ou seja, os complexos oligonucleotídeo/alvo separados e as espécies não ligadas descartadas. o limite

os oligonucleotídeos são então liberados do alvo e então submetidos à amplificação da reação em cadeia da polimerase (PCR). Isso então forma uma nova biblioteca para o processo começar novamente. Ao longo de um número de ciclos (6-12) [31], os oligonucleotídeos com maior afinidade com o alvo são preferidos de maneira semelhante à seleção natural. Após vários ciclos, esses aptâmeros são clonados e expressos.

A Figura 1.4 mostra um esquema desse processo. Os aptâmeros ligam-se aos seus alvos com excelente seletividade e alta afinidade, sendo as constantes de dissociação muitas vezes nanomolares ou picomolares [32]. Assim como os anticorpos, os aptâmeros podem ser utilizados em vários formatos; para moléculas pequenas geralmente há um complexo 1:1 simples formado com o alvo encapsulado dentro do aptâmero. No entanto, com analitos maiores, o aptâmero se liga à superfície do alvo, e diferentes aptâmeros podem ser isolados, que se ligam a diferentes áreas [31].

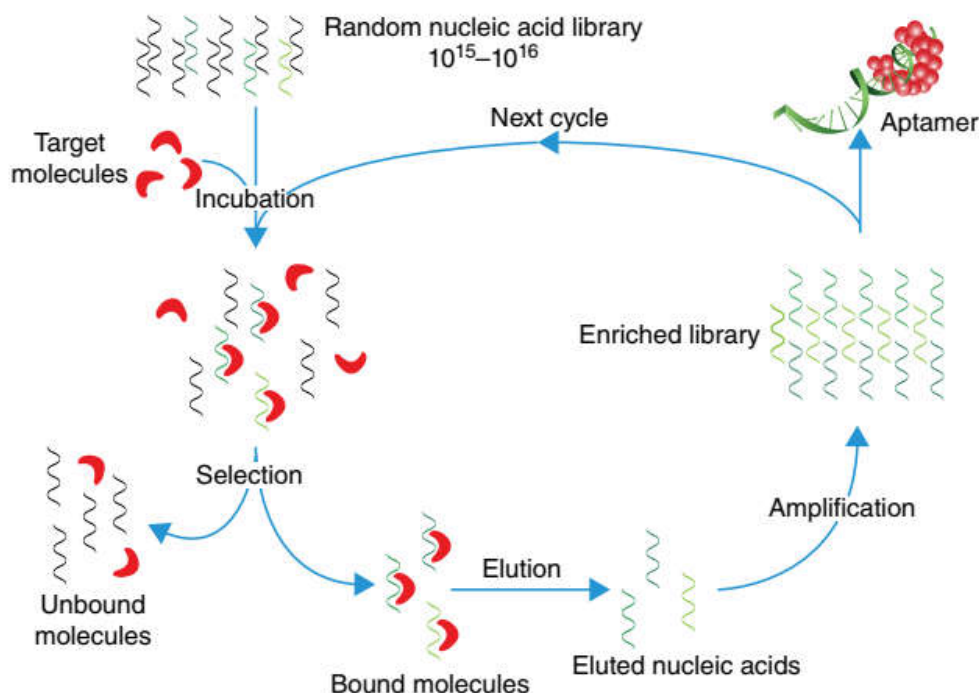


Figure 1.4 Scheme for the systematic evolution of ligands by exponential (SELEX) enrichment process. *Source:* Song et al. [31]. Reproduced with permission of Elsevier.

Isso permite ensaios do tipo sanduíche em que dois aptâmeros são usados para aumentar a resposta do biossensor; também existem ensaios sanduíche mistos usando um aptâmero e um anticorpo. Uma questão é que, uma vez que os aptâmeros simplesmente formam complexos com suas contrapartes, novamente não há produto facilmente detectável, como uma espécie redox-ativa formada. No entanto, a fácil disponibilidade e estabilidade dos aptâmeros também permite sua funcionalização com marcadores como enzimas, nanopartículas, fluorescentes ou grupos redox-ativos para uso em ensaios marcados. Alternativamente, técnicas sem rótulo, como impedância AC, SPR e QCM, podem ser usadas para detectar eventos de ligação [31].

1.6 Biossensores baseados em peptídeos

Os peptídeos são polímeros naturais ou sintéticos de aminoácidos e são construídos a partir dos mesmos blocos de construção das proteínas. Uma vez que muitas proteínas têm a capacidade de se ligar a alvos com boa seletividade e especificidade, os peptídeos da sequência correta de

aminoácidos devem ser capazes de fazer o mesmo [33]. Os peptídeos mais curtos têm várias vantagens sobre as proteínas; eles geralmente exibem melhor estabilidade conformacional e química do que as proteínas e são muito menos suscetíveis a desnaturante. Eles também podem ser sintetizados com sequências específicas usando protocolos de síntese em fase sólida bem conhecidos e podem ser facilmente substituídos por grupos de marcação sem afetar sua atividade. Especialmente popular é a marcação de uma ou ambas as extremidades do peptídeo com grupos fluorescentes [33].

Esses receptores de reconhecimento podem ser sintetizados com uma sequência específica ou uma biblioteca de peptídeos pode ser usada para avaliar a afinidade para um alvo específico. Por exemplo, os peptídeos podem ser produzidos para quelar especificamente certos íons metálicos, mesmo na presença de outros íons metálicos. Os sensores baseados em peptídeos são sistemas especialmente eficazes para a atividade de certas enzimas, como as proteases. As proteases podem hidrolisar ligações peptídicas e certas proteases estão ligadas a muitos estados de doença. Por exemplo, matriz metalopeptidase-2 (MMP-2) e MMP-9 são consideradas importante em várias doenças inflamatórias e patológicas processos, bem como metástase tumoral [34-36]. Os peptídeos podem ser usados para avaliar a atividade da proteinase. Por exemplo, pontos quânticos podem ser revestidos com peptídeos conjugados com muitas moléculas de corante, interações de transferência de energia de ressonância de fluorescência ocorrem entre as moléculas de corante e o ponto, que extingue a fluorescência do ponto. Quando uma proteinase é adicionada, o peptídeo é hidrolisado, o revestimento removido e a fluorescência do ponto retornada [37]. A atividade de uma variedade de outros materiais, como quinases, também pode ser avaliada [33]. Bibliotecas de peptídeos curtos (<50 aminoácidos) de exibição aleatória de fagos podem ser rastreadas contra vários alvos, conforme revisado antes [38]. Também a modelagem in silico de interações de fita peptídica com alvos de interesse pode ser

usada para selecionar possíveis peptídeos receptores, estes podem então ser sintetizados e testados [38, 39]. Um problema, porém, é que imobilizá-los em uma superfície sólida pode levar a modificações estruturais, que removem sua atividade. Também as sequências peptídicas que formam os sítios ativos dos receptores naturais podem ser sintetizadas e reter a atividade da molécula parental.

1.7 Biossensores baseados em MIP

Os biossensores foram feitos inicialmente usando moléculas biológicas como enzimas ou anticorpos; no entanto, isso levou a questões como custo, dificuldade de purificação e isolamento e estabilidade. O uso de materiais semissintéticos, como aptâmeros e peptídeos que podem ser sintetizados ou selecionados, abordou esse problema até certo ponto. No entanto, outra abordagem é usar materiais totalmente sintéticos que imitam o comportamento de enzimas ou anticorpos. Isso levou ao desenvolvimento de polímeros impressos molecularmente (MIPs), que embora não sejam biossensores pela definição, são uma solução possível [40-42].

Para a fabricação de MIPs, o analito de interesse (muitas vezes de natureza biológica) é misturado com uma variedade de monômeros polimerizáveis e alguns deles irão interagir com o analito. A polimerização será então iniciada e um polímero reticulado é formado contendo analitos aprisionados, que atuam como moldes (Figura 1.5).

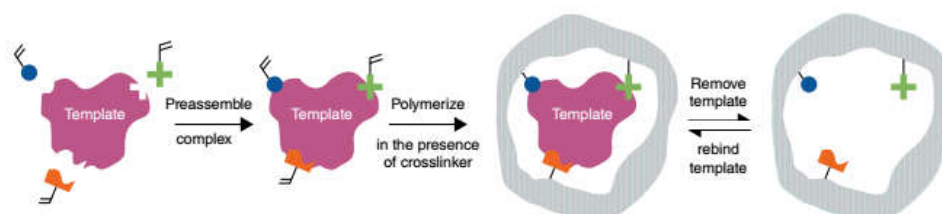


Figure 1.5 Schematic representation of the imprinting process. *Source:* Whitcombe and Vulfson [42]. Reproduced with permission of John Wiley & Sons.

A remoção do analito, se o polímero for suficientemente rígido, deixará poros dentro do polímero, que não apenas

correspondem ao tamanho e forma do molde, mas também contêm seus grupos de superfície interna, que irão interagir com o analito [42-45]. Muitas vezes esta técnica é combinada com a modelagem in silico da interação do molde com uma biblioteca de monômeros, permitindo a seleção de uma mistura de monômeros que irá interagir fortemente com o molde [9, 10, 46]. Os MIPs exibem várias vantagens sobre os materiais biológicos; eles têm estabilidades muito mais altas e podem ser armazenados secos por meses ou anos, sintetizados em grandes quantidades a partir de monômeros prontamente disponíveis e usados em solventes não aquosos e em uma faixa de temperaturas [45]. Uma ampla variedade de protocolos pode ser usada. Por exemplo, polímeros inorgânicos contendo glucose foram depositados em um QCM por um processo sol-gel, a glucose foi lavada e o sistema resultante demonstrou atuar como um sensor, fornecendo um aumento de massa quando exposto a glucose aquosa [47]. Os polímeros também podem ser depositados eletroquimicamente nas superfícies dos eletrodos na presença de um molde. Por exemplo, a poli(o-fenilenodiamina) pode ser depositada eletroquimicamente a partir de soluções modelo em um chip QCM para fornecer sensores para atropina (com uma faixa linear entre 8×10^{-6} e 4×10^{-3} M) [48]. Alvos muito maiores também podem ser usados; por exemplo, várias enzimas podem ser incorporadas em polímeros reticulados e depois removidas, e os MIPs resultantes exibem fortes afinidades de ligação para esses modelos [49]. Esses tipos de sistema foram aplicados com sucesso na detecção de vírus na seiva da planta do tabaco usando chips QCM [50].

A maioria desses MIPs tem sido utilizada como filmes sólidos, uma vez que a reação de reticulação os torna completamente insolúveis. No entanto, métodos mais recentes de fabricação de MIPs de nanopartículas, que são solúveis, chegaram ao campo [51, 52].

Por exemplo, MIPs nanométricos para uma variedade de substratos podem ser sintetizados e usados em ensaios ELISA

competitivos, proporcionando desempenho comparável ou melhor do que ensaios baseados em anticorpos comerciais com limites de detecção tão baixos quanto 1 pM [50]. Sensores biomiméticos baseados em MIP foram desenvolvidos com sucesso para vírus [51-53], toxinas [9, 10, 54] e drogas [45, 46, 55] nos últimos anos na forma de nanopartículas, que podem ser imobilizadas covalentemente em chips de sensor de ouro. Além disso, a regeneração de superfícies de sensores usando soluções ácidas e/ou básicas também é possível, o que permite usar o mesmo sensor várias vezes e diminuir substancialmente o custo e o tempo necessários. Uma pesquisa abrangente sobre adenovírus comparou a eficiência de detecção de anticorpos e esses MIPs empregando biossensores SPR [52], o que indica o futuro promissor desses receptores de reconhecimento para muitos analitos importantes. Os últimos anos também testemunharam as implementações de MIPs em biossensores para a detecção de biomarcadores de doenças.

Referencias

- 1 Altintas, Z.; Kallempudi, S. S.; Sezerman, U.; Gurbuz, Y. *Sens. Actuators B Chem.* **2012**, 174, 187-194.
- 2 Altintas, Z.; Fakanya, W. M.; Tothill, I. E. *Talanta* **2014**, 128, 177-186.
- 3 Altintas, Z.; Tothill, I. E. *Nanobiosens. Dis. Diagn.* **2015**, 4, 1-10.
- 4 Altintas, Z.; Tothill, I. *Sens. Actuators B Chem.* **2013**, 188, 988-998.
- 5 Altintas, Z.; Uludag, Y.; Gurbuz, Y.; Tothill, I. E. *Talanta* **2011**, 86, 377-383.
- 6 Altintas, Z.; Tothill, I. E. *Sens. Actuators B Chem.* **2012**, 169, 188-194.
- 7 Kallempudi, S. S.; Altintas, Z.; Niazi, J. H.; Gurbuz, Y. *Sens. Actuators B Chem.* **2012**, 163, 194-201.

- 8 Altintas, Z.; Kallempudi, S. S.; Gurbuz, Y. *Talanta* **2014**, 118, 270–276.
- 9 Abdin, M. J.; Altintas, Z.; Tothill, I. E. *Biosens. Bioelectron.* **2015**, 67, 177–183.
- 10 Altintas, Z.; Abdin, M. J., Tothill, A. M.; Karim, K.; Tothill, I. E. *Anal. Chim. Acta* **2016**, 935, 239–248.
- 11 Clark L.; Lyons C. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1962**, 102, 29–45.
- 12 Newman, J. D., Tigwell, L. J., Turner, A. P. F., Warner, P. J. *Biosensors: A Clearer View*. Proceedings of the 8th World Congress on Biosensors, Granada, Spain, May 24–26, **2004**, pp. 17–20.
- 13 Thusu, R. Strong Growth Predicted for Biosensors Market, **2010**
- 14 Cass, A. E. G.; Davis, G.; Francis, G. D.; Hill, H. A.; Aston, W. J.; Higgins, I. J.; Plotkin, E. V.; Scott, L. D.; Turner, A. P. F. *Anal. Chem.* **1984**, 56, 667–671.
- 15 Degani, Y.; Heller, A. *J. Phys. Chem.* **1987**, 91, 1285–1289.
- 16 Davis, F.; Higson, S. P. J. *Biosens. Bioelectron.* **2005**, 21, 1–20.
- 17 Diaz-Gonzalez, M.; Gonzalez-Garcia, M. B.; Costa-Garci, A. *Electroanalysis* **2005**, 17, 1901–1918.
- 18 Rodriguez-Mozaz, S.; de Alda, M. J. L.; Barcelo, D. *Anal. Bioanal. Chem.* **2006**, 386, 1025–1041.
- 19 Watson, J. D.; Crick, F. H. C. *Nature* **1953**, 171, 737–738
- 20 Davis, F.; Higson, S. P. J. DNA and RNA biosensors, in *Biosensors for Medical Applications*, Ed. Higson, S. P. J., Woodhead, Cambridge, **2012**, 161–190.
- 21 Gooding J. J. *Electroanalysis* **2002**, 14, 1149–1156.
- 22 Pividori, M. I.; Merkoci, A.; Alegret S. *Biosens. Bioelectron.* **2000**, 15, 291–303.
- 23 Wang, J.; Rivas, G.; Cai, X.; Palecek, E.; Nielsen, P.; Shiraishi, H.; Dontha, N.; Luo, D.; Parrado, C.; Chicharro,

- M.; Farias, P. A. M.; Valera, F. S.; Grant, D. H.; Ozsoz, M.; Flair, M. N. *Anal. Chim. Acta* **1997**, 347, 1–8.
- 24** Cagnin, S.; Caraballo, M.; Guiducci, C.; Martini, P.; Ross, M.; SantaAna, M.; Danley, D.; West, T.; Lanfraanchi, G. *Sensors* **2009**, 9, 3122–3148.
- 25** Armistead, P. M.; Thorp, H. H. *Bioconjug. Chem.* **2002**, 13, 172–176.
- 26** Zaytseva, N. V.; Montagna, R. A.; Baeumner, A. J. *Anal. Chem.* **2005**, 77, 7520–7527.
- 27** Piliarik, M.; Párová, L.; Homola, J. *Biosens. Bioelectron.* **1959**, 24, 1399–1404.
- 28** Holford, T. R. J.; Davis, F.; Higson, S. P. J. *Biosens. Bioelectron.* **2012**, 34, 12–24.
- 29** Yalow, R. S.; Berson, S. A. *Nature* **1959**, 184, 1648–1649.
- 30** Engvall, E.; Perlmann, P. *Immunochemistry* **1971**, 8, 871–874.
- 31** Song, S.; Wang, L.; Li, J.; Zhao, J.; Fan, C. *Trends Anal. Chem.* **2008**, 27, 108–117.
- 32** Jenison, R. D.; Gill, S. C.; Pardi, A.; Polisky, B. *Science* **1994**, 263, 1425–1429.
- 33** Liu, Q.; Wang, J.; Boyd B. J. *Talanta* **2015**, 136, 114–127.
- 34** Masson, V.; de la Ballina, L. R.; Munaut, C.; Wielockx, B.; Jost, M.; Maillard, C.; Blacher, S.; Bajou, K.; Itoh, T.; Itohara, S.; Werb, Z.; Libert, C.; Foidart, J. M.; Noel, A. *FASEB J.* **2004**, 18, 234–236.
- 35** Maatta, M.; Soini, Y.; Liakka, A.; Autio-Harminen, H. *Clin. Cancer Res.* **2000**, 6, 2726–2734.
- 36** Ara, T.; Fukuzawa, M.; Kusafuka, T.; Komoto, Y.; Oue, T.; Inoue, M.; Okada, A. *J. Pediatr. Surg.* **1998**, 33, 1272–1278.
- 37** Medintz, I. L.; Clapp, A. R.; Brunel, F. M.; Tiefenbrunn, T.; Uyeda, H. T.; Chang, E. L.; Deschamps, J. R.; Dawson, P. E.; Mattoussi, H. *Nat. Mater.* **2006**, 5, 581–589.

- 38 Pavan, S.; Berti, F. *Anal. Bioanal. Chem.* **2012**, 402, 3055–3070.
- 39 Heurich, M.; Altintas, Z.; Tothill, I. E. *Toxins* **2013**, 5, 1202–1218.
- 40 Yan, M.; Ranstrom, O. *Molecularly Imprinted Materials: Science and Technology*, Taylor & Francis, New York, **2004**.
- 41 Alexander, C.; Andersson, H. S.; Andersson, L. I.; Ansell, R. J.; Kirsch, N.; Nicholls, I. A.; O'Mahony, J.; Whitcombe, M. J. *J. Mol. Recognit.* **2006**, 19, 106–180.
- 42 Whitcombe, M. J.; Vulfson, E. N. *Adv. Mater.* **2001**, 13, 467–478.
- 43 Altintas, Z. Molecular imprinting technology in advanced biosensors for diagnostics, in *Advances in Biosensor Research*, Ed. Everett, T. G., Nova Science Publishers Inc, New York, **2015**, 1–30. *References* 15
- 44 Altintas, Z. Advanced imprinted materials for virus monitoring, in *Advanced Molecularly Imprinting Materials*, Eds. Tiwari, A., Uzun, L., Wiley-Scrivener Publishing LLC, Beverly, **2016**, 389–412.
- 45 Altintas, Z.; Guerreiro, A.; Piletsky, S. A.; Tothill, I. E. *Sens. Actuators B Chem.* **2015**, 213, 305–313.
- 46 Altintas, Z.; France, B.; Ortiz, J. O.; Tothill, I. E. *Sens. Actuators B Chem.* **2016**, 224, 726–737.
- 47 Lee, S. W.; Kunitake, T. *Mol. Cryst. Liq. Cryst.* **2001**, 37, 111–114.
- 48 Peng, H, Liang, C. D.; Zhou, A. H.; Zhang, Y. Y.; Xie, Q. J.; Yao, S. Z. *Anal. Chim. Acta* **2000**, 423, 221–228.
- 49 Hayden, O.; Bindeus, R.; Haderspock, C.; Mann, K. J.; Wirl, B.; Dickert, F. L. *Sens. Actuators B* **2003**, 91, 316–319.
- 50 Smolinska-Kempisty, K.; Guerreiro, A.; Canfarotta, F.; Cáceres, C.; Whitcombe, M. J.; Piletsky, S. F. *Nat. Sci. Rep.* **2016**, 6, 37638.

51 Altintas, Z.; Pocock, J.; Thompson, K.-A.; Tothill, I. E. *Biosens. Bioelectron.* **2015**, *74*, 994–1004.

52 Altintas, Z.; Gittens, M.; Guerreiro, A.; Thompson, K.-A.; Walker, J.; Piletsky, S.; Tothill, I. E. *Anal. Chem.* **2015**, *87*, 6801–6807.

53 Altintas, Z.; Guerreiro, A.; Piletsky, S. A.; Tothill, I. E. *Affinity molecular receptor for viruses capture and sensing*, **2014**, GB Patent, GB1413209.6.

54 Altintas, Z.; Abdin, M. J.; Tothill, I. E. *MIP-NPs for endotoxin filtration and monitoring*, **2014**, GB Patent, GB1413206.2.

55 Altintas, Z.; Tothill, I. E. *Molecularly imprinted polymer-based affinity nanomaterials for pharmaceuticals capture, filtration and detection*, **2014**, GB Patent, GB1413210.4.