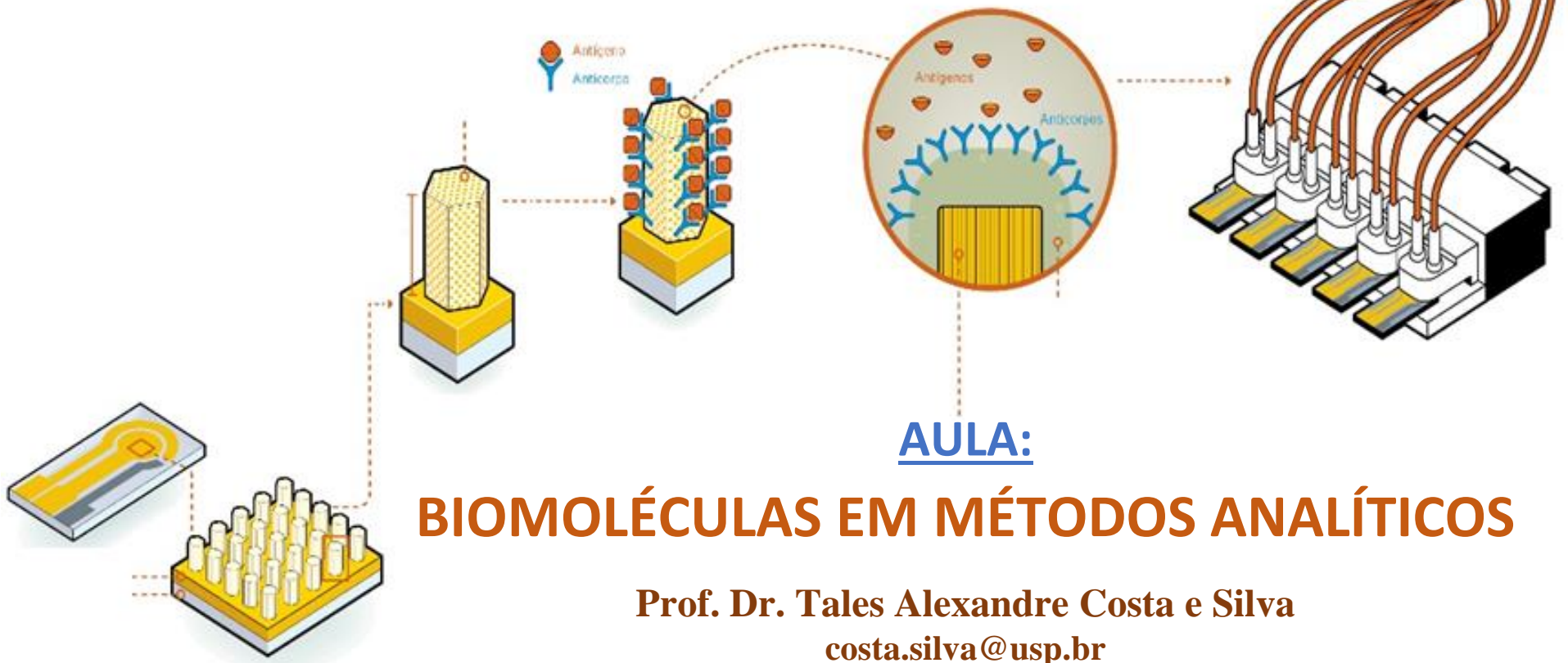




# UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Faculdade de Ciências Farmacêuticas  
FCF/USP



Disciplina: FBT 0535 - BIOTECNOLOGIA FARMACÊUTICA – Novembro de 2020

# BIOSENSORES

Qualquer tipo de **MEDIDA** feito em um sistema biológico.

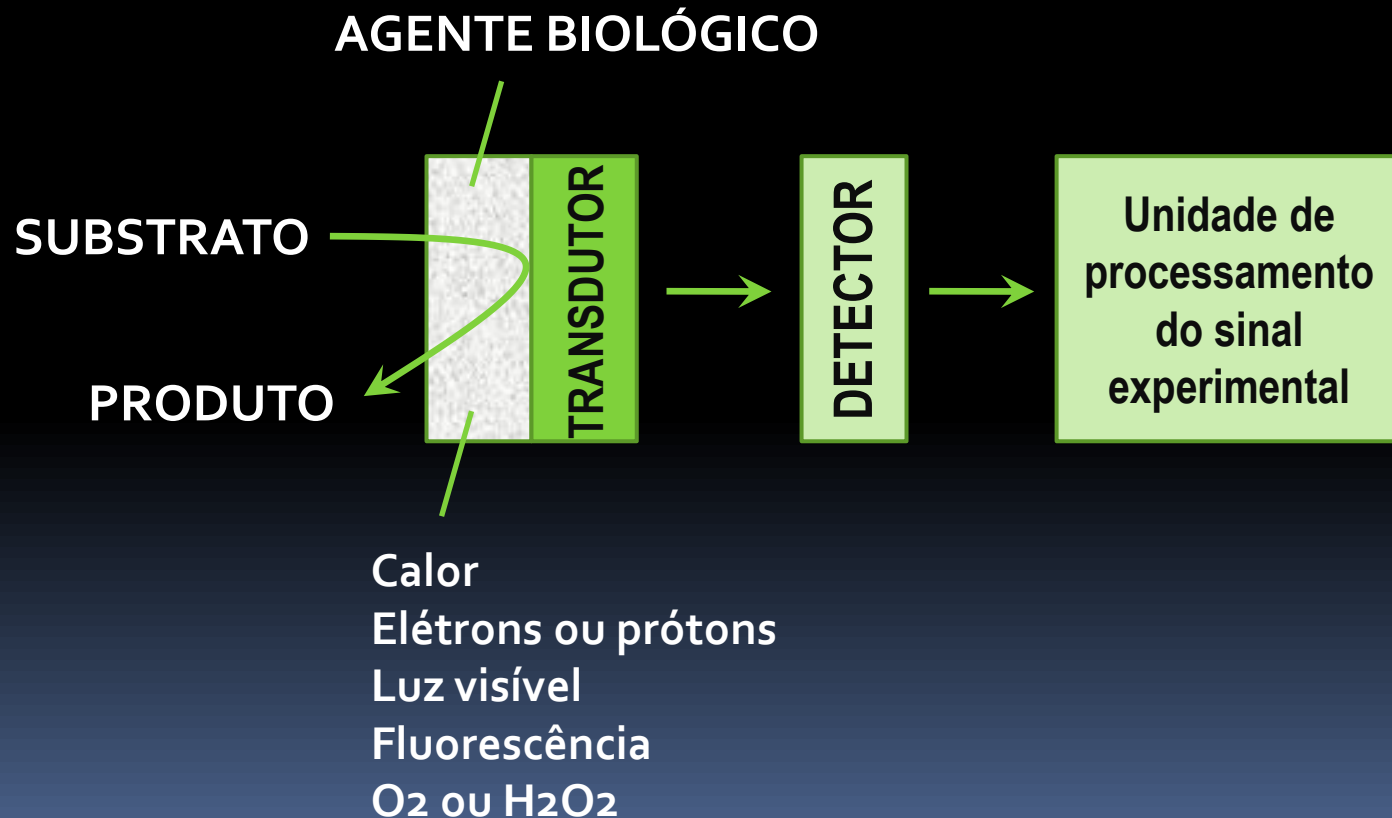
São instrumentos de sensibilidade construídos pela combinação de especificidade de biomoléculas como sinal de **TRANSDUÇÃO** e capacidade de processamento de componentes de origem elétrica e/ou ótica.

São sensores no qual o elemento sensível do detector é, normalmente, uma enzima imobilizada bem próxima a um **ELETRODO** capaz de captar ou doar elétrons liberados ou solicitados pela reação enzimática.

Biossensor é um aparelho que incorpora um elemento sensor de **ORIGEM BIOLÓGICA** que está conectado a um transdutor

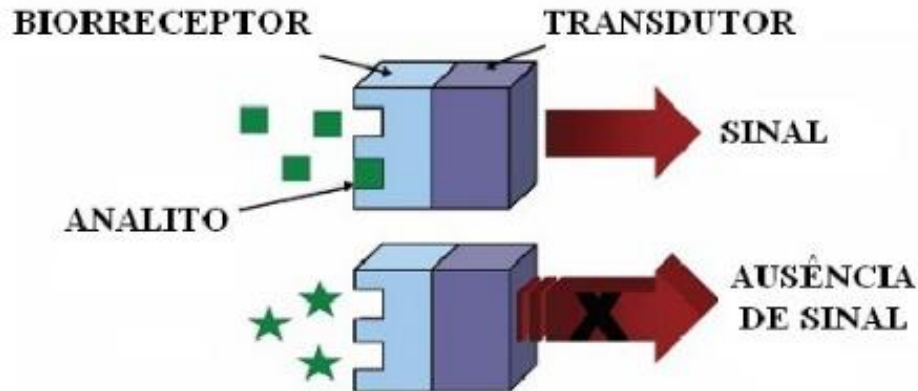
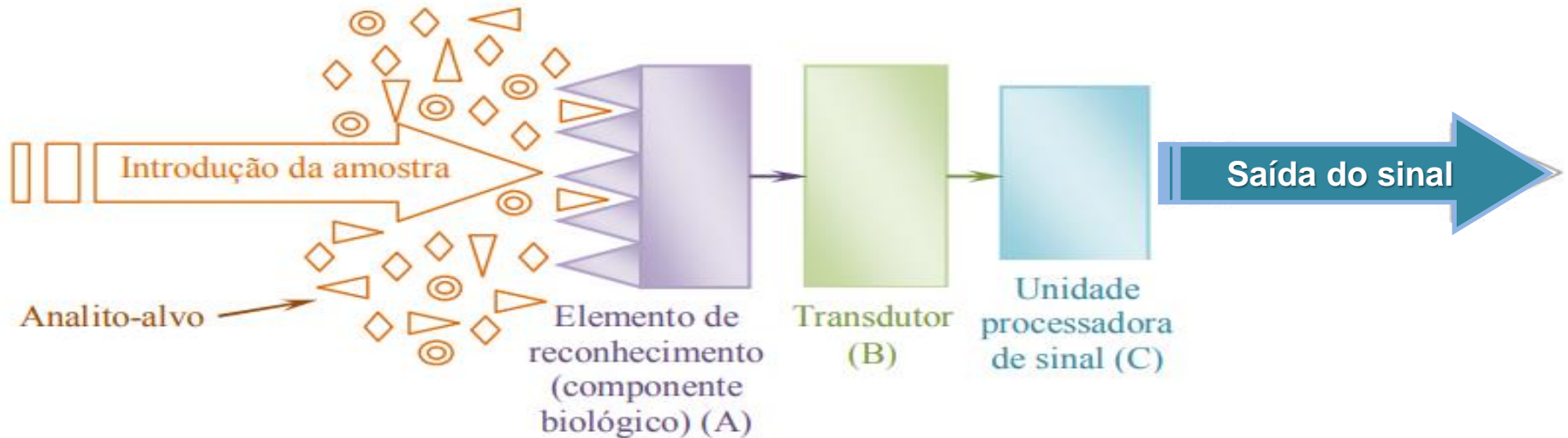
# CONSTITUINTES DE UM BIOSSENSOR TÍPICO

- **COMPONENTES:** i) AGENTE BIOLÓGICO ii) TRANSDUTOR iii) RECEPTOR



# COMO FUNCIONA?

- AGENTES BIOLÓGICOS: enzimas, anticorpos, tecidos biológicos, células, DNA, etc;



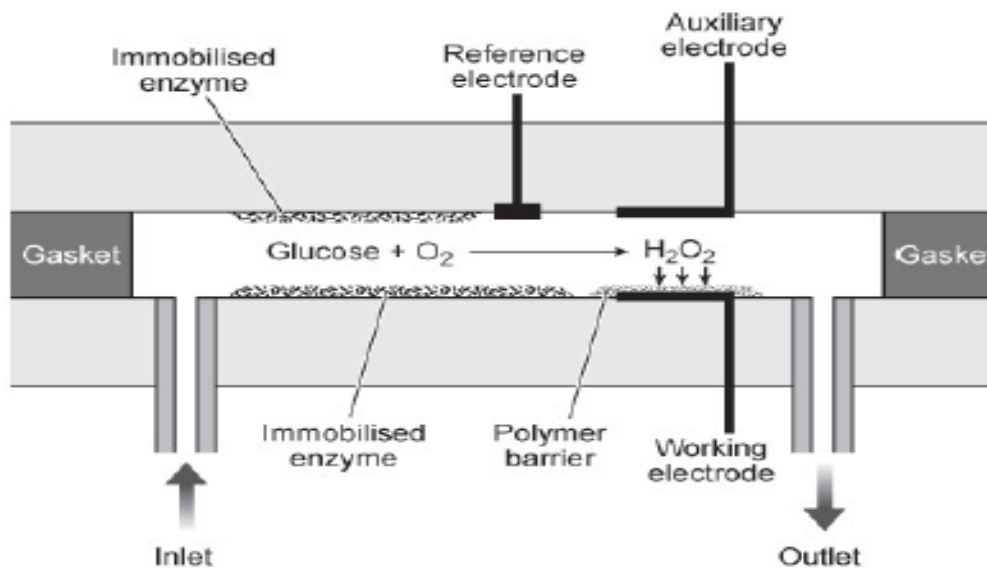
# PRIMEIRO BIOSSENSOR, APROVADO EM 1962.

## Dosagem de glicose



1918 - 2005

**Professor  
Leland C Clark**



**Fig. 2** Diagram of the glucose sensor showing the electrode configuration, the polymer barrier deposited onto the working electrode, and the surface where the enzyme (glucose oxidase) is immobilized.



- **Utiliza o princípio da redução eletroquímica do oxigênio.**
- **A corrente elétrica gerada é diretamente proporcional à velocidade de consumo de oxigênio; que é proporcional à concentração de glicose**

# HISTÓRIA DOS BIOSSENSORES

- 1916 - Primeiro relato de imobilização de proteínas: adsorção de invertase em carvão ativado
- 1922 - Primeiro eletrodo de pH de vidro
- 1956 - Clark publicou seu artigo definitivo sobre o eletrodo de oxigênio.
- 1962 - Primeira descrição de um biossensor: um eletrodo de enzima amperométrica para glicose (Clark)
- 1969 - Guilbault e Montalvo - Primeiro biossensor potenciométrico: urease imobilizada em eletrodo de amônia para detecção de uréia
- 1970 - Bergveld - transdutor de efeito de campo seletivo de íons (ISFET)
- 1975 - Lubbers e Opitz descreveram um sensor de fibra óptica com indicador imobilizado para medir dióxido de carbono ou oxigênio.

# HISTÓRIA DOS BIOSSENSORES

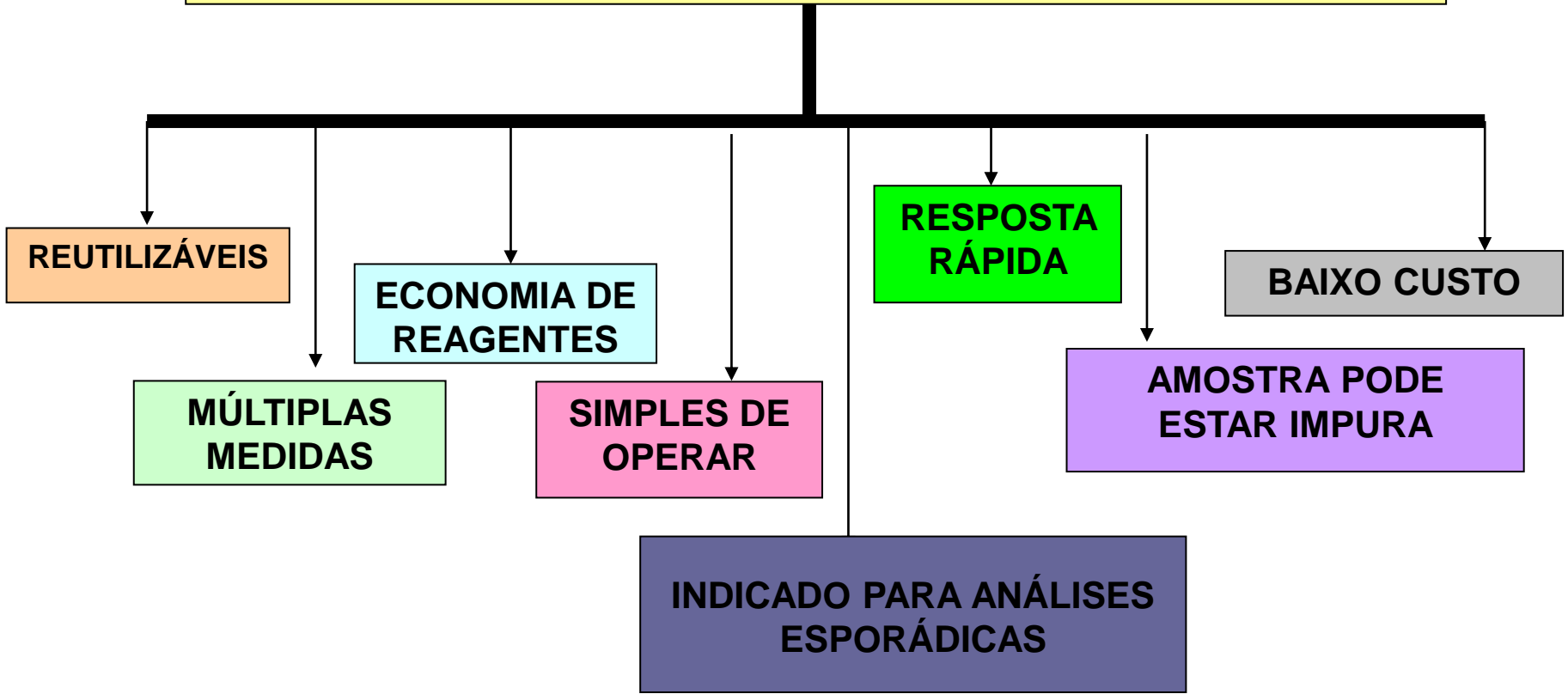
- 1975 - Primeiro biossensor comercial (biossensor de glicose da Yellow Springs Instruments)
- 1975 - Primeiro biossensor baseado em micróbio, primeiro imunossensor
- 1980 - Primeiro sensor de fibra óptica de pH para gases sanguíneos in vivo (Peterson)
- 1982 - Primeiro biossensor baseado em fibra óptica para glicose
- 1984 - Primeiro biossensor amperométrico mediado: ferroceno usado com glicose oxidase para detecção de glicose
- 1992 - Biossensor de sangue portátil por i-STAT
- Atual - Pontos quânticos, nanopartículas, nanofios, nanotubos, etc.

# Biossensores em nanoescala

- ❑ Bainhas moleculares ao redor do nanotubo são desenvolvidas para responder a um determinado produto químico e modular as propriedades ópticas do nanotubo.
- ❑ Uma camada de proteínas olfativas em um nanoeletrodo reage com odorantes de baixa concentração (Projeto SPOT-NOSED). Os médicos podem usar para diagnosticar doenças em estágios iniciais.
- ❑ Nanopartículas de Ag triangulares derivadas de litografia de nanosfera (NSL) são usadas para detectar estreptavidina em concentrações de até um picomolar.
- ❑ A Escola de Engenharia Biomédica desenvolveu um nanobiossensor piezoelétrico baseado em anticorpos para ser usado na detecção de antraz e hepatite por HIV.



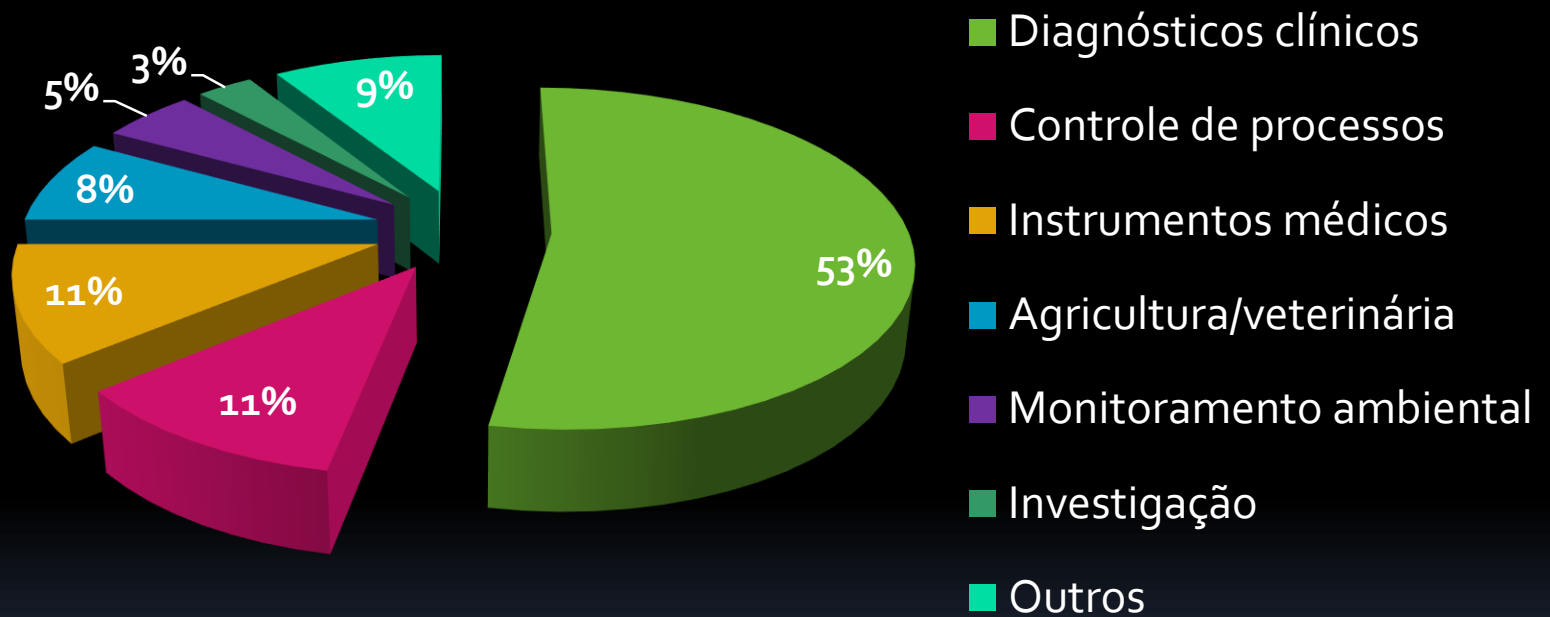
# VANTAGENS NO USO DE BIOSSENSORES



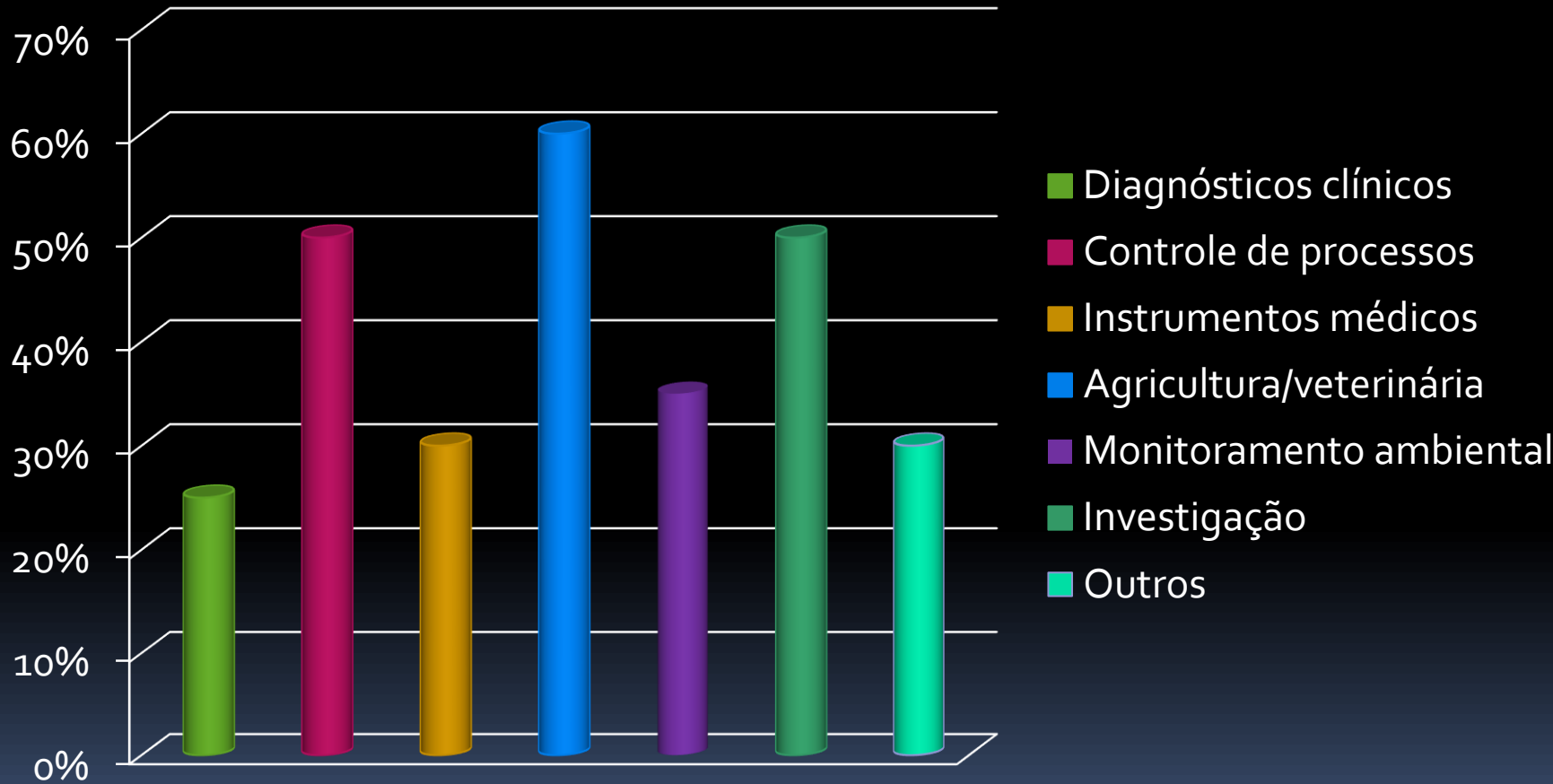
**DESVANTAGEM**

**PERDA DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA COM O TEMPO**

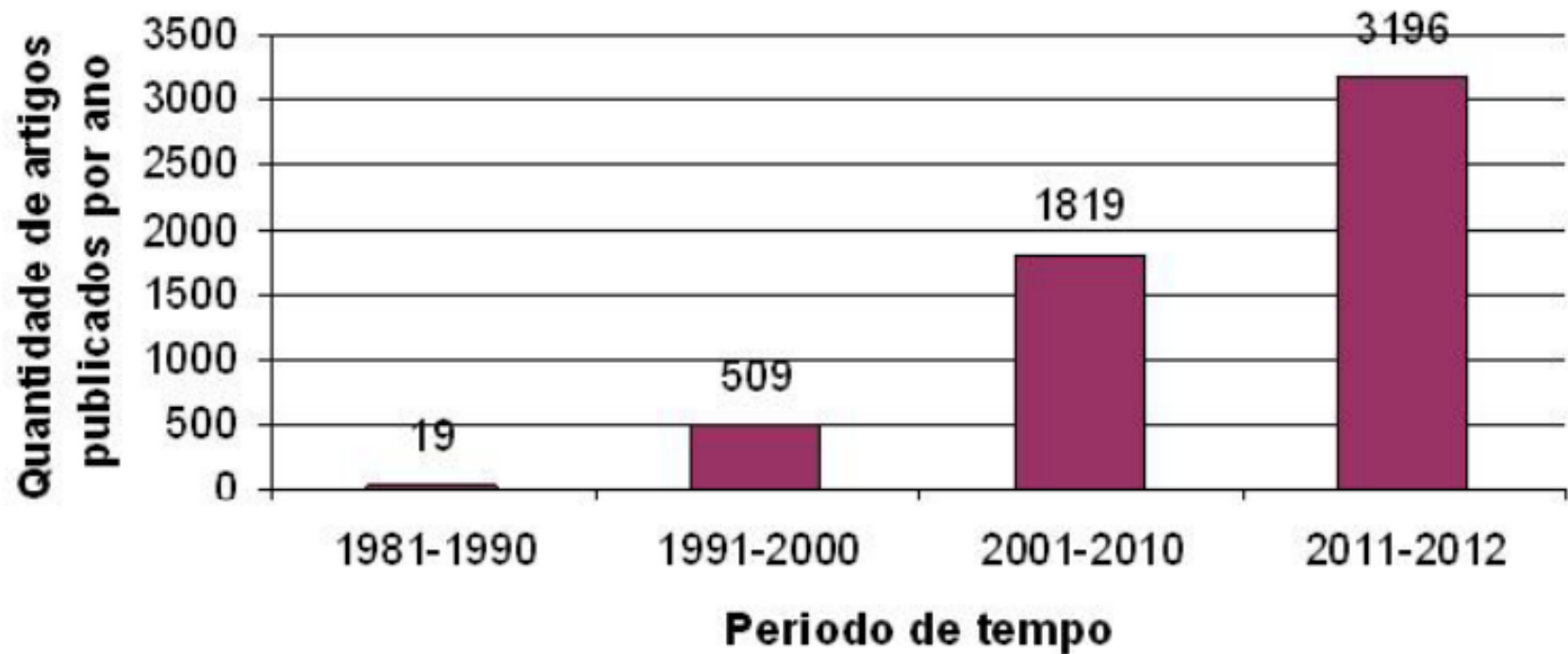
# ÁREAS DE APLICAÇÃO



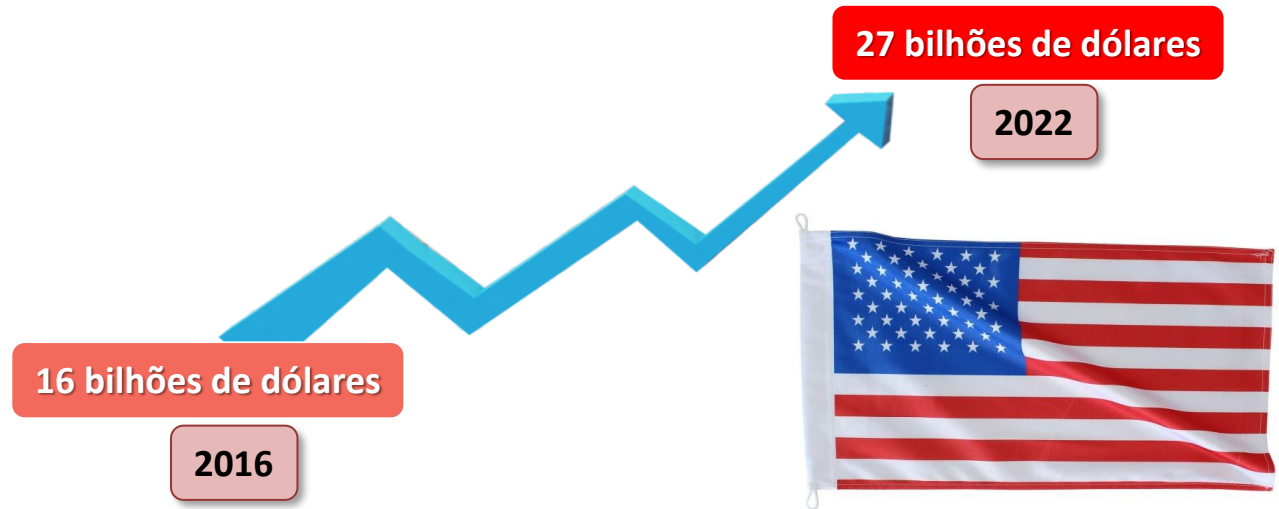
# CRESCIMENTO ANUAL



## Artigos sobre Biossensores no Web of Science



# MERCADO BIOSSENSORES



Biossensores médicos: 66% do mercado.

Principais empresas investidoras: Abbott Laboratories e Johnson & Johnson e a alemã Bayer Healthcare.

Custo produção eletrodos de biossensores: US\$ 2 (escala laboratorial)

- **MÉDICA** ⇒ monitoramento das condições de pacientes portadores de problemas crônicos;
- **BIOMÉDICA** ⇒ diagnósticos rápidos e precisos, em tempo real;
- **ALIMENTÍCIA** ⇒ detecção de contaminantes químicos, biológicos e toxicológicos;
- **FARMACÊUTICA** ⇒ screening de fármacos, análise de insumos farmacêuticos e produtos acabados, monitoramento in vivo da ação de fármacos e toxinas;
- **AMBIENTAL** ⇒ monitoramento da contaminação em águas, resíduos industriais e emissão de gases poluentes;

- **BIOTECNOLÓGICA** ⇒ otimização do bioprocesso para obtenção de biocombustível;
- **MILITAR** ⇒ detecção de toxinas e patógenos no combate do bioterrorismo;
- **AGRICULTURA** ⇒ detectar e quantificar patógenos bacterianos e virais, definindo posições com auxílio de sistema de posicionamento global (GPS). Detectar pesticidas em alimentos e no solo;
- **PECUÁRIA** ⇒ detecção de fármacos residuais em animais destinados ao consumo como alimentos.

# Biossensores Comerciais

## Análises Clínicas

Cl<sup>-</sup>, Na<sup>+</sup>

Glicose, Insulina

Ureia

Cetona

Etanol

Lactato

Ácido Úrico

Creatinina

Hematócrito

Gases sanguíneos

Hemoglobina

G6PD

Colesterol

Triglicerídeos

*E. coli*

## Biodefesa

Antraz

Enterotoxina estafilocócica

Ricina

Vírus Vaccinia

*F. tularensis*

*Coxiella burnetti*

*Brucella*

Toxina botulínica

*Y. pestis*

Encefalite equina  
venezuelana

*V. cholerae*

*Salmonella*

*Listeria*

*E. coli*

## Segurança e Qualidade Alimentar

*Salmonella*

*Campylobacter*

Toxina botulínica

Atrazina

Esporos

*E. coli*

*S. aureus*

*Enterococcus*

Antibióticos

Metais pesados

Etanol, Metanol

Glicose, Sacarose

Lactose, Galactose

Ácido ascórbico



# Biossensores Comerciais

## Análises Clínicas

HIV

*Helicobacter pylori*

Vírus Influenza

*Streptococcus*

*M. tuberculosis*

*Cryptosporidium, Giardia*

Mosquito *Anopheles*

Adenovírus, Rotavírus

*Legionella*

PSA, CEA, AFP

Sangue oculto nas fezes

CA125, CA19-9, CA15-3

## Controle de Processos Fermentativos

Glicose, Glicerol

Glutamato

Lactose, Galactose

Etanol, Metanol

Dióxido de carbono

Maltose

Frutose, Sacarose

Lactato

Aminoácidos totais

Xilose

Leucina, Isoleucina

Tirosina

## Monitoramento Ambiental

Demanda Bioquímica de Oxigênio 5

Nitrato

Dioxina

*E. coli*

# BIOSENSOR IDEAL

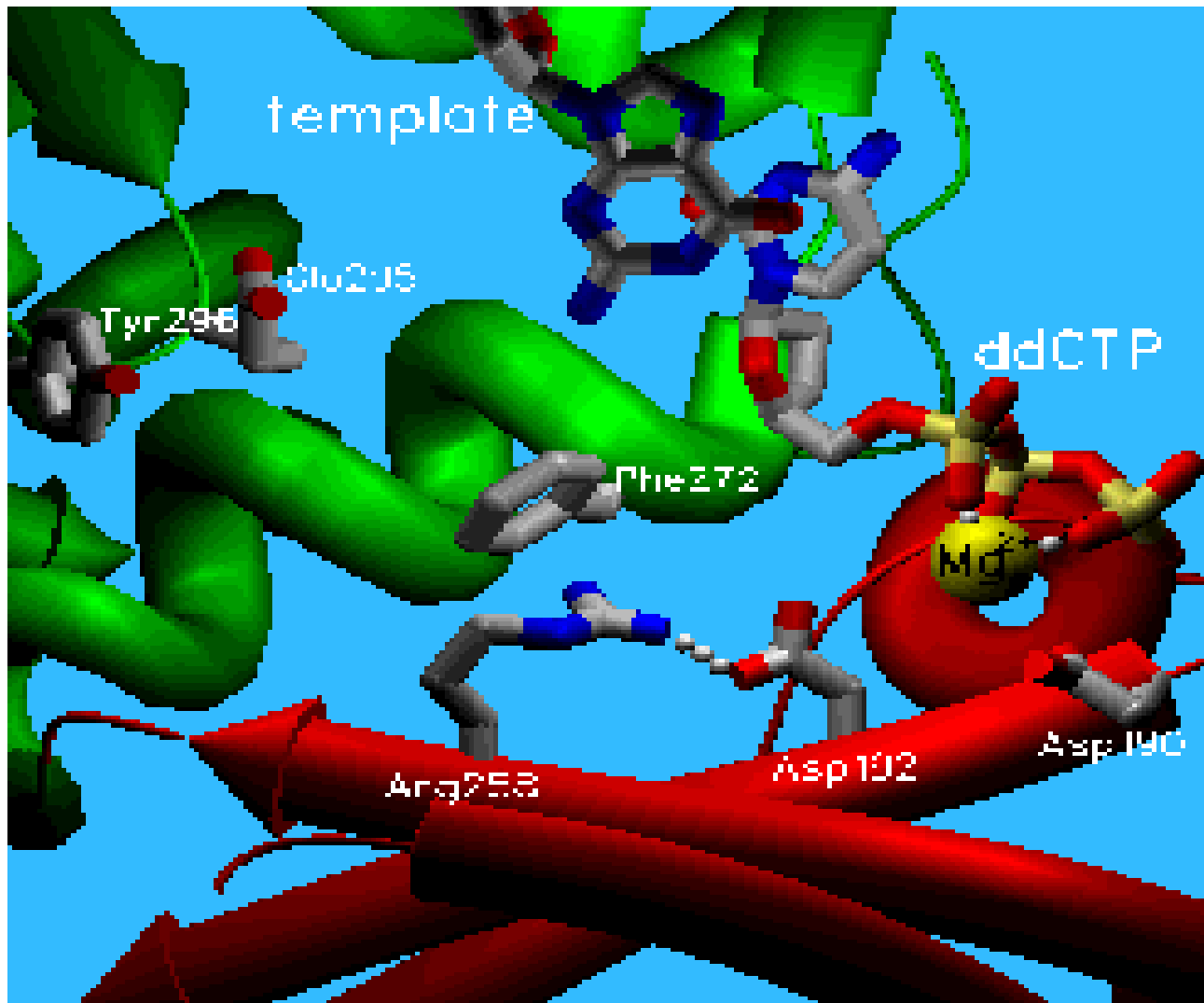
- **SELETIVIDADE** → elevada afinidade para um ÚNICO componente => relacionar sinal com a concentração;
- **PROPORCIONALIDADE** → sinal medido deve ser proporcional a variação da propriedade físico-química resultante da reação;
- **RAPIDEZ** → tempo de resposta lento => afeta o intervalo, limitar o seu uso em um composto em tempo real;
- **SENSIBILIDADE** → variação do sinal por unidade de concentração analisada; sinais da amostra e ruído (linha de base => o limite de detecção do biossensor);
- **ESTABILIDADE** → ELEVADA: armazenagem e operacional;
- **REUTILIZAÇÃO** → minimiza custos de fabricação; garante repetibilidade.



- **FATORES QUE INTERFEREM NA RESPOSTA:**

- Cinética da reação enzimática
- Concentração do composto a analisar e sua difusão
  - Construção do biossensor
    - Modo de operação
  - Espessura do filme biológico
    - pH
    - Temperatura

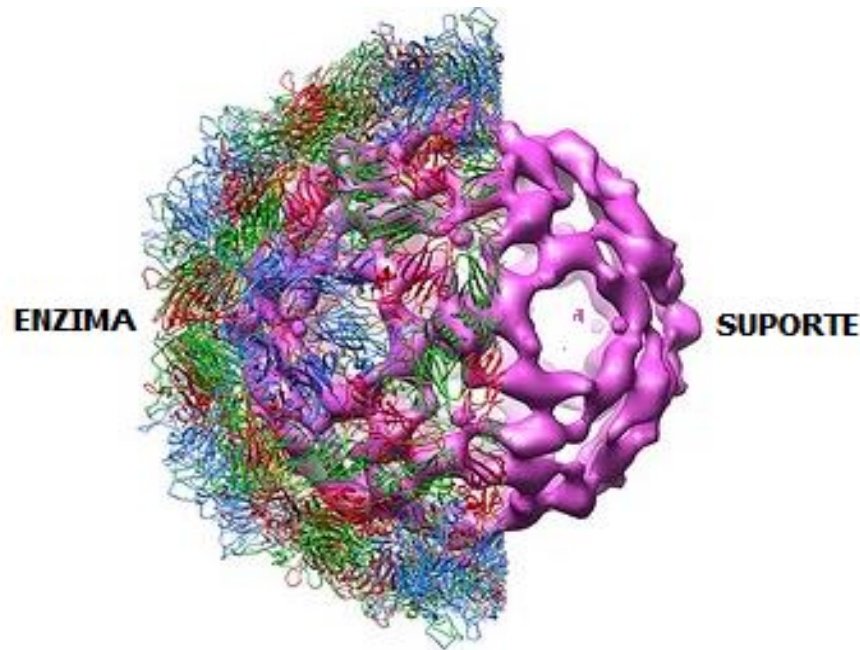
# IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMAS



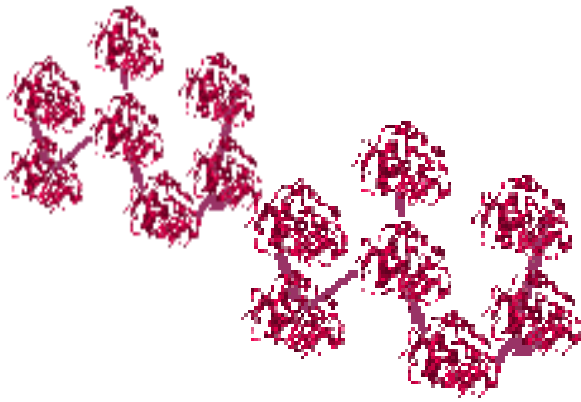
# PORQUE IMOBILIZAR ENZIMAS?

- As enzimas podem ser usadas repetidamente.
- Possibilita a interrupção da reação, rapidamente, pela remoção das enzimas do meio reacional.
- As enzimas são geralmente estabilizadas pela imobilização.
- Os produtos não são contaminados com enzimas, principalmente os alimentos e produtos farmacêuticos.

O principal interesse em imobilizar uma enzima é obter um **biocatalisador com atividade e estabilidade** que não sejam afetadas durante o processo.

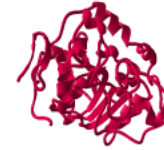


# MÉTODOS DE IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMAS

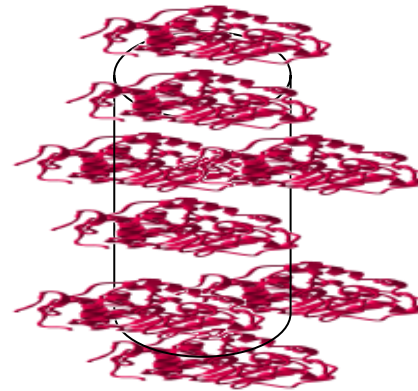


### **Ligações cruzadas**

- Hexametilenodiamina e glutaraldeído



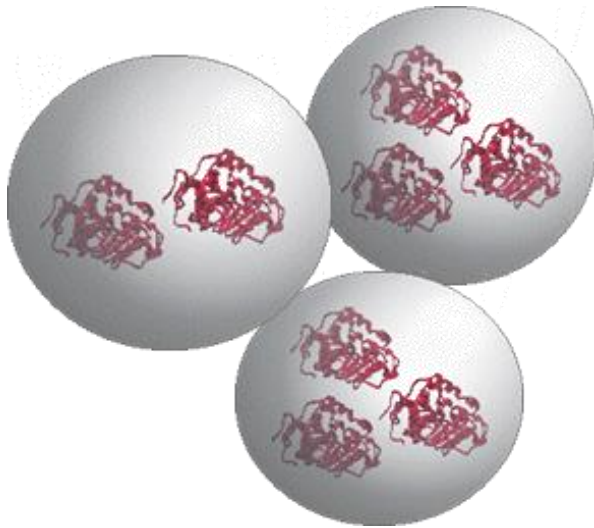
**Enzima**



### **Ligações em suportes**

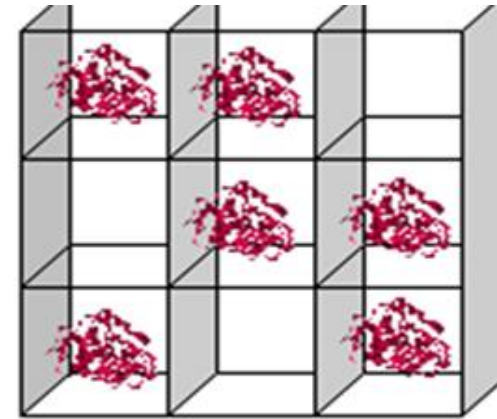
- Ligação covalente: sílica, alumina, celulose, (PEG).
- Adsorção iônica: resinas de troca iônica e de Interação Hidrofóbica.





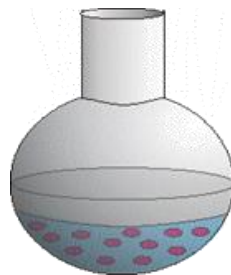
### Confinamento em microcápsula

- Gelatina, quitosana, alginato carragenana com cloreto de cálcio ou potássio



### Confinamento em matriz

- Polímeros naturais: gel de agar, caseinato de sódio
- Orgonogéis de microemulsão óleo-água, aerogéis de sílica.



- ← Solvente orgânico
- ← Água + enzima

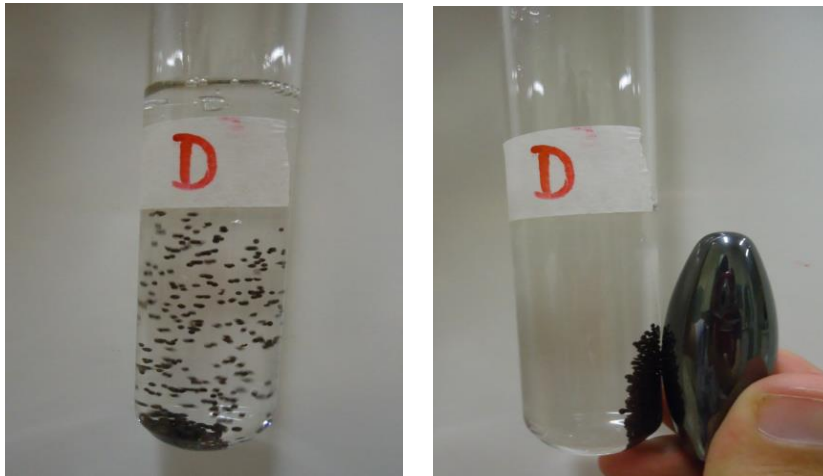
### Sistema bifásico

# QUAL MÉTODO É MELHOR OU MAIS EFICIENTE?

**A escolha do método de imobilização depende da situação específica na qual a enzima será usada.**

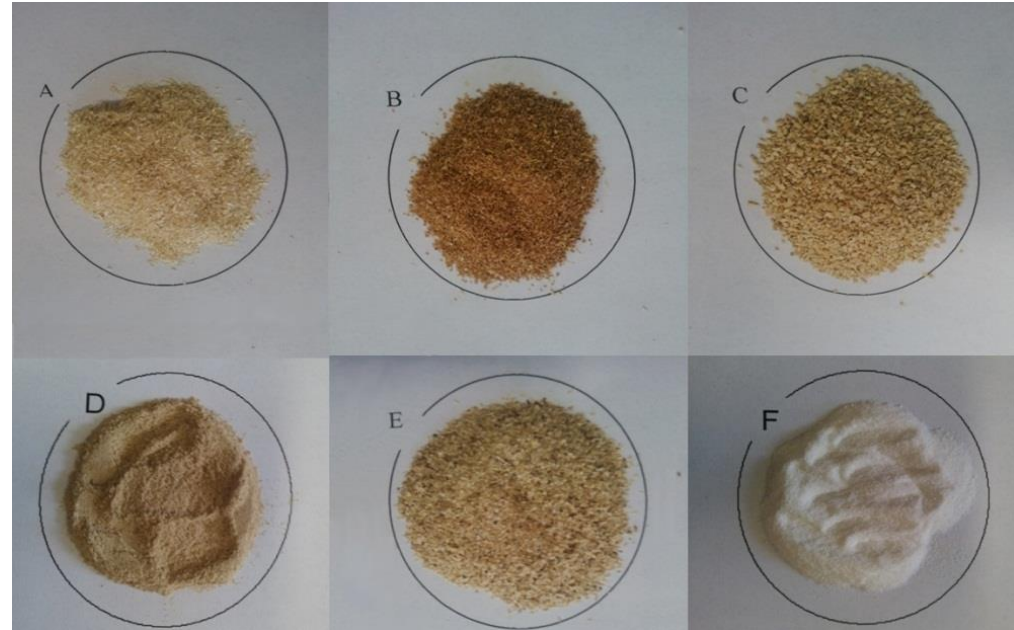
**Com base nesta resposta escolhe-se o método de imobilização.**

**ESFERAS DE QUITOSANA → produção de aromas**



**Dispersão e efeito magnético de derivados imobilizados**

**Enzimas imobilizadas em resíduos agroindustriais → produção de biodiesel**



**A) Bagaço de cana-de-açúcar - B) Fibra de coco verde - C) Espiga de milho - D) Casca de arroz - E) Fatia de milho - F) celulose microcristalina.**

# BIOSENSORES

Componente biológico

- Enzima
- Antígeno
- Anticorpo
- Ácidos nucleicos e aptâmeros
- Tecidos
- Células de micro-organismos

Transdutor

- Converte a energia gerada pela reação em: corrente elétrica, potencial químico, ou transdução óptica.
- Acoplado a um instrumento de medição.

Instrumento de medição

Recebe o sinal do transdutor e o traduz em quantidades e proporções.

# AGENTES BIOLÓGICOS

- Nos últimos 20 anos => biossensores teve desenvolvimento exponencial (em investimentos e investigação);
- Agentes biológico: enzima, anticorpos, célula ou tecido, organelas, pares de bases de DNA => reconhecimento e seletividade;
- Parâmetros : - substratos (aminoácidos, carboidratos, álcoois, etc), cofatores (AMP, ATP, FAD, etc), antígenos, hormônios, drogas, inibidores (metais, pesticidas, etc), ativadores de enzimas;

# CÉLULAS OU TECIDOS EM BIOSSENSORES

| SUBSTRATO | TECIDO/CÉLULA                         | ELEMENTO SENSOR |
|-----------|---------------------------------------|-----------------|
| Glutamina | Células de fígado de porco            | NH <sub>3</sub> |
| Adenosina | Células da mucosa intestinal de ratos | NH <sub>3</sub> |
| AMP       | Músculo de coelho                     | NH <sub>3</sub> |
| Guanina   | Fígado de coelho                      | NH <sub>3</sub> |
| Glutamato | Abóbora amarela                       | CO <sub>2</sub> |
| Piruvato  | Semente de milho                      | CO <sub>2</sub> |
| Dopamina  | Polpa de banana                       | O <sub>2</sub>  |
| Tirosina  | Açúcar de beterraba                   | O <sub>2</sub>  |
| Cisteína  | Folha do pepineiro                    | NH <sub>3</sub> |
| Glutamina | Mitocôndria do fígado de porco        | NH <sub>3</sub> |

- Os tecidos ou células são “fontes de enzimas”, pois são elas que realmente exercem a função de agente biológico do biossensor

# VANTAGENS NO USO DE CÉLULAS OU TECIDOS COMO BIOSSENSORES

- **As enzimas são mantidas em seu meio natural;**
- **A atividade da enzima tende a maior estabilização;**
- **São úteis quando não é possível usar enzima pura;**
  - **São mais baratos que enzimas puras.**
- **Os tecidos ou células são “fontes de enzimas”, pois são elas que realmente exercem a função de agente biológico do biossensor**

# MICRO-ORGANISMOS EM BIOSSENSORES

| SUBSTRATOS               | MICRO-ORGANISMOS                     | SENSOR          | RESPOSTA (min) | FAIXA (mg/dm <sup>3</sup> ) |
|--------------------------|--------------------------------------|-----------------|----------------|-----------------------------|
| Açúcares fermentescíveis | <i>Brevibacterium lactofermentum</i> | O <sub>2</sub>  | 10             | 10-200                      |
| Glicose                  | <i>Pseudomonas fluorescens</i>       | O <sub>2</sub>  | 10             | 2-20                        |
| Ácido acético            | <i>Trichosporon brassicae</i>        | O <sub>2</sub>  | 10             | 3-60                        |
| Etanol                   | <i>Trichosporon brassicae</i>        | O <sub>2</sub>  | 10             | 2-25                        |
| Metano                   | <i>Methylomonas flagellata</i>       | O <sub>2</sub>  | 2              | 0-7                         |
| Ácido glutâmico          | <i>Escherichia coli</i>              | CO <sub>2</sub> | 5              | 10-100                      |
| Cefalosporina            | <i>Citrobacter freundii</i>          | pH              | 10             | 100-500                     |
| DBO                      | <i>Trichosporon cutaneum</i>         | O <sub>2</sub>  | 15             | 3-60                        |
| Lisina                   | <i>Escherichia coli</i>              | CO <sub>2</sub> | 5              | 10-100                      |
| Ácido nicotínico         | <i>Lactobacillus arabinosis</i>      | pH              | 60             | 10 <sup>-5</sup> - 5        |



# USO DE MICRO-ORGANISMOS

## Vantagens

Menor custo  
que enzimas  
puras

Menos  
susceptíveis  
a inibições

Mais tolerantes a  
variações no pH e na  
Temperatura

Maior  
tempo de  
vida

## Desvantagens

Maior tempo de  
resposta

Recuperação mais  
demorada

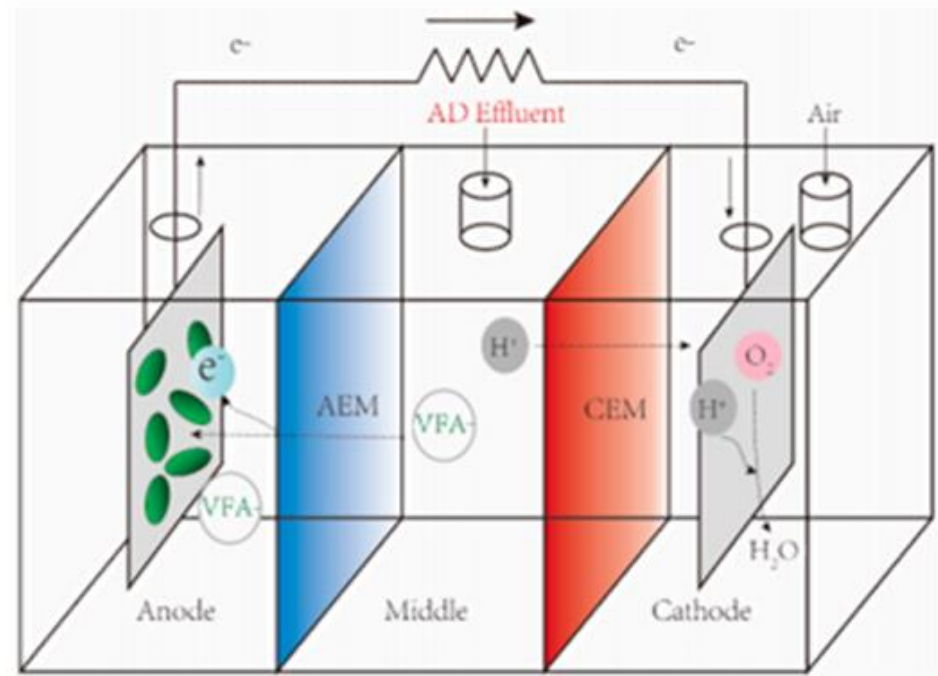
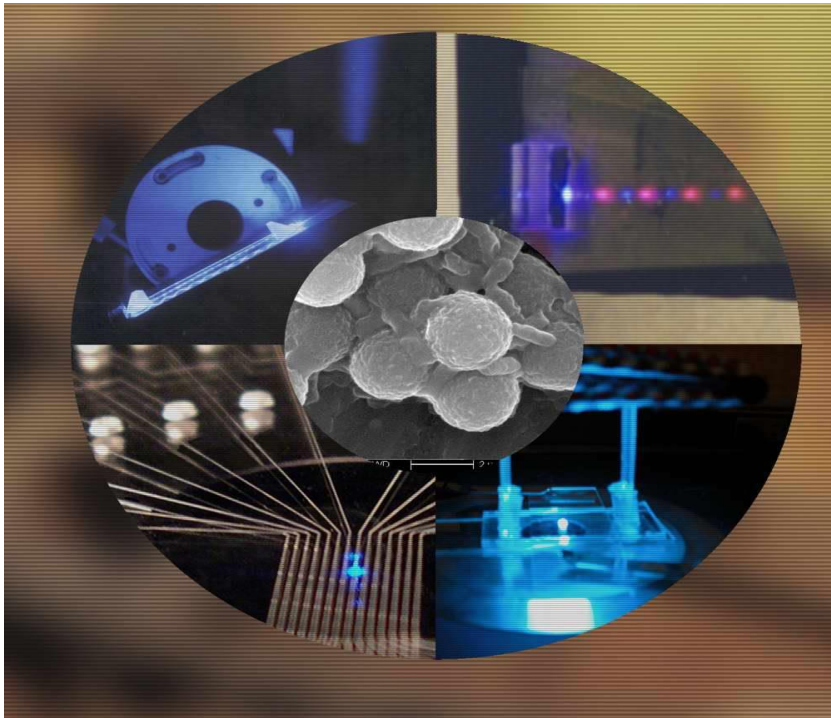
Menor  
seletividade

# CÉLULAS DE MICRO-ORGANISMOS

## APLICAÇÕES

**Micro-organismos catalisam a degradação de um material orgânico, e os elétrons subsequentemente liberados durante esse processo de degradação são transferidos para a superfície do ânodo.**

- **Análise da DBO: monitoramento da qualidade da água;**
- **Detecção de ácidos graxos voláteis;**
- **Monitoramento on-line de tóxicos de águas residuais industriais;**

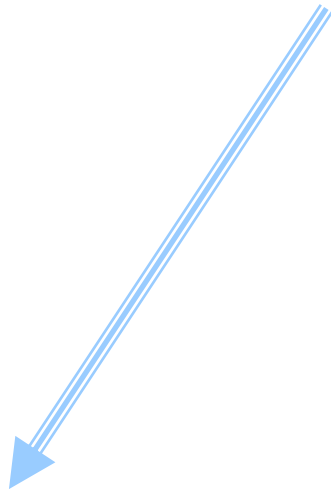


**Figure 3.** Schematic MFC-based VFA biosensor with three chambers. AEM: anion exchange membrane; CEM: cation exchange membrane.

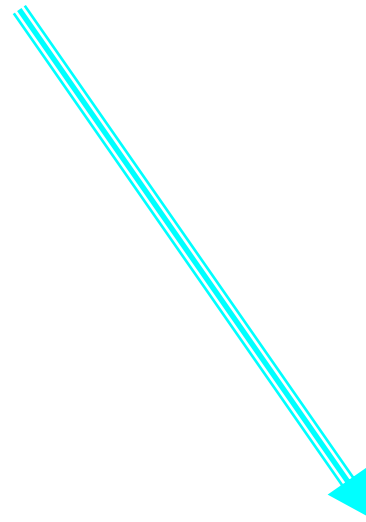
**Efluente anaeróbico da digestão foi dosado em câmara.**

- **Azotobacter** é usado para medir a concentração de nitrato dentro de 5-10 min.
- Os outros organismos usados são **Methylomonas** para metano, **Trichosporon** para acetato e etanol.

# UTILIDADE DA MEDIDA DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA



**COMPONENTE DE  
KIT DIAGNÓSTICO**



**INDICADOR  
DIAGNÓSTICO**

# COMPONENTE DE KIT DIAGNÓSTICO

- amidases, descarboxilases, esterases, fosfatases, nucleases e óxido-redutases;

## MONITORAMENTO DO ANALITO

- **Detecção da redução de substratos consumíveis ou produtos formados;**
- **Detecção de aumento de espécies eletroativas produzidas;**
  - **Detecção na evolução do estado redox do biocatalizador;**
- **Transferência direta de elétrons entre o sítio ativo da enzima e o transdutor.**

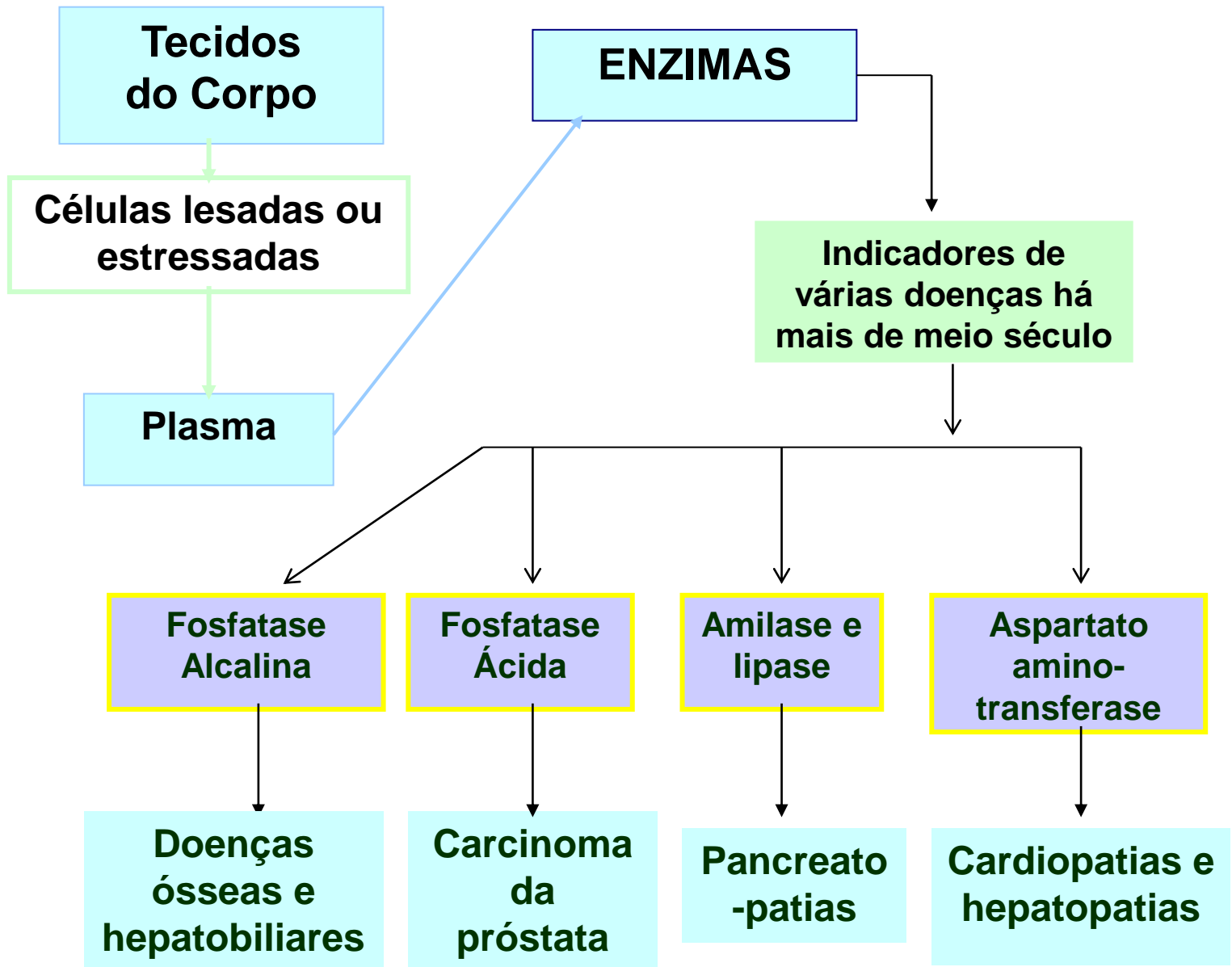
# Principais Produtos Medidos Enzimaticamente

| <i>Produto</i>     | <i>Enzimas usadas</i>             | <i>Reações</i>  |
|--------------------|-----------------------------------|---|
| Álcool             | Álcool desidrogenase              | $\text{Etanol} + \text{NAD} \rightarrow \text{acetaldeído} + \text{NADH}$   |
| Amônia             | L-glutamato desidrogenase         | $2\text{-oxoglutarato} + \text{amônia} + \text{NADPH} \rightarrow \text{glutamato} + \text{NADP}$   |
| Dióxido de Carbono | Fosfoenol piruvato descarboxilase | $\text{Fosfoenol piruvato} + \text{bicarbonato} (\text{HCO}_3^-) \rightarrow \text{oxalacetato} + \text{fosfato}$<br>$\text{Oxalacetato} + \text{NADH} \rightarrow \text{malato} + \text{NAD}$  |
| Colesterol         | Colesterol esterase/oxidase       | $\text{Ésters de colesterol} + \text{agua} \rightarrow \text{colesterol} + \text{ácidos graxos}$<br>$\text{Colesterol} + \text{O}_2 \rightarrow \text{derivado de colesterol} + * \text{H}_2\text{O}_2$   |
| Glicose            | Glicose oxidase                   | $\text{Glicose} + \text{O}_2 + 2\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{ácido glicônico} + * \text{H}_2\text{O}_2$   |
| Oxalato            | Oxalato oxidase                   | $\text{Oxalato} + \text{O}_2 \rightarrow \text{CO}_2 + * \text{H}_2\text{O}_2$  |
| Triglicerídeos     | Lipase                            | $\text{Triglicerídeos} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{glicerol} + \text{ácidos graxos}$<br>$\text{Glicerol} + \text{ATP} \rightarrow \text{glicerol-1-fosfato} + \text{ADP}$<br>$\text{Glicerol-1-fosfato} + \text{O}_2 \rightarrow \text{dihidroxiacetona fosfato} + * \text{H}_2\text{O}_2$ |
| Uréia              | Urease                            | $\text{Uréia} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{amônia} + \text{CO}_2$<br>$\text{amônia} + 2\text{-oxoglutarato} + \text{NADPH} \rightarrow \text{glutamato} + \text{NADP}$  |

\*H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> – é detectado e medido colorimetricamente pela reação com o-dianisidina na presença de peroxidase

# ENZIMAS X DOENÇAS

## INDICADOR DIAGNÓSTICO



# Principais Enzimas Utilizadas em Diagnósticos

| <i>Enzimas</i>                              | <i>Milhões US\$</i> |
|---|---------------------|
| Fosfatase alcalina                          | 15                  |
| Peroxidase                                  | 15                  |
| Enzimas "de colesterol"                     | 8                   |
| Glicose-6-fosfato desidrogenase/hexoquinase | 7                   |
| Glicose oxidase                             | 5                   |
| Enzimas "de triglicerídeos"                 | 3                   |
| Glutamato desidrogenase                     | 2                   |
| Lactato desidrogenase                       | 2                   |
| Malato desidrogenase                        | 2                   |
| Piruvato quinase                            | 2                   |



# CLASSIFICAÇÃO BIOSSENSORES

Transdutor é o elemento físico que comunica um sinal ao detector onde pode ser medido.

MAIS USADOS: ELETROQUÍMICOS E ÓPTICOS

## MÉTODOS DE TRANSDUÇÃO

Eletroquímicos

Térmicos

Piezoelétricos

Magnéticos

Ressonância

Ópticos

Potenciométricos

Amperiométricos

Condutimétrico

Luminescência

Fluorescência

Elipsometria

# TIPOS DE BIOSSENSORES

## TRANSDUTORES ÓPTICOS

- Espectroscopia de absorção
- Espectroscopia de fluorescência
- Espectroscopia de luminescência

## TRANSDUTORES ELETROQUÍMICOS

- Potenciométrico: medição do potencial elétrico
  - Amperométrico: medição da corrente elétrica
- Condutimétrico: medição da condutividade elétrica

## TRANSDUTORES TÉRMICOS

- ❑ Produção ou absorção de calor

# ➤ BIOSSENSORES ÓPTICOS

- Vantagem: não necessitam de um sinal do sensor de referência, o sinal de comparação é gerado com a mesma fonte luminosa usada na amostra;
- Técnicas espectrofotométricas conhecida => reação de condensação de duas moléculas, para produzir um composto colorido;

## ➤ EXEMPLOS:

- H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> gerado numa reação enzimática reage com a peroxidase que oxida compostos aromáticos e corantes => detecção colorimétrica;
- 4- aminoantipirina (4-AAP) primeiro a ser usado para detectar glucose (Trinder, 1969) => reação de condensação com o fenol => quinoneimina (colorido).



- Tecnologias de biossensores mais bem estabelecida e utilizada => Tiras (Fitas) Teste → diagnósticos clínicos;

➤ **EXEMPLO:**

- **Dosagem de glicose:** glicose oxidase, peroxidase e um corante (p.ex. o-toluidina) → Oxidação aeróbia da glicose pela glicose oxidase origina  $H_2O_2$ , que por sua vez oxida corante, que muda de cor.
- **Resultado:** comparação visual com uma tabela de cor padrão ou o uso de mediador de refletância colorimétrica portátil.



# ➤ **BIOSSENSORES ELETROQUÍMICOS**

- Depois das Tiras Teste, são os mais relevantes comercialmente;
- Método: medida de corrente elétrica associada aos elétrons envolvidos num processo de oxidação-redução;
- A alteração da concentração => modifica a corrente elétrica no eletrodo onde se encontra imobilizada a enzima;

## **EXEMPLO DE BIOSSENSORES AMPEROMÉTRICOS**

| <i>Substrato</i> | <i>Enzima</i>                          | <i>Eléctrodo</i>                   | <i>Tempo de resposta</i> | <i>Linearidade</i>        | <i>Estabilidade</i> |
|------------------|--|------------------------------------|--------------------------|---------------------------|---------------------|
| Álcool           | Álcool oxidase                         | Pt(O <sub>2</sub> )                | 2min                     | Até 5mg%                  | 120 dias            |
| -aminoácidos     | L-aminoácido oxidase                   | Pt(H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) | 30-60s                   | 1-400x10 <sup>-6</sup> M  | 10-12 dias          |
| Glucose          | Glucose oxidase                        | Pt(H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) | 1min                     | 0.5-15x10 <sup>-3</sup> M | 300 dias            |
| Fosfatos         | Fosfatase alcalina/<br>Glucose oxidase | Pt(O <sub>2</sub> )                | 1-2min                   | 1-10x10 <sup>-3</sup> M   | 90 dias             |

# ***BIOSSENSORES ELETROQUÍMICOS COM MEDIADORES***

**Os elétrons passam da enzima para o eletrodo, através da reação com o mediador**

**Surgiu para substituir o oxigênio por outros agentes oxidantes (agentes de transferência de elétrons).**

- Os biossensores que incorporam mediadores => 2ª. Geração;
- Substitutos do  $O_2$  por outros agentes oxidantes;
- Mediadores => ultrapassar limitações difusionais e cinéticas relacionadas ao  $O_2$ ;
- Mediador => solúvel ou imobilizado no eletrodo;
- Em geral: composto redox de baixo peso molecular => transportam os elétrons de um centro redox da enzima para a superfície do eletrodo;
- No ciclo catalítico, o mediador ( $M_{ox}$ ) reage primeiro com a forma reduzida do enzima, sendo reduzido ( $M_{red}$ ), este se difunde para a superfície do eletrodo, e retorna ao estado oxidado;

# Mediadores para transferência de elétrons e respectivos *potenciais REDOX*

| Mediadores              | Potencial REDOX |
|-------------------------|-----------------|
| Ferroceno               | 0,547           |
| Tetracianoquinodimetano | 0,367           |
| Hexacianoferrato        | 0,360           |
| Benzoquinona            | 0,293           |
| Diclorofenolindofenol   | 0,217           |
| Ubiquinona              | 0,100           |
| Tionina                 | 0,064           |
| Fenazina metosulfato    | 0,055           |
| Azul de metileno        | 0,011           |



## CARACTERÍSTICAS DESEJÁVEIS DO MEDIADOR:

- Participarem de reações rapidamente reversíveis;
- Possuírem potenciais de oxidação adequados (mensuráveis e fáceis de serem conseguidos);
- Devem atuar independentes do pH;
- Devem ser estáveis na forma oxidada e reduzida;
- Não devem reagir com o oxigênio;
- Não devem ser tóxicos;
- Terem suas concentrações facilmente controláveis;
- Reagirem rapidamente com a enzima;

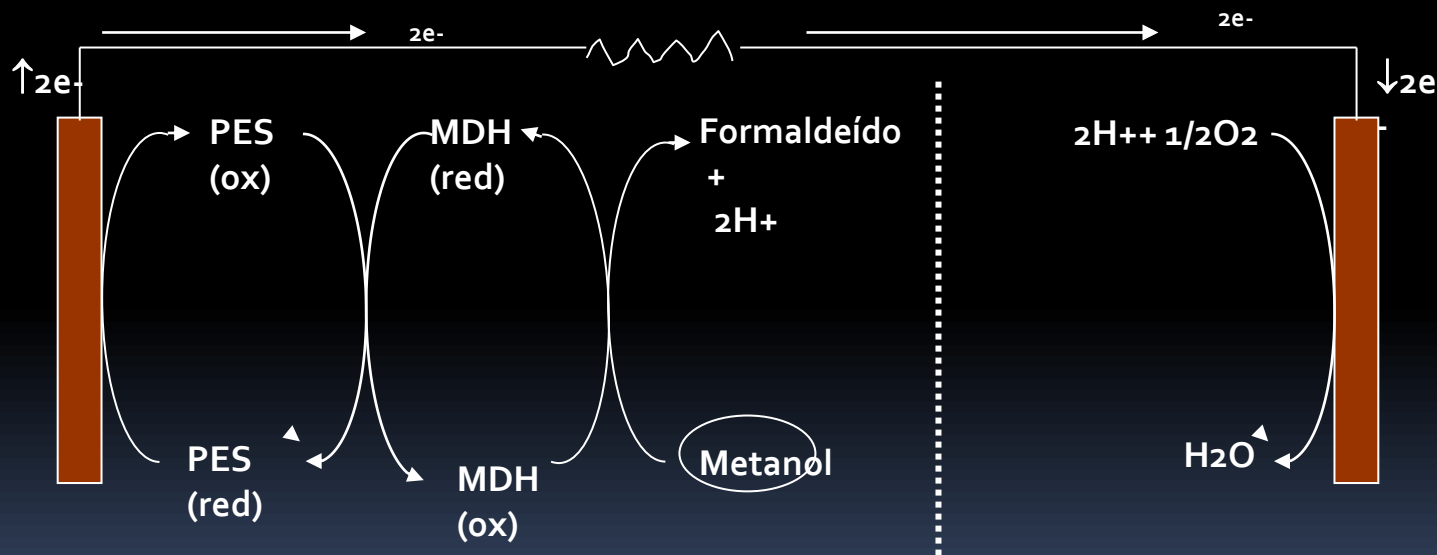
### COMPOSTOS MAIS COMUMENTE USADOS:

- Cátions metálicos de transição e seus complexos, especialmente o íon ferro.



Mediador: corante – etanosulfonato de fenazina (PES)

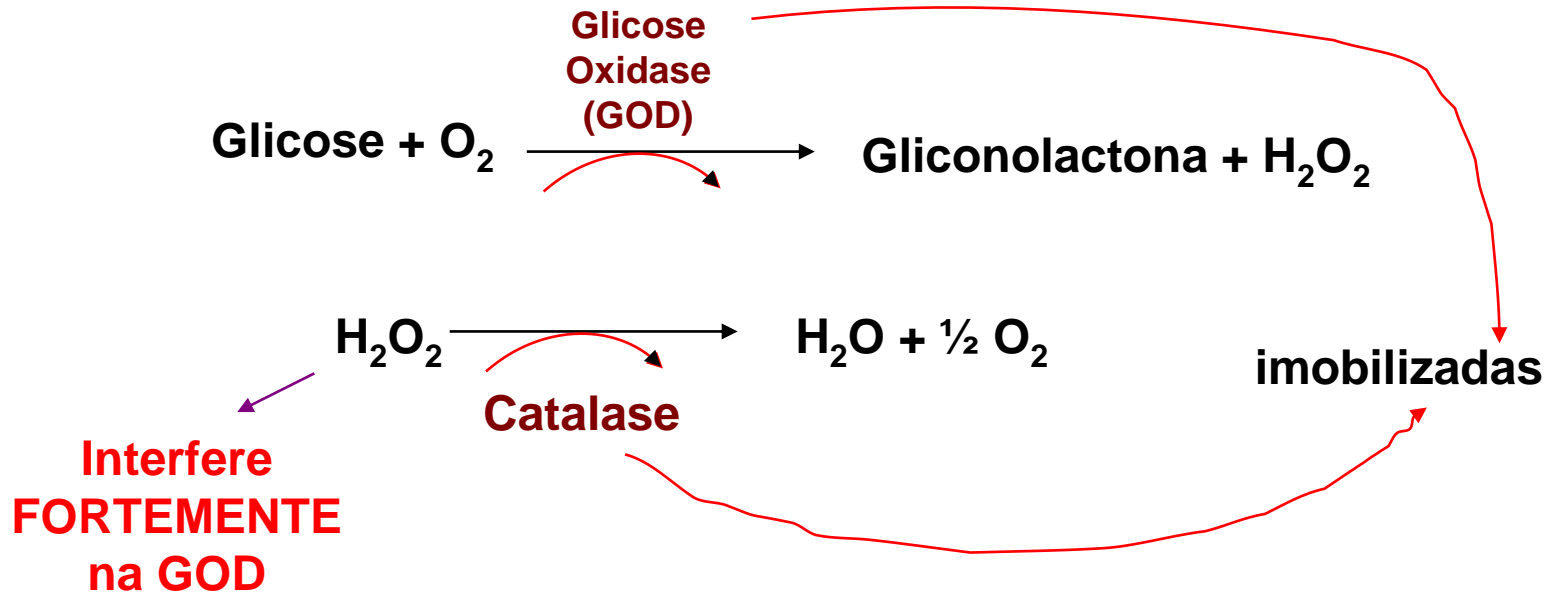
É reduzido pela enzima e oxidado no eletrodo



MEMBRANA DE TROCA DE CÁTIOS

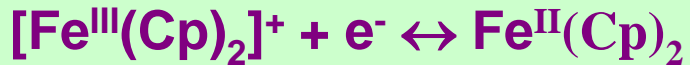


**Exemplo 2:**  
**Glicose – Ferroceno como mediador**





Estes íons não são bons mediadores, pois são sujeitos à precipitação na forma de  $\text{Fe(OH)}_3$

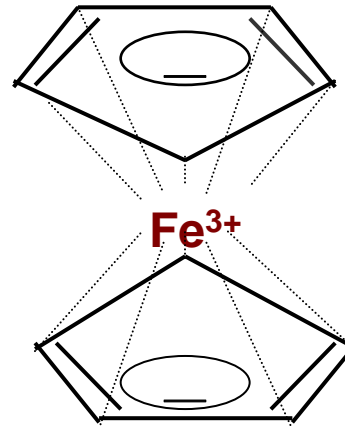


Solução: Usar seu complexo  $\Rightarrow$   
Ferroceno (Fc)

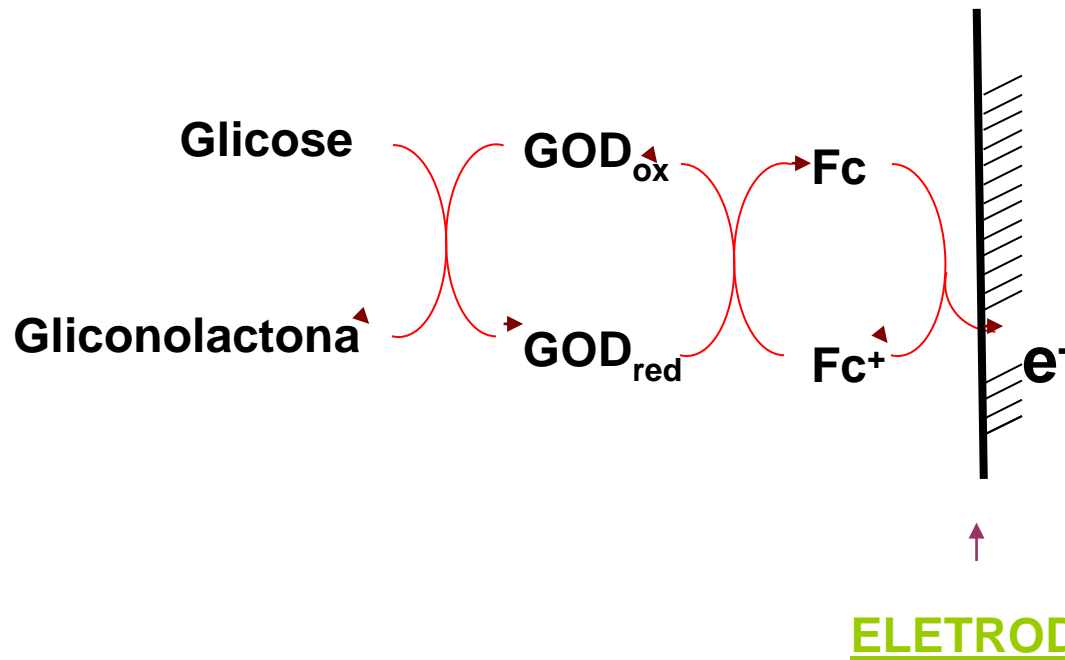
Ciclopentadienil

**Ferroceno**

## ESTRUTURA DO FERROCENO



Ânions:  
ciclopentadienil



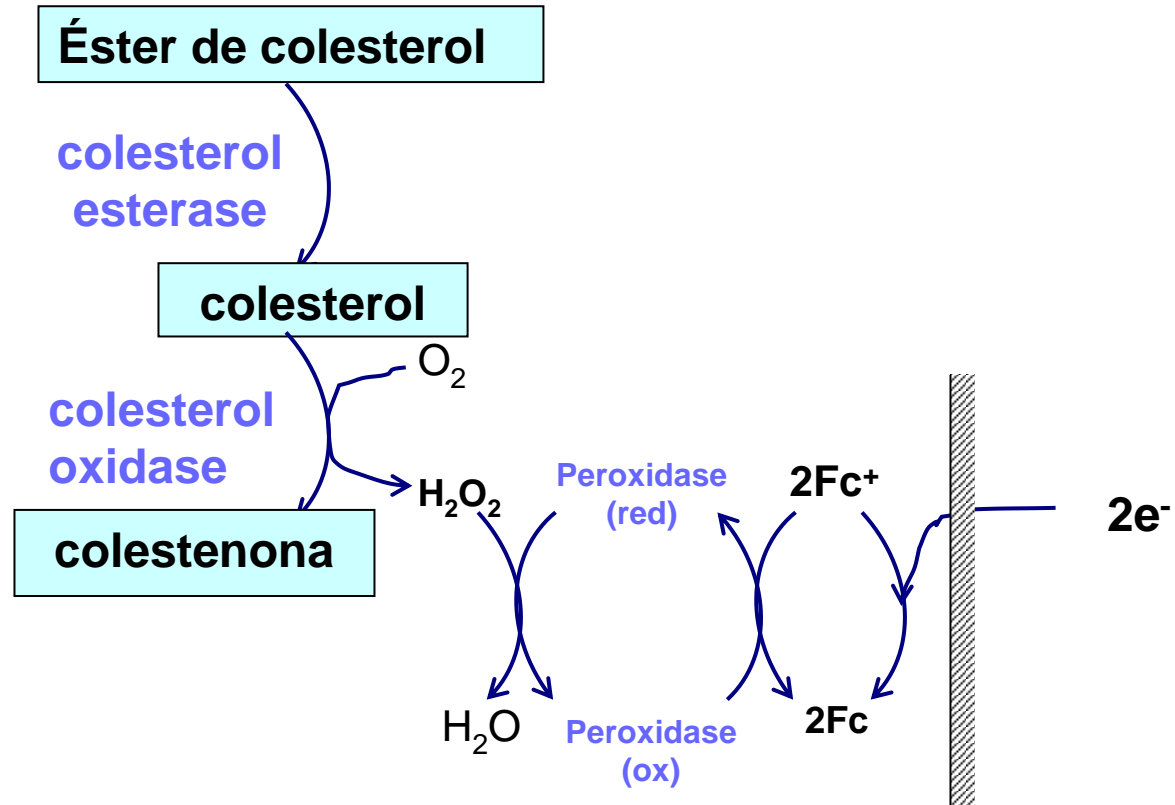
**A corrente elétrica através do eletrodo é correlacionada com a medida da concentração de glicose**

**Eletrodos que empregam ferroceno (Fc) mostram resposta linear, devido ao  $K_M$  da enzima;**

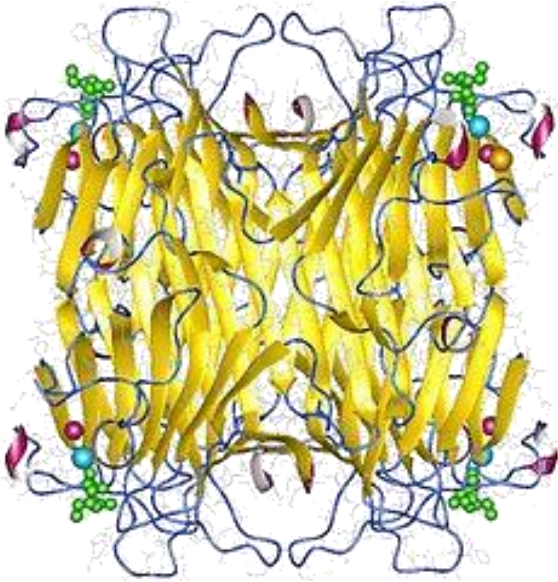
**Tempo de resposta: <30s**

**Eletrodo patenteado em 2015**

# *Biossensor de Colesterol: Peroxidase*



# Lectinas

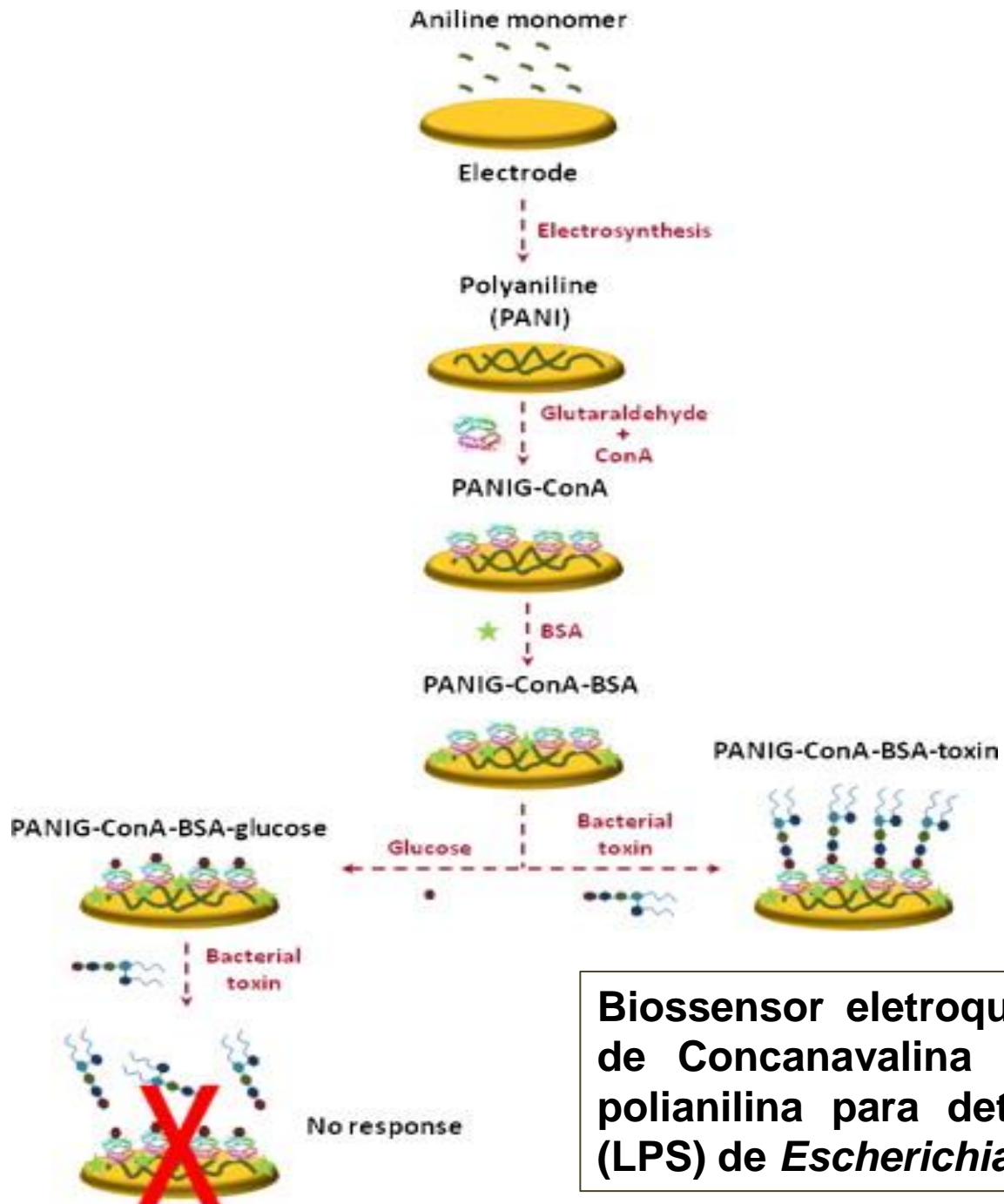


*Concanavalina A (Con A) é uma das lectinas mais amplamente utilizadas para detecção de sacarídeos.*

- Excelentes elementos de biorreconhecimento devido alta afinidade para **porções sacarídicas**.
- A ligação seletiva de lectinas a regiões terminais de carboidratos nas superfícies celulares e agregados proteicos tem sido amplamente explorado (Bertozzi e Kiessling, 2001).

## Principais Aplicações

- **Imobilizar glicoproteínas;**
- **Sensores para a determinação de glicose, glicoproteínas, células e micro-organismos.**

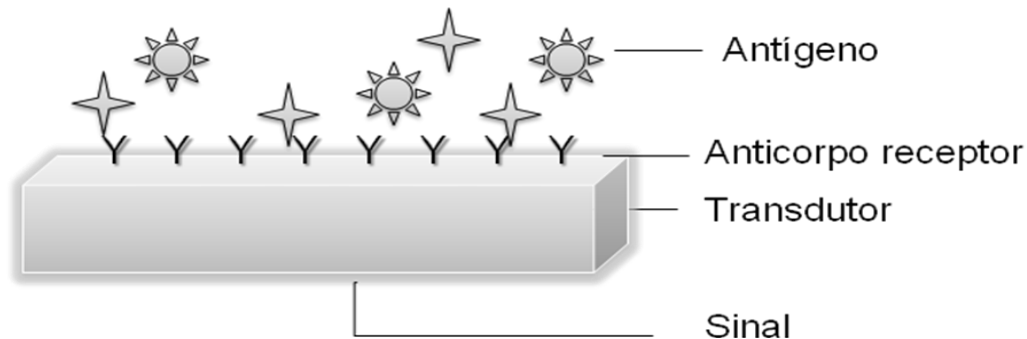


**Biossensor eletroquímico com base na interação de Concanavalina A (ConA) e filmes finos de polianilina para detecção de lipopolissacarídeos (LPS) de *Escherichia coli*.**



# IMUNOSSENSOR

O **imunossensor** é um tipo de biossensor baseado na reação imunológica, sendo que o **antígeno ou anticorpo** é imobilizado na superfície do transdutor. Assim, diversos tipos de imunossensores podem ser construídos, de acordo com o tipo de transdutor empregado.



**Representação esquemática de um imunossensor.**

Vários anticorpos recombinantes são úteis para a detecção e identificação HIV, hepatite B e C, imunodeficiência símia, Vírus Ebola, Raiva, Sarampo e agentes biológicos como a neurotoxina botulínica.

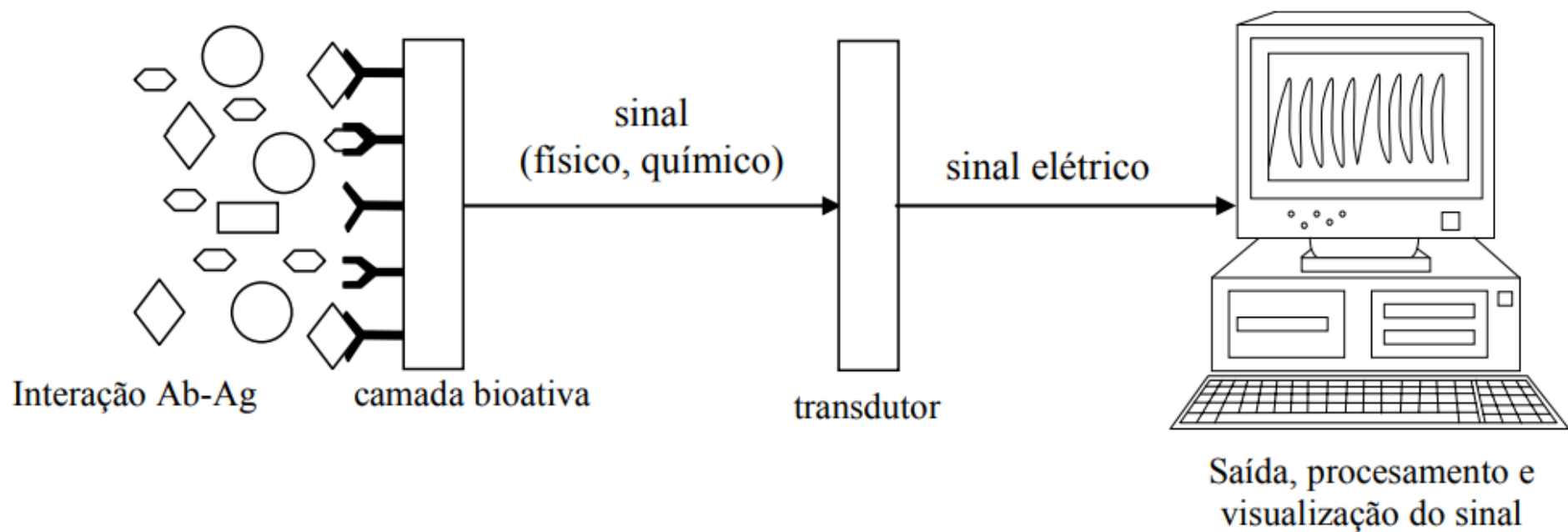
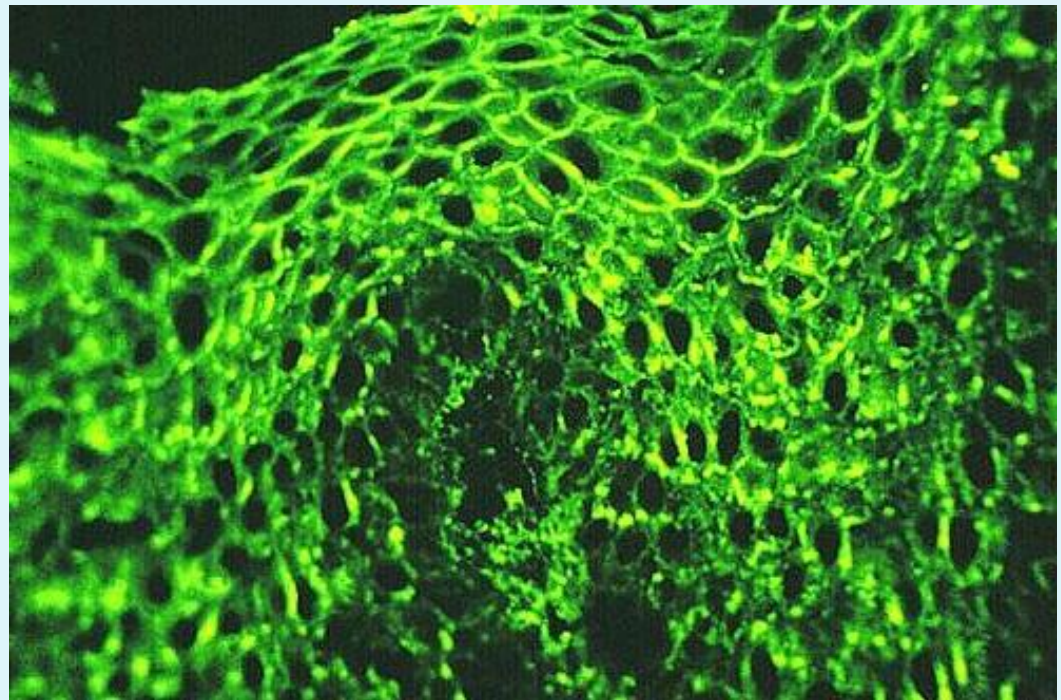
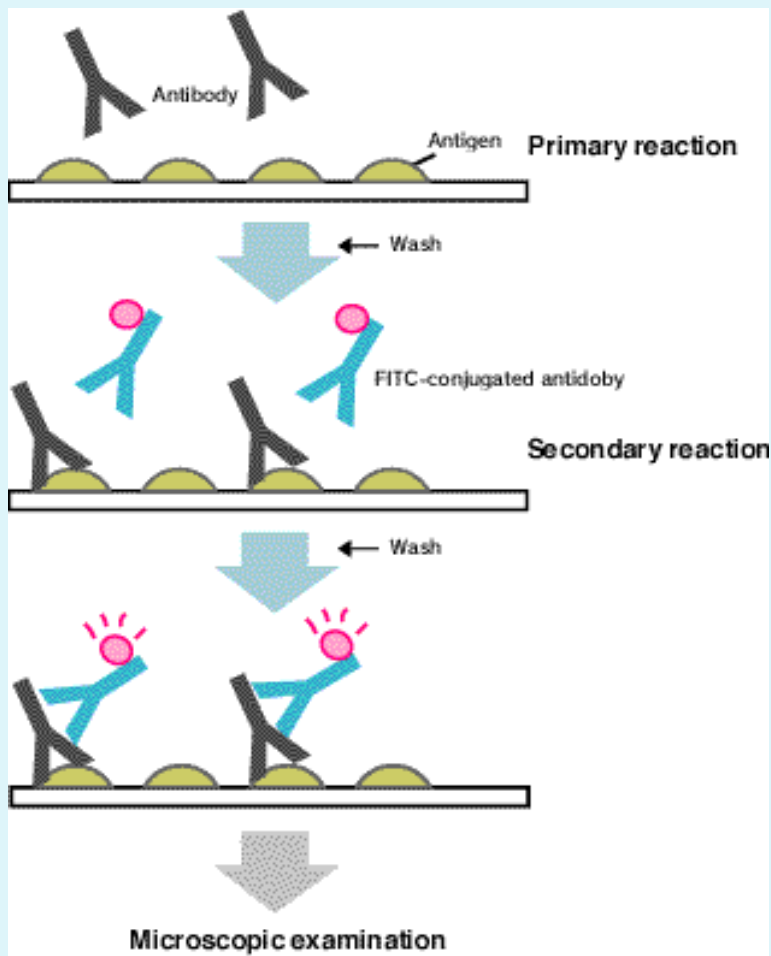


Figura 3. Representação esquemática de um imunossensor.

# Imunofluorescência

Os anticorpos se ligam covalentemente com substâncias fluorescentes, ou fluorocromos, (p. ex: Isotiocianato de Fluoresceína -FITC).





**Aplicações**

# Ex: INTOXICAÇÃO COM SALICILATO

- 1) Lesões no estômago
- 2) Diminuição da capacidade auditiva
- 3) Vertigens
- 4) Zumbidos
- 5) Depressão respiratória

**DOSE  
TERAPÊUTICA**  
(1,1 a 2,2 mM)

**DOSE  
TÓXICA**  
(>3mM)

**MUITO PRÓXIMAS**

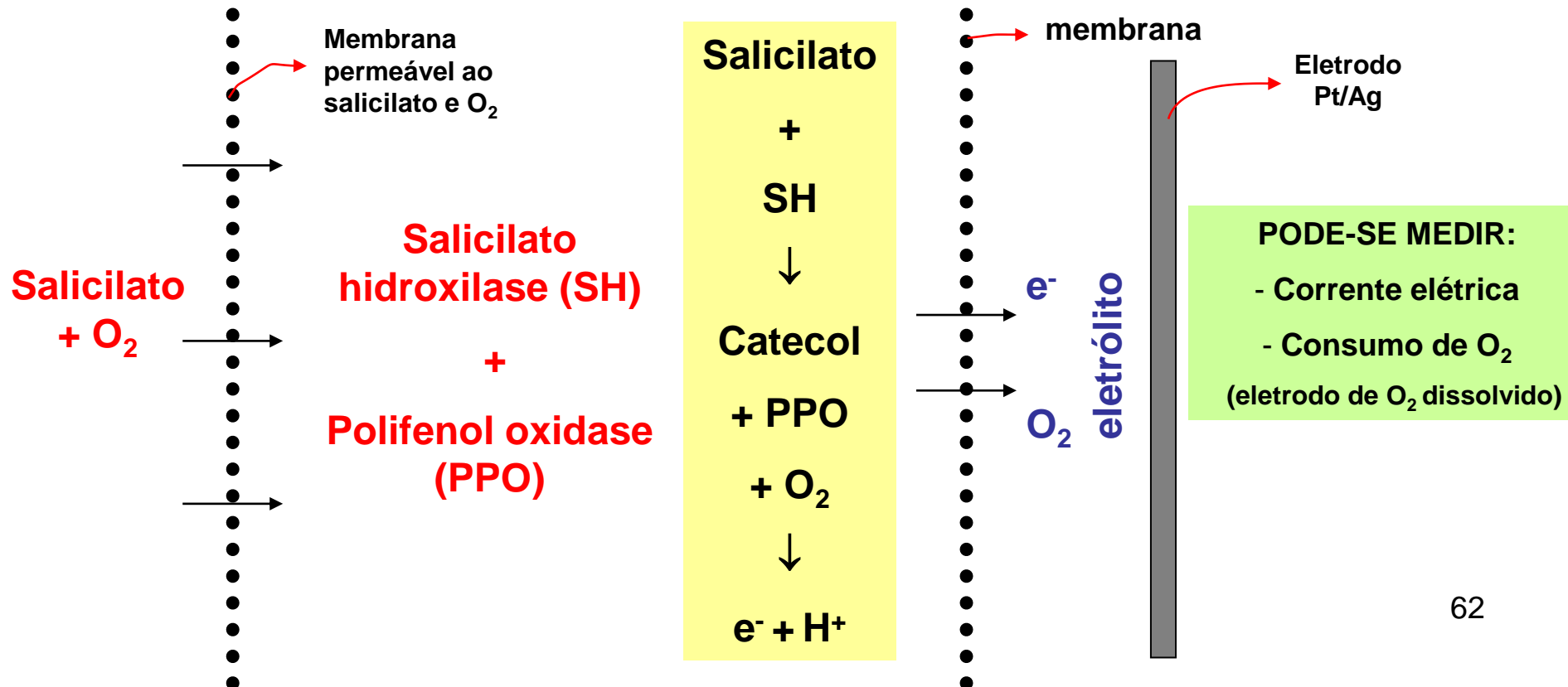
**BIOSSENSOR**

**Confirma a presença  
da substância em  
tempo real**

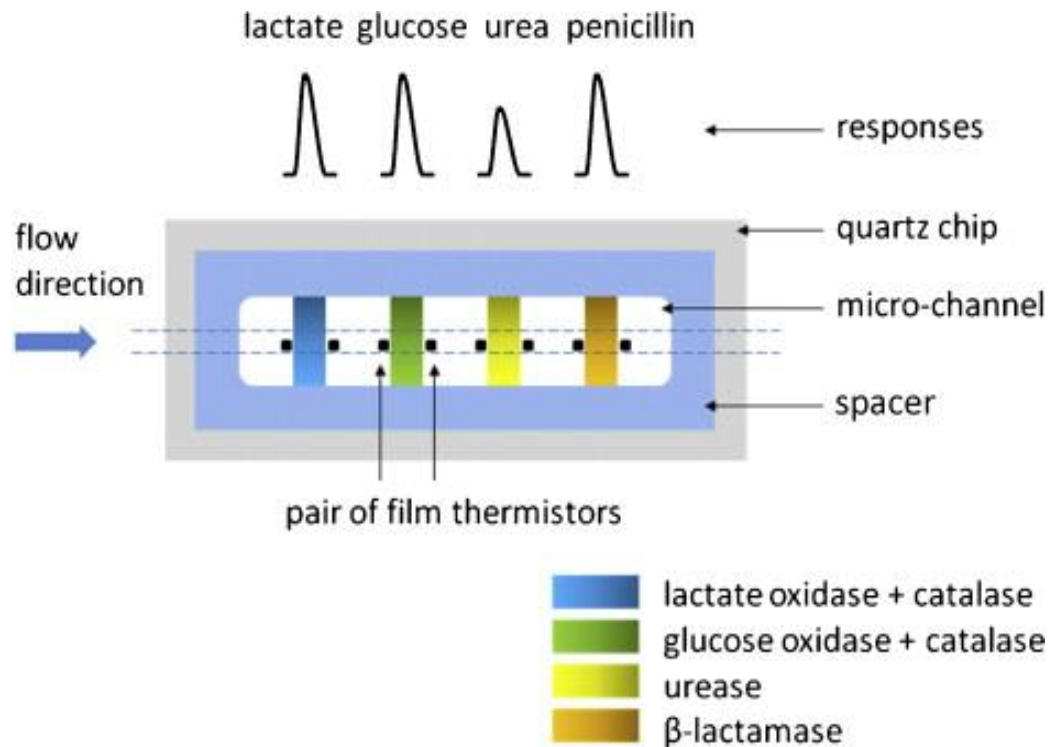
Sangue  
Urina  
Cosméticos  
Medicamentos

Interferência com o metabolismo intermediário normal ou o acúmulo de ânions orgânicos exógenos podem causar acidose metabólica, ou seja, uma ↓ primária na concentração de  $\text{HCO}_3^-$  (um dos tampões do organismo) do fluido extracelular; pH sanguíneo e  $\text{HCO}_3^-$  reduzidos.

# REAÇÃO DO CATECOL EM UM BIOSSENSOR



# TRANSDUTOR TÉRMICO



- Análise de alimentos (determinação de frutose em xaropes);
- Bioprocessos (monitoramento de várias biotransformações);
- Determinação de compostos enantiomêros;
- Metais pesados.

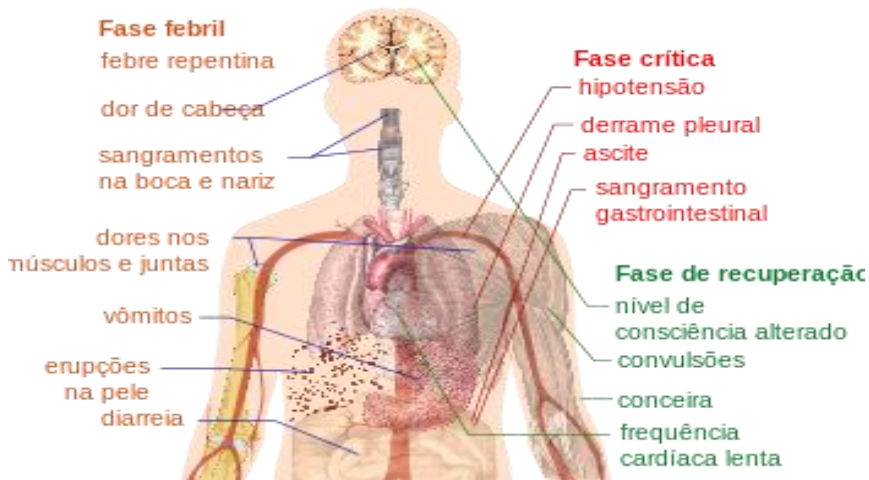


# DIAGNÓSTICO DA DENGUE

(IFSC –USP)

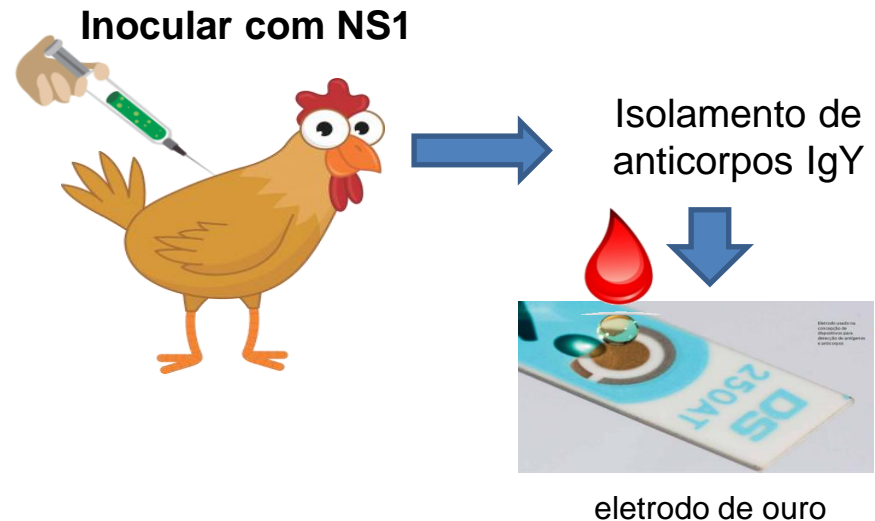
## Atualmente

- Mensura os níveis de imunoglobulina IgY, anticorpo que combate a NS1.
- Exame só é realizado após 5 dias dos primeiros sintomas.
- Alto custo



## Nova proposta

A partir da imunoglobulina IgY, anticorpo que combate a proteína NS1.



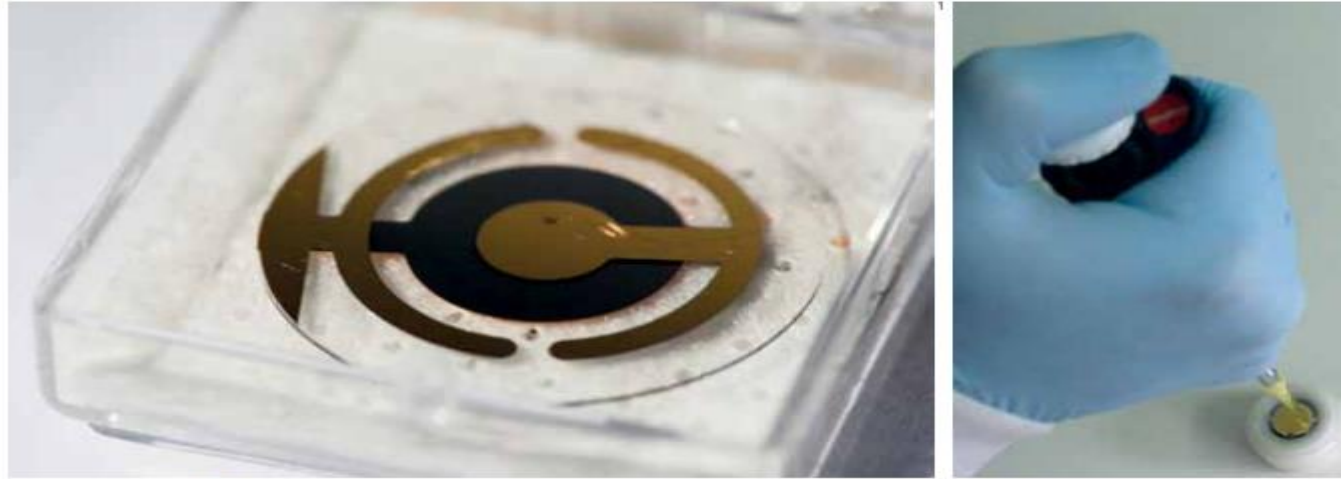
Ao entrar em contato com a NS1, a imunoglobulina IgY altera o fluxo de elétrons, produzindo um sinal que é registrado e processado por um software.

**Resultado em 20 minutos!!!**



## Biodispositivo de detecção de NS1 com sensores piezoelétricos

Microbalança de  
quartzo



Microbalança de cristal de quartzo utilizada pelos pesquisadores da UFPR no desenvolvimento de equipamento para diagnóstico da dengue

**Cristal de quartzo, um eletrodo de ouro revestido com polietilenimina e nanofilmes de nanocristais de celulose bacteriana, modificados para reagir quimicamente ao entrar em contato com a NS1, alterando os padrões de frequência e dissipação de energia nos nanocristais.**

**Quando uma amostra contendo NS1 é colocada sobre o biossensor, é possível verificar, a partir de um software, se a proteína se ligou à superfície do material por meio da detecção de microvibrações mecânicas**

# DETECÇÃO DA PRESENÇA DE AGROTÓXICOS

UFMT/ IFSC-USP

## NA PALMA DA MÃO

Entenda como o biossensor identifica pesticidas

- 1 Os pesquisadores desenvolveram uma película que contém uma enzima chamada acetilcolinesterase, que permite identificar a presença do agrotóxico
- 2 O material a ser analisado (água, solo ou alimentos) é colocado sobre a película. No caso de alimentos, por exemplo, é preciso batê-los para obter uma textura adequada para medição

- 3 A película é inserida no biossensor. O processo é similar ao que acontece nos medidores portáteis de diabetes, em que uma fita contendo uma gota de sangue é posta no aparelho

- 4 A presença do pesticida diminui a ação da enzima e faz com que ela produza uma quantidade menor de ions do que o normal

Acetilcolinesterase

**Organofosforados e carbamatos** representam a principal classe de inseticidas envolvidos nos casos de intoxicação.

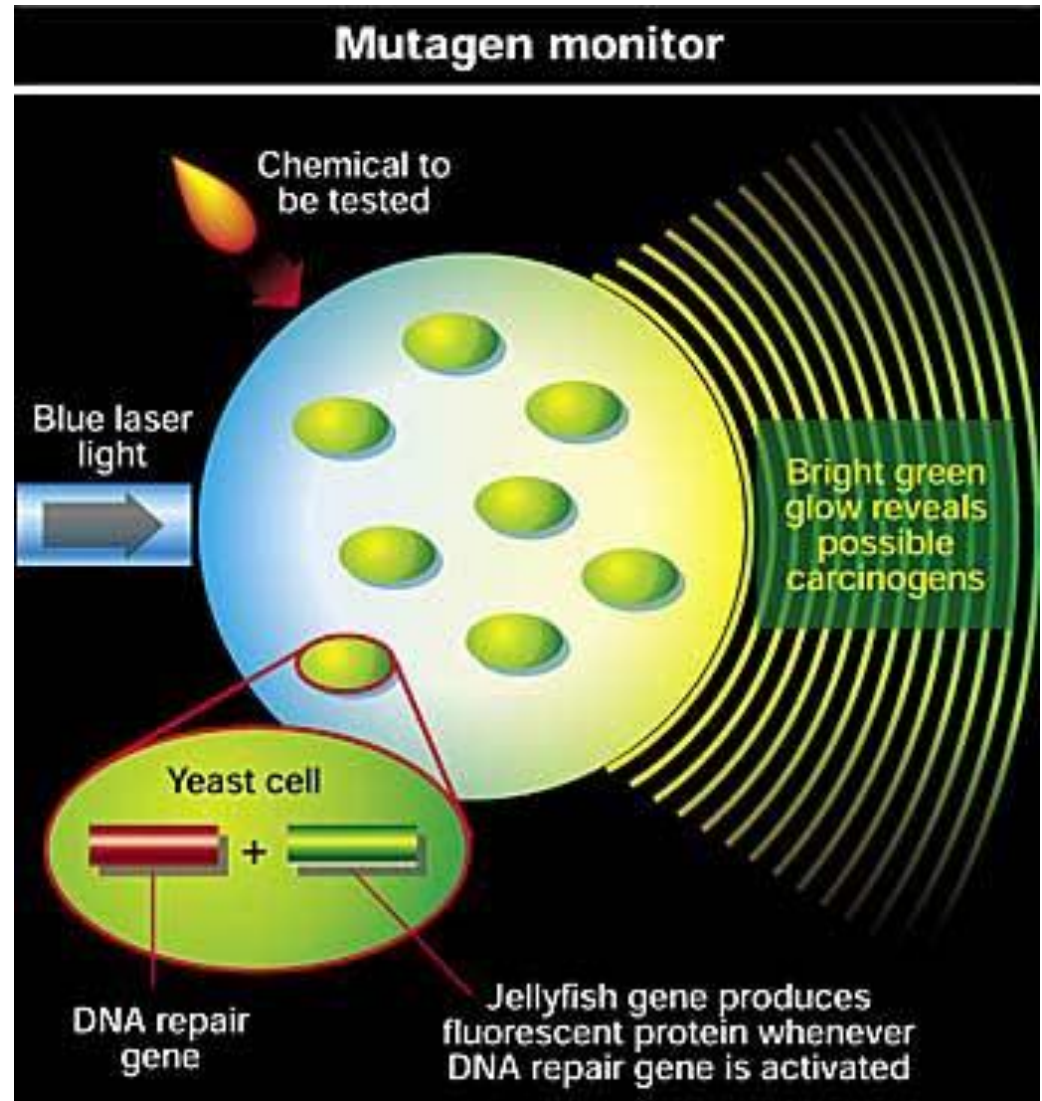
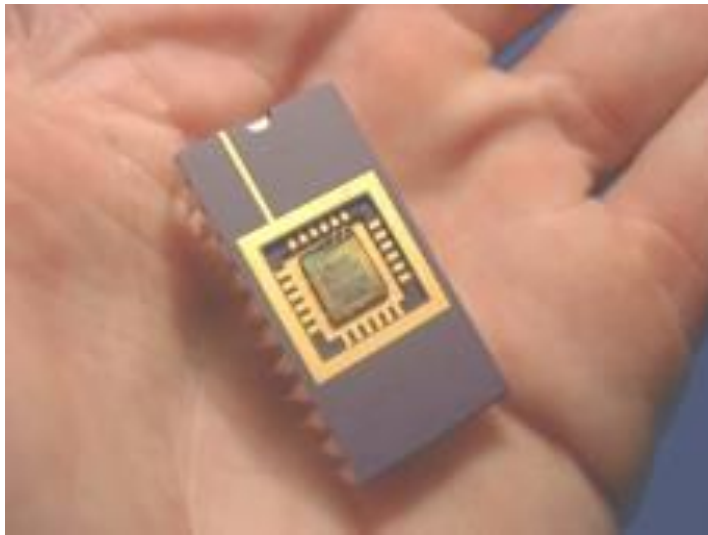
**Síndrome neurotóxica tardia**

- 5 O aparelho exibe no visor se o material está contaminado depois de comparar a quantidade de ions produzidos com o nível - padrão

# MONITORAMENTO EM TEMPO REAL



Um sensor que integra um elemento biológico com um transdutor físico-químico para produzir um sinal eletrônico proporcional a um único analito que é então transportado para um detector.





**Tabela 1.** Biossensores disponíveis ou em desenvolvimento por empresas para análise da qualidade de alimentos.

| <b>Analito</b>  | <b>Empresa</b>                        |
|---|---------------------------------------|
| <i>Escherichia coli</i> O157:H7   | Massachusetts Institute of Technology |
| <i>Salmonella</i> e <i>Campylobacter</i>  | Georgia Research Tech Institute       |
| Enterotoxina, estafilocócica B e toxina botulínica  | Naval Research Laboratory             |
| Atrazina  | Universitat Autònoma de Barcelona     |
| <i>S. aureus</i> , Toxina colérica  | Affinity Sensors                      |
| <i>Salmonella</i> e <i>Enterococcus</i>   | Ambri Limited                         |
| Glicose, frutose, ácido málico e láctico  | BioFutura Srl                         |
| Micro-organismos e substâncias tóxicas  | Biosensor Systems Desing              |
| Proteínas, vírus e bactérias  | Research International                |
| Toxinas, vírus, bactérias, esporas e fungos   | Texas Instruments Inc.                |
| Antialérgicos e antibióticos  |                                       |
| Etanol, metanol, glicose, sacarose, lactose, L-lisina, glutamato, ácido ascórbico e oxalato | Universal Sensors                     |
| Micro-organismos patógenos  | Innovative Biosensors, Inc            |

Fonte: Meatprocess.com (2008); Medical News Today (2008)

**Tabela 4.** Exemplos de biossensores utilizados para análise de pesticidas

| <b>Sistema de Transdução</b> | <b>Elemento de Reconhecimento</b> | <b>Analito</b> | <b>Referências</b>                |
|------------------------------|-----------------------------------|----------------|-----------------------------------|
| Amperométrico                | Acetilcolinesterase               | Paraoxon       | Sinha <i>et al.</i> , 2010        |
| Fibra Óptica                 | Acetilcolinesterase               | Carbaril       | Xavier <i>et al.</i> , 2000       |
| Amperométrico                | Colina oxidase                    | Paraoxon       | Sajjadi <i>et al.</i> , 2009      |
| Amperométrico                | Acetilcolinesterase               | Metomil        | Caetano <i>et al.</i> , 2013      |
| Amperométrico                | Acetilcolinesterase               | Carbofuran     | Jeyapragasam <i>et al.</i> , 2014 |
| Amperométrico                | Tirosinase                        | Carbaril       | Albuquerque <i>et al.</i> , 2007  |

**Tabela 5.** Exemplos de biossensores utilizados na detecção de micro-organismos.

| <b>Sistema de Transdução</b> | <b>Elemento de Reconhecimento</b> | <b>Microrganismo</b>    | <b>Referências</b>              |
|------------------------------|-----------------------------------|-------------------------|---------------------------------|
| Eletroquímico                | Anticorpos                        | <i>S. typhimurium</i>   | Zhang <i>et al.</i> , 2006      |
| Eletroquímico                | DNA                               | <i>Salmonella</i>       | Li <i>et al.</i> , 2012         |
| Eletroquímico                | Anticorpos                        | <i>Salmonella</i>       | Croci <i>et al.</i> , 2001      |
| Impedométrico                | Anticorpos                        | <i>Listeria</i>         | Anany <i>et al.</i> , 2011      |
| Eletroquímico                | DNA                               | <i>Legionella</i>       | Rai <i>et al.</i> , 2012        |
| Fibra Óptica                 | DNA                               | <i>E. Coli O157:H7</i>  | Tims <i>et al.</i> , 2003       |
| Bioluminescência             | Anticorpos                        | <i>Candida albicans</i> | Villamizar <i>et al.</i> , 2009 |
| Eletroquímico                | DNA                               | <i>Yersinia</i>         | Sun <i>et al.</i> , 2010        |

**Tabela 6.** Exemplos de biossensores utilizados na detecção de toxinas

| <b>Sistema de Transdução</b> | <b>Elemento de Reconhecimento</b> | <b>Toxina</b>         | <b>Referências</b>            |
|------------------------------|-----------------------------------|-----------------------|-------------------------------|
| Eletroquímico                | Proteína A                        | Enterotoxina A        | Pimenta <i>et al.</i> , 2012  |
| Condutimétrico               | Horseradish peroxidase            | Enterotoxina B        | Labib <i>et al.</i> , 2009    |
| Fibra óptica                 | Anticorpos                        | Clostridium botulinum | Sapsford <i>et al.</i> , 2005 |
| Óptico                       | Horseradish peroxidase            | Toxina colérica       | Chen <i>et al.</i> , 2005     |
| Eletroquímico                | Anticorpos                        | Aspergillus           | Azhir <i>et al.</i> , 2012    |
| Óptico                       | Horseradish peroxidase            | Fumonisina            | Mirasoli <i>et al.</i> , 2012 |
| Condutimétrico               | DNA                               | Aflatoxinas           | Dinçkaya <i>et al.</i> , 2011 |
| Eletroquímico                | Fosfatase 2A                      | Ácido okadoico        | Volpe <i>et al.</i> , 2009    |



Biossensores empregados na análise de laticínios

| Analito                     | Matriz | Composto Biológico                | Transdutor     | Faixa linear de resposta   | Ref. |
|-----------------------------|--------|-----------------------------------|----------------|--|------|
| Ureia                       | Leite  | Urease                            | Óptico         | -  | 46   |
| Ocratoxina A                | Leite  | Peroxidase                        | Amperométrico  | 23.85 a 203.28 nmol L <sup>-1</sup>                              | 47   |
| Organofosfatos              | Leite  | <i>acetilcolinesterase</i>        | Amperométrico  | 5×10 <sup>-6</sup> a 5×10 <sup>-12</sup> mol L <sup>-1</sup>     | 45   |
| Nisin                       | Leite  | Bactéria                          | Óptico         | 1,3×10 <sup>-2</sup> CFU mL <sup>-1</sup>                        | 48   |
| Lisina                      | Leite  | Lisina oxidase                    | Amperométrico  | 1,0 a 600 μmol L <sup>-1</sup>                                   | 49   |
| Glicose                     | Leite  | Glicose oxidase                   | Amperométrico  | 0,1 a 0,8 mmol L <sup>-1</sup>                                   | 50   |
| Patogênicos e toxinas       | Leite  | B linfócitos Ped-2E9 cellline     | Óptico         | -  | 51   |
| Catecol,                    | Leite  | Lactobacillus acidophilus         | Amperométrico  | 0,5 e 5,0 mmol L <sup>-1</sup>                                   | 52   |
| Lactose                     | Leite  | β-galactosidase e Glicose oxidase | Amperométrico  | 0,1 a 14 mmol L <sup>-1</sup>                                    | 53   |
| Lactose                     | Leite  | Celobiose desidrogenase           | Amperométrico  | 1 a 150×10 <sup>-6</sup> mol L <sup>-1</sup>                     | 54   |
| herpesvirus-1               | Leite  | ELISA                             | Amperométrico  | -  | 55   |
| Salmonella typhimurium (SA) | Leite  | Anticorpo SA                      | Condutimétrico | 1,0×10 <sup>-3</sup> a 1,0×10 <sup>-7</sup> CFU mL <sup>-1</sup> | 56   |
| Cloranfenicol               | Leite  | Anticorpo cloranfenicol           | Piezoelétrico  | 0,5 a 100 ng mL <sup>-1</sup>                                    | 57   |

Biossensores empregados na análise de laticínios

| <b>Analito</b>                       | <b>Matriz</b> | <b>Composto Biológico</b>              | <b>Transdutor</b> | <b>Faixa linear de resposta</b>                               | <b>Ref.</b> |
|--------------------------------------|---------------|--|-------------------|---|-------------|
| Colina                               | Leite         | Colina oxidase                         | Óptico            | $1.0 \times 10^{-7}$ a $5 \times 10^{-4}$ mol L <sup>-1</sup> | 58          |
| Ureia                                | Leite         | Urease                                 | Térmico           | 1 a 200 mmol L <sup>-1</sup>                                  | 59          |
| Organofosfatos                       | Leite         | Acetilcolina esterase e colina oxidase | Óptico            | $4,84 \times 10^{-5}$ a 4,84 $\mu$ mol L <sup>-1</sup>        | 60          |
| Glicose                              | Leite         | Glicose oxidase                        | Amperométrico     | 0,25 a 5,00 mmol L <sup>-1</sup>                              | 61          |
| Colina                               | Leite         | Colina oxidase e peroxidase            | Óptico            | 0,0005 a 2 mM   | 62          |
| Aflatoxina M1 (AFM1)                 | Leite         | Anticorpo AFM1                         | Condutimétrico    | 6,25 a 100 pg mL <sup>-1</sup>                                | 63          |
| Estafilococos e enterotoxina A (SEA) | Leite         | Anticorpo SEA                          | Piezoelétrico     | 0,05 a 1 mg L <sup>-1</sup>                                   | 64          |
| Ácido fólico                         | Leite         | Anticorpo                              | Óptico            | 1 a 10 ng mL <sup>-1</sup>                                    | 65          |
| Sulfadiazina                         | Leite         | Anticorpo                              | Piezoelétrico     | 50 a 200 $\mu$ g kg <sup>-1</sup>                             | 66          |
| Peróxido de hidrogênio               | Leite         | Catalase                               | Amperométrico     | -   | 67          |
| Catalase                             | Leite         | Aptâmero                               | Óptico (SPR)      | 5 a 1000 nmol L <sup>-1</sup>                                 | 68          |

Biossensores empregados na análise da qualidade de bebidas alcoólicas

| Analito                        | Matriz             | Composto Biológico  | Transdutor    | Faixa linear de resposta  | Ref. |
|--------------------------------|--------------------|---|---------------|---|------|
| Componentes da cerveja         | Cerveja            | Tirosinase  | Amperométrico | -   | 95   |
| Ocratoxina A                   | Cerveja            | Peroxidase  | Amperométrico | 0,24 a 2,06 nM  | 96   |
| Catecol e ácido caféico        | Cerveja            | Tirosinase  | Amperométrico | $2,5 \times 10^{-7}$ a $9,2 \times 10^{-5}$ e $2,5 \times 10^{-7}$ a $4,7 \times 10^{-4}$ mol L <sup>-1</sup> | 97   |
| Polifenol e dióxido de enxofre | Cerveja            | Lacase  | Amperométrico | -   | 98   |
| Ocratoxina A                   | Cerveja            | Aptâmero  | Amperométrico | -   | 99   |
| Tiramina                       | Cerveja            | Tiramina oxidase  | Amperométrico | 0,37 a 0,78 mM  | 100  |
| Putrescina                     | Cerveja            | Putrescina oxidase  | Amperométrico | 0,01 a 0,25 mmol L <sup>-1</sup>  | 101  |
| Etanol                         | Vinho e cerveja    | Peroxidase e Álcool desidrogenase                         | Amperométrico | -   | 102  |
| Amina Biogênica                | Vinho e Cerveja    | Diamina oxidase   | Amperométrico | 25 a 20000 ng ml <sup>-1</sup>  | 103  |
| Glicose, frutose e etanol      | Vinho              | Glicose oxidase, Álcool oxidase e D-frutose desidrogenase | Amperométrico | 0,02 a 0,7 mmol L <sup>-1</sup><br>0,05 a 0,5 mmol L <sup>-1</sup> e<br>0,05 a 0,5 mmol L <sup>-1</sup>       | 104  |
| Etanol                         | Vinho              | Methylobacterium organophilium                            | Amperométrico | 0,050 a 7,5 mmol L <sup>-1</sup>  | 105  |
| Nitrogênio                     | Vinho              | Gene GAP1m-F e DAL4m-F                                    | Óptico        | -   | 106  |
| Ocratoxina A (OTA)             | Vinho              | Anticorpo OTA   | Óptico        | -   | 107  |
| Ácido láctico                  | Vinho              | L-lactato oxidase   | Amperométrico | 5 a 340 mmol L <sup>-1</sup>  | 108  |
| Glicose                        | Bebidas alcoólicas | Glicose oxidase   | Amperométrico | 10 a 300 µL   | 109  |
| Compostos fenólicos            | Vinho              | Lacase  | Amperométrico | -   | 110  |
| Quitosana                      | Vodka              | Glucono-bacter oxydans                                    | Amperométrico | 0,5 a 2,0 mM  | 111  |
| Etanol                         | Cerveja            | Álcool desidrogenase                                      | Amperométrico | 15 a 120 g L <sup>-1</sup>  | 112  |
| Ovalbumina                     | Vinho              | Anticorpo policlonal anti-OVA                             | Óptico        | 0,3 a 10 µg mL <sup>-1</sup> e 0,5 a 40 µg mL <sup>-1</sup>   | 113  |
| Lisozyrna                      | Vinho              | Aptâmero  | Óptico        | 1 a 100 µg mL <sup>-1</sup>   | 114  |

# DESAFIOS E AVANÇOS EM BIOSSENSORES

- Na área do diagnóstico clínico => fibras ópticas, nanotecnologia (silício e de filmes poliméricos);
- Equipamentos capazes de diferenciar impurezas das moléculas a analisar;
- Diminuição no tempo de análise e detecção ;
- Novos processos de fabricação de suportes e/ou matrizes planas => imobilização;
- Multianalisadores (arrays);
- Imunobiossensores;
- Controle ambiental.

# Referências

1. Boyer, R. F. Modern Experimental Biochemistry. Redwood: The Benjamin/Cummings Publishing. 1993. P. 40-42 e 446-464.
2. Eggins, B. R. Biosensors: an Introduction. New York: John Wiley & Sons, 1996.
3. Freitag, R. Biosensors in Analytical Biotechnology. San Diego: Academic Press. 1996.
4. Gacesa, P. Tecnologia de las enzimas. Zaragoza: Acribia, 1990.
5. Godfrey, T. and West, S. Industrial Enzymology. New York: Stockton Press, 1996.
6. Karube, I. Enzyme sensors for clinical, process and environmental analysis. In: Rehm and Reed, vol. 7a, Cap. 13, p. 685-708, 1987.
7. Rehm, H-J. and Reed, G. Biotechnology: measuring, modelling and control. VCH: Weinheim, V.4, 1991.
8. Schmid, R. D. and Karube, I. Biosensors and Bioelectronics. In: Rehm and Reed, vo. 7b, Cap. 11, p. 317-3656, 1988.
9. Twork, J. V. and Yacynych, A. M. Sensors in bioprocess control. New York: Marcel Dekker Inc. 1990.
10. Said, S.; Pietro, R. Enzimas de Interesse Industrial e Biotecnológico. Livraria e Editora Eventos: Rio de Janeiro. 2002, 121p.