



MONITORAMENTO TECNOLÓGICO DE BIOSSENSORES PARA DETECÇÃO DE ETANOL

VITOR LOUREIRO XIMENES

Monografia em Engenharia de Bioprocessos

Orientadores:

Professora Eliana Mossé Alhadef, D. Sc.
Professora Andréa Medeiros Salgado, D. Sc.

Abril de 2011

MONITORAMENTO TECNOLÓGICO DE BIOSSENSORES PARA DETECÇÃO DE ETANOL

Vitor Loureiro Ximenes

Monografia em Engenharia de Bioprocessos submetida ao Corpo Docente da Escola de Química, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Engenheiro de Bioprocessos.

Aprovado por:

Carolina Barcelos, Eng^a Química.

Estevão Freire, D. Sc.

Selma Gomes Ferreira Leite, D. Sc.

Orientado por:

Eliana Mossé Alhadeff, D. Sc.

Andréa Medeiros Salgado, D. Sc.

Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

Abril de 2011.

Ximenes, Vitor Loureiro.

Monitoramento tecnológico de biossensores para detecção de etanol / Vitor Loureiro Ximenes. Rio de Janeiro: UFRJ/EQ, 2011.

xi, 83 p.; il

(Monografia) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola de Química, 2011.

Orientadores: Eliana Mossé Alhadef e Andréa Medeiros Salgado.

1. Prospecção tecnológica. 2. Biossensor. 3. Detecção de etanol. 4. Monografia. (Graduação – UFRJ/EQ) 5. Eliana Mossé Alhadef, Andréa Medeiros Salgado. I. Monitoramento tecnológico de biossensores para detecção de etanol.

Dedico este trabalho aos meus pais, Valéria e Eduardo.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Eduardo e Valéria, por toda dedicação e confiança.

Ao meu irmão, Rafael, pela amizade e pelo amor.

À minha avó, Yedda, por todo carinho, dedicação e educação.

À minha família, pela presença constante.

Aos meus amigos, pela companhia e compreensão durante toda essa caminhada.

A todos os professores da EQ.

Às minhas orientadoras, Eliana e Andréa.

À todas as pessoas que contribuíram direta e indiretamente na elaboração deste trabalho.

Resumo da Monografia apresentada à Escola de Química como parte dos requisitos necessários para a obtenção do grau de Engenheiro de Bioprocessos.

MONITORAMENTO TECNOLÓGICO DE BIOSSENSORES PARA DETECÇÃO DE ETANOL

Vitor Loureiro Ximenes

Abril, 2011

Orientadores: Professora Eliana Mossé Alhadeff, D. Sc.
Professora Andréa Medeiros Salgado, D. Sc.

Muitos métodos para detecção de etanol são descritos na literatura, tais como GC, HPLC, destilação entre outros. Entretanto esses métodos dificultam o monitoramento on-line do álcool etílico e demandam altos custos e complexidade de instalação e operação. Os biossensores aparecem como uma alternativa promissora para essas análises e apresentam vantagens como a possibilidade de automação e minituarização do dispositivo, além de um menor custo e tempo de resposta. O presente trabalho utilizou técnicas de gestão do conhecimento e da inovação para realizar um estudo prospectivo sobre o tema biossensores para etanol, objetivando pontuar o atual estado da arte das tecnologias em desenvolvimento e servir como instrumento de consulta para futuros projetos de P&D dentro deste contexto. O estudo baseou-se em buscas e análises macro, meso e micro de depósitos de patentes nas bases USPTO, Espacenet e INPI, e de publicações de artigos científicos em periódicos disponíveis nas bases Scopus e ISI Web of Knowledge. Após triagem, foram elaborados mapas ilustrando a distribuição de artigos/patentes em relação ao ano, país de origem, tipo do componente biológico e seu método de imobilização, método de transdução, material do eletrodo, modificação do eletrodo, condições operacionais ótimas e uso da nanotecnologia, em um universo de 115 de artigos e 15 patentes. Observa-se como tendência o uso de transdutores eletroquímicos e a utilização do carbono como material para fabricação e modificação dos eletrodos, onde destaca-se o uso de nanotubos de carbono.

ÍNDICE GERAL

Capítulo I – Objetivos e justificativas	1
Capítulo II – Introdução	2
Capítulo III – O objeto de estudo: Biossensores	6
III.1. Classificação	10
III.1.1. Receptor biológico	11
III.1.1.1. Biossensores enzimáticos	12
III.1.1.2. Biossensores microbiológicos	13
III.1.1.3. Imunossensores	15
III.1.1.4. Biossensores com tecido animal ou vegetal	16
III.1.1.5. Quimiorreceptores	17
III.1.2. Elemento de transdução	19
III.1.2.1. Transdutor eletroquímico	22
III.1.2.2. Transdutor eletromagnético	26
III.1.2.3. Transdutor ótico	27
III.1.2.4. Transdutor calorimétrico	28
III.2. Métodos de imobilização do elemento biológico	29
III.2.1. Adsorção física	31
III.2.2. Encapsulamento ou aprisionamento em gel	32
III.2.3. Microencapsulamento	32
III.2.4. Ligação cruzada	32
III.2.5. Ligação covalente	33
III.2.6. Considerações finais sobre os métodos de imobilização	33
III.4. Parâmetros de desempenho	35
Capítulo IV – Análise prospectiva	38
IV.1. Metodologia	38
IV.2. Resultados	39
IV.2.1. Análise de depósito de patentes	39
IV.2.2. Análise de publicação de artigos científicos	41
IV.2.3. Análise de artigos em relação a nanotecnologia	54
Capítulo V – Tendências	57
V.1. A nanotecnologia	58
V.1.1. Nanotubos de carbono	59

V.1.2. Funcionalização de nanotubos de carbono para uso em biossensores	60
V.1.3. Biossensores eletroquímicos baseados em nanotubos de carbono	62
V.2. Eletrodos de carbono	64
V.2.1. Eletrodos de carbono vítreo	65
V.2.2. Eletrodos de grafite	66
V.3. Imobilização com ligação cruzada	67
V.4. Uso da álcool oxidase	67
V.5. Metodologias empregadas para diminuir o sobrepotencial aplicado em biossensores amperométricos	68
Conclusão	72
Referências bibliográficas	75

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 - A cadeia de valor do conhecimento (fonte: adaptado de Powell, 1999). . . 4	
Figura 2 - Representação esquemática de um biossensor (fonte: Santos, 2003) 8	
Figura 3 - Diferentes tipos de biossensores provenientes de diferentes tipos de componentes biológicos (fonte: adaptado de Chen et al., 1992).....12	
Figura 4 - Potenciostato Autolab (fonte: http://www.metrohm.com.br)..... 23	
Figura 5 - Representação esquemática de uma célula eletroquímica com 3 eletrodos: (a) trabalho, (b) referência, (c) auxiliar (fonte: http://www.metrohm.com.br)..... 23	
Figura 6 - Métodos de imobilização de enzimas (fonte: http://www.enq.ufsc.br).31	
Figura 7 - Funcionamento de um polímero condutor no biossensor (fonte: Segnini, 2003)..... 35	
Figura 8 - Série histórica de depósito de patentes de biossensores para etanol (fonte: elaboração própria)..... 39	
Figura 9 - Distribuição dos depósitos de patentes em relação ao país de origem (fonte: elaboração própria).....40	
Figura 10 - Distribuição dos tipos de transdutores utilizados em biossensores, baseado em depósito de patentes (fonte: elaboração própria).41	
Figura 11 - Série histórica de publicações de artigos científicos relacionadas ao tema biossensor para etanol (fonte: elaboração própria)..... 42	
Figura 12 - Distribuição de publicações de artigos científicos por países (fonte: elaboração própria)..... 43	
Figura 13 - Distribuição dos artigos por tipo de transdutor utilizado (fonte: elaboração própria).....44	

Figura 14 - Distribuição dos artigos por tipo de transdutor eletroquímico utilizado (fonte: elaboração própria).....	45
Figura 15 - Distribuição dos artigos por tipos de eletrodos utilizados (fonte: elaboração própria).....	46
Figura 16 - Distribuição relativa dos tipos de eletrodos de carbono mais utilizados (fonte: elaboração própria).....	47
Figura 17 - Modificações de eletrodos de carbono mais utilizadas nos biossensores para etanol (fonte: elaboração própria).....	48
Figura 18 - Tipos de biossensores quanto ao elemento biológico (fonte: elaboração própria).....	48
Figura 19 - Distribuição dos diferentes tipos de imobilização das enzimas usadas no biossensor (fonte: elaboração própria).....	49
Figura 20 - Distribuição relativa das enzimas utilizadas nos biossensores de etanol (fonte: elaboração própria).	51
Figura 21 - Uso das possíveis enzimas em relação aos anos (fonte: elaboração própria).....	52
Figura 22 - Distribuição das condições de pH mais utilizadas (fonte: elaboração própria).....	53
Figura 23 - Distribuição das condições de temperatura mais utilizadas (fonte: elaboração própria).....	54
Figura 24 - Série histórica do uso da nanotecnologia no desenvolvimento de biossensores para etanol (fonte: elaboração própria).....	55
Figura 25 - Distribuição relativa dos três tipos de materiais nanotecnológicos usados nos biossensores para etanol (fonte: elaboração própria).....	56
Figura 26 - Distribuição relativa de artigos utilizando a nanotecnologia (fonte: elaboração própria).....	56

Figura 27 - (A) Ilustração esquemática de cnt's (A) Armchair, (B) Zig-zag e (C) SWCNT quiral. (B) Ilustração esquemática de MWCNT (fonte: Balasubramanian et al., 2005). 59

Figura 28 - (A) Funcionalização "Defect Group", (B) Funcionalização covalente, (C) Funcionalização exoédrica não-covalente com surfactante, (D) Funcionalização exoédrica não-covalente com polímeros, e (E) Funcionalização endoédrica com C_{60} (fonte: Hirsch, 2002).61

Figura 29 - Foto de uma estrutura de carbono vítreo (fonte: http://www.fem.unicamp.br/~lee/infra_estrut.htm). 65

Figura 30 - Representação estrutural esquemática de um plano basal do carbono vítreo. (A) Visão frontal do eixo C; (B) Visão lateral do eixo B (fonte: Oamalley, 1998).66

Figura 31 - Representação esquemática do mecanismo de ação do modificador na superfície de um eletrodo (fonte: adaptado de Segnini, 2003). 71

ÍNDICE DE QUADROS

Quadro 1 - Quadro comparativo de imunossensores (fonte: adaptado de Hall, 1990).	15
Quadro 2 - Diferentes aplicações de tecidos animais e vegetais em biossensores (fonte: Salgado, 2008).....	17
Quadro 3 - Possíveis tipos de quimiorreceptores e suas vantagens e desvantagens (fonte: adaptado de Hall, 1990).....	19
Quadro 4 - Tipos de biossensores segundo seu elemento de transdução (fonte: adaptado de Rogers, 1995).....	21
Quadro 5 - Formas de imobilização de enzimas, suas vantagens e desvantagens (fonte: adaptado de Coelho et al., 2008).	34
Quadro 6 - Modificações de eletrodos (fonte: adaptado de Baldwin et al., 1991)..	70

CAPÍTULO I – OBJETIVOS E JUSTIFICATIVAS

Nesta monografia, foi realizado um monitoramento tecnológico de biossensores para detecção de etanol visando auxiliar o desenvolvimento de projetos e ainda pontuar o atual estado da arte deste tema. Utilizando metodologia adequada foram coletados artigos e patentes em bases de periódicos e bases de depósito de patentes, respectivamente. O mapeamento dos registros de tecnologias desenvolvidas, e em desenvolvimento, permite estabelecer uma dinâmica entre as informações coletadas, e a análise destas informações possibilita visualizar e compreender o contexto atual do setor investigado, gerando conhecimento e norteando as investigações em curso.

O presente trabalho se insere em um projeto realizado na Escola de Química, UFRJ, cujo objetivo é desenvolver um biossensor para detecção de etanol. Como consequência, as informações presentes nesta monografia possibilitam o conhecimento do atual estado da arte sobre o tema.

CAPÍTULO II – INTRODUÇÃO

A inovação tecnológica tem sido um dos principais agentes de mudanças econômicas e sociais nos diversos países e o sucesso das empresas depende, cada vez mais, da eficácia com que incorporam os novos conhecimentos nos seus produtos e serviços. Este fato foi ressaltado por Joseph Schumpeter (1970), cuja obra enfatiza a importância das inovações e dos avanços tecnológicos no desenvolvimento das empresas e da economia.

Segundo Betz (1997), primeiro a tecnologia precisa ser inventada. Segundo, a nova tecnologia precisa ser desenvolvida e incorporada em produtos, processos ou serviços. E terceiro, ela precisa ser projetada, produzida e colocada no mercado. A inovação tecnológica cobre todo esse espectro, desde a criação até a utilização do conhecimento para fins econômicos.

O conceito de inovação tecnológica é importante porque ele afeta o desenvolvimento da indústria e da economia. Seu impacto se inicia com a ciência e a tecnologia e tem contribuído para uma revolução industrial global. O impacto de novas tecnologias baseadas na nova ciência tem criado novas indústrias que impulsionam a expansão econômica. As indústrias de base tecnológica têm promovido grandes mudanças na qualidade de vida da sociedade.

O Brasil tem sido capaz de produzir ciência na fronteira do conhecimento. Segundo a Assessoria de Imprensa da Capes em 2009, um claro sinal disso é sua participação em publicações científicas internacionais, que aumentou de 0,3% para 1,5% desde 1980 - e cabe citar que artigos científicos equivalem a pesquisas realizadas. Ao mesmo tempo, graças à construção de um sólido sistema de pós-graduação a partir da década de 70, o Brasil está entre os raros países capazes de formar seis mil doutores por ano - boa parte deles engenheiros aptos a formular, gerar e desenvolver inovação.

Segundo Ribault et al. (1991), a inovação é desencadeada por duas forças motrizes distintas e por isso pode ser classificada, baseada nesse conceito, em duas formas:

1. “**Demand Pull**”, quando a inovação trata de satisfazer as necessidades expressas do mercado. E normalmente dá origem a inovação incremental, ou seja, promove a melhoria de um processo, produto ou serviço já existente.
2. “**Technology Push**”, quando resulta da análise e utilização das vantagens competitivas de novas tecnologias. E normalmente dá origem a inovações radicais.

Uma das ferramentas utilizadas no processo de gestão da inovação é a prospecção tecnológica de determinado produto, processo ou serviço, principalmente no âmbito da inovação “technology push”. Segundo Barré (2000), até a década de 1980, as técnicas e métodos de technology forecasting procuravam determinar, com a melhor precisão possível, o futuro do desenvolvimento tecnológico e o aparecimento de novas tecnologias. De lá para cá, essa perspectiva foi, gradativamente, sendo alterada com crescente concordância de que o mais importante seria dotar as decisões presentes de conhecimento sobre as possibilidades de futuro, ao invés de determinar o futuro precisamente, para só então decidir. Essa sutil, porém importante diferença, modificou, profundamente, o conceito sobre o que é prospecção tecnológica e o modo de se trabalhar suas ferramentas na gestão da inovação. O nome

Technology Foresight ou simplesmente Foresight passou a ser utilizado para denominar a nova abordagem.

A prospecção tecnológica está inserida de forma estratégica na cadeia de valor do conhecimento, pois é a ferramenta responsável pela gestão do conhecimento e que vai nortear e justificar a aplicação do mesmo, para fins de inovação.

O termo “cadeia de valor do conhecimento” foi inserido por Tim Powell, em 1999, durante uma conferência sobre inteligência competitiva, e faz referência a uma sequência de tarefas intelectuais onde se obtém como resultado uma vantagem competitiva em relação a concorrentes do mesmo nicho. A Figura 1 ilustra o processo descrito por Powell.

A Figura 1 é auto-explicativa e divide a cadeia de valor do conhecimento em duas etapas distintas: a gestão do conhecimento e a aplicação do conhecimento. A primeira etapa é compreendida como a fase em que os dados relevantes ao

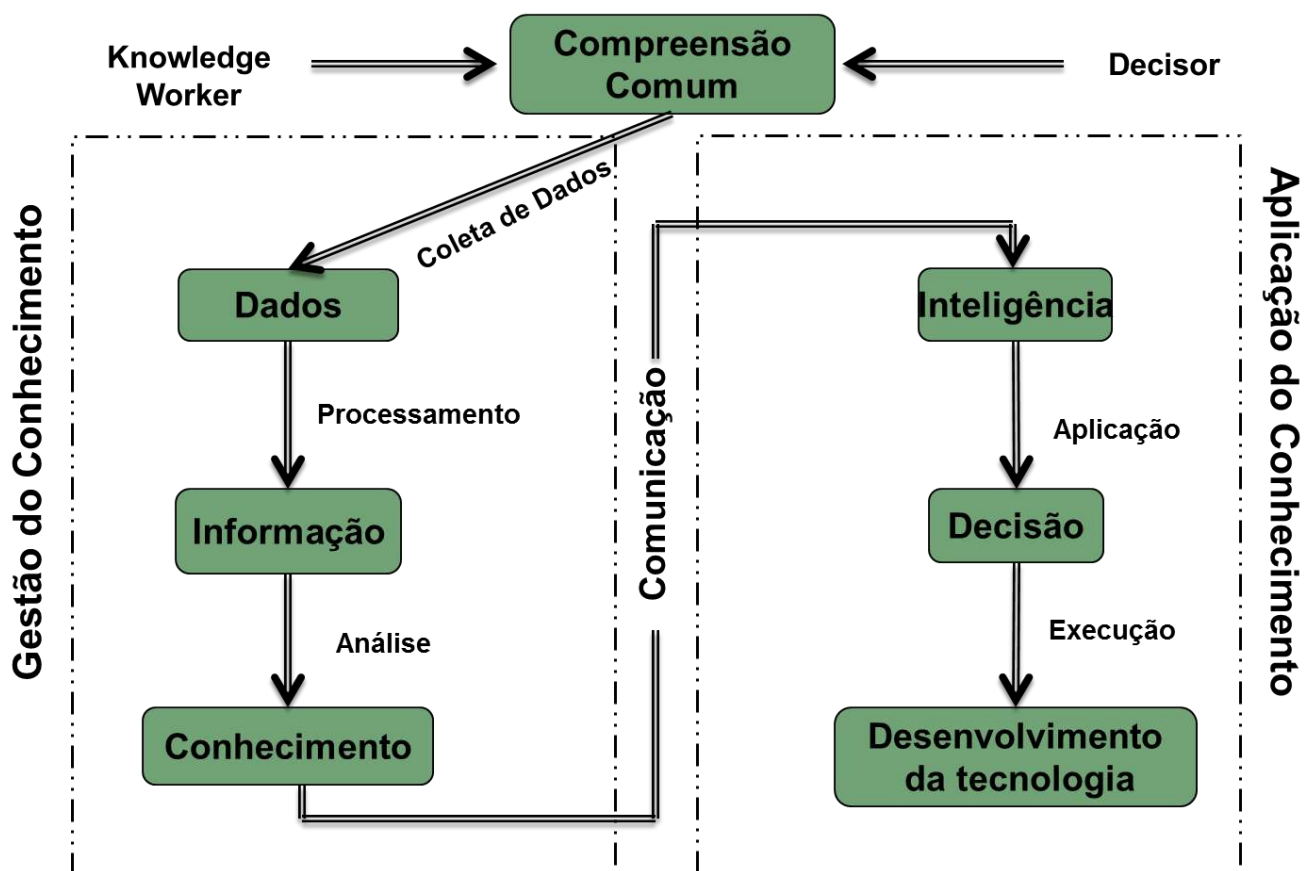


FIGURA 1 - A CADEIA DE VALOR DO CONHECIMENTO (FONTE: ADAPTADO DE POWELL, 1999).

conhecimento que pretende ser adquirido são coletados, processados e analisados.

Um aspecto que deve ser levado em consideração no entendimento da gestão da inovação é que este é um processo interativo, realizado com a contribuição de variados agentes econômicos e sociais que possuem diferentes tipos de informações e conhecimentos (Lemos, 1999). A interação na inovação tecnológica é um processo complexo que envolve um conjunto de setores como a indústria, a universidade e governo, os clientes e as empresas. A conexão com a universidade é intensificada pelas tradicionais parcerias estratégicas com os setores de produção de bens e serviços, seja ele público ou privado, e tem o poder de promover a expansão tecnológica do país.

Deste modo, o conteúdo desta monografia permeia a etapa de gestão do conhecimento, descrita por Powell em sua cadeia de valor do conhecimento, e ainda abrange as etapas preliminares da aplicação do conhecimento com o objetivo de gerar inteligência dentro do contexto de P&D do objeto de estudo.

CAPÍTULO III – O OBJETO DE ESTUDO: BIOSSENSORES

O álcool etílico desempenha papel fundamental em vários campos de atuação. Atualmente, seu uso mais comum é como combustível veicular, o que já acontece há bastante tempo no Brasil, desde a implementação do Programa Proálcool pelo governo na década de 70. Ele também é o componente principal da indústria de bebidas alcoólicas e tem grande importância na indústria farmacêutica, de cosméticos e de perfumaria, além de ser uma droga tóxica em níveis elevados, o que o torna de certo interesse em análises clínicas (Jia et al., 2009).

O etanol também está envolvido diretamente nos casos de medicina-legal, sendo a causa mais frequente dos acidentes de trânsito. Vários efeitos farmacológicos do etanol são observados quando sua concentração na corrente sanguínea alcança aproximadamente 10 mmol/L, sendo que a 10 vezes este nível, o álcool passa a ser uma droga letal (Jia et al., 2009).

Do ponto de vista econômico, a determinação da concentração de etanol é um passo importante em processos de fermentação. Em vários campos da indústria de alimentos e bebidas, sua determinação tem de ser realizada “on line”, sendo particularmente importante no controle de qualidade na produção de bebidas. O poder público também é um grande interessado pela determinação rápida e eficiente de etanol, pois taxas e regulamentações são muitas vezes impostas com base no teor de álcool de determinado produto (Goriushkina et al., 2009).

Muitos métodos são utilizados para a determinação de etanol, tais como a cromatografia, análises espectrofotométricas e destilação. Contudo, esses métodos são relativamente caros, demorados, complexos e exigem pré-tratamento da amostra. Desta forma, há uma grande demanda por métodos baratos, rápidos e confiáveis para a determinação de etanol.

Técnicas eletroquímicas, especialmente aquelas empregando biossensores amperométricos, são particularmente eficientes neste tipo de análise. Estes dispositivos apresentam várias características favoráveis, tais como: sensibilidade, seletividade, rapidez, baixo custo, portabilidade e possibilidade de miniaturização.

Um sensor químico é um instrumento que transforma uma informação química em um sinal analítico mensurável. Sensores químicos geralmente contêm dois elementos básicos conectados em série: um sistema de reconhecimento químico (receptor) e um transdutor físico-químico.

O termo biossensor é aplicado a sistemas que empregam como componente de reconhecimento um elemento de origem biológica incorporado a um transdutor, sendo uma das suas principais características a alta seletividade com o analito (Eggins, 1999). Tal propriedade faz com que haja muitos estudos no sentido do desenvolvimento dos biossensores para as mais diversas aplicações nas áreas médica (análises clínicas), farmacêutica e industrial.

O sistema biológico de reconhecimento traduz informações do domínio bioquímico, geralmente a concentração de um analito, em um sinal físico ou químico com determinada sensibilidade. O principal propósito deste tipo de sistema de reconhecimento é promover um alto grau de seletividade para o analito em questão.

O elemento de transdução do sensor é responsável por transferir o sinal enviado pelo receptor para um domínio onde possa ser mensurado, na grande maioria para o domínio elétrico. Este fenômeno também é conhecido como amplificação do sinal. O elemento de transdução também pode ser chamado de

detector, sensor ou eletrodo, mas o termo transdutor é preferível para que sejam evitadas confusões.

Por último, é importante citar que todos os elementos de um biossensor encontram-se agrupados em uma só unidade, geralmente pequena, e com o elemento biológico de reconhecimento estando em contato espacial direto com o elemento de transdução, como ilustrado na Figura 2.

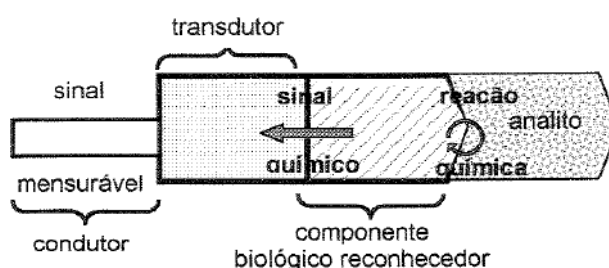


FIGURA 2 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DE UM BIOSENSOR (FONTE: SANTOS, 2003)

Segundo Thévenot et al. (1999), a IUPAC (Union of Pure Applied Chemistry - 2001) propôs uma definição de Biossensor:

“Um biossensor é um instrumento integrado que é capaz de fornecer uma informação analítica específica quantitativa ou semi-quantitativa através do uso de um elemento de reconhecimento biológico (receptor bioquímico) que esta em contato direto com o elemento transdutor.”

Os biossensores representam uma ferramenta promissora para suplementar as técnicas existentes devido às características únicas tais como: seletividade, relativo baixo custo de construção e estocagem, potencial para minituarização, facilidade de automação e construção de equipamentos simples e portáteis para um monitoramento “on site” rápido, uso de métodos “limpos”, etc.

O desenvolvimento destes instrumentos ao longo dos anos foi marcado pelas exigências e na natureza da aplicação destes, e alguns fatores desempenham um

papel decisivo no projeto do biossensor como sensibilidade, meio ambiente de amostra, custo, tempo de vida útil e uso específico.

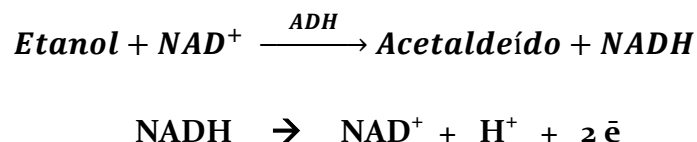
Biossensores são chamados de primeira geração quando uma enzima de oxirredução está em contato direto com o eletrodo, e o produto da reação enzimática é detectado por um eletrodo de oxigênio. Os de segunda geração são aqueles onde uma molécula mediadora redox está auxiliando a transferência de elétron da enzima para o eletrodo. E os de terceira geração aqueles em que ocorre a transferência direta de elétron entre a biomolécula redox e a superfície do eletrodo.

Embora os biossensores de primeira geração apresentem boas respostas, no caso das oxidases, em que a resposta é função da redução do oxigênio ou do peróxido de hidrogênio, o potencial aplicado é muito alto, implicando em um elevado número de interferentes e/ou envenenamento da superfície do eletrodo. Uma alternativa para resolver esses problemas, da qual originou os biossensores de segunda geração, foi a imobilização conjunta de mediadores redox e enzimas. Esse procedimento possibilitou a regeneração da enzima ou a diminuição do potencial aplicado para detecção dos produtos da reação enzimática, minimizando os interferentes (Santos, 2003).

Apesar da diminuição do número de interferentes com a adição de mediadores, a interação enzima/mediador não é tão simples, dependendo ainda da proximidade dos dois para que ocorra a transferência de elétrons. Assim, a orientação durante o processo de imobilização é um passo fundamental na procura de sistemas mais simples e eficientes para a construção de biossensores de segunda geração. Atualmente, tem-se buscado biossensores cujas respostas sejam referentes à regeneração direta da enzima pelo eletrodo, sem a necessidade da inclusão de mediadores – biossensores de terceira geração (Hnaien et al, 2010).

As enzimas utilizadas para desenvolvimento de biossensores amperométricos visando à determinação de etanol são a álcool oxidase (AOD) e a álcool desidrogenase (ADH). Nos biossensores empregando a AOD, o consumo de O_2 ou a produção de H_2O_2 são monitorados. Já nos biossensores empregando ADH, a

enzima catalisa a oxidação do etanol a acetaldeído na presença do cofator NAD^+ , enquanto o $NADH$ gerado na reação pode ser monitorado amperometricamente de acordo com a seguinte reação:



Este mecanismo de atuação apresenta algumas características importantes na determinação de álcool etílico, como a não dependência do oxigênio molecular e a alta seletividade para o etanol. No entanto, os biossensores amperométricos dependentes de $NADH$ também apresentam algumas desvantagens, principalmente relacionadas à instabilidade e problemas com a oxidação eletrocatalítica do $NADH$, que exigem alto sobrepotencial de oxidação.

Desta forma, seria muito interessante o desenvolvimento de biossensores $NADH$ -dependentes que pudessem incorporar as novas tecnologias de elaboração de eletrodos quimicamente modificados (EQM's). Os avanços alcançados empregando-se os novos materiais e as novas técnicas de imobilização de mediadores e enzimas certamente permitirão a elaboração de melhores biossensores, que poderão ser aplicados nos mais diversos fins, tal como para a detecção de etanol em diferentes tipos de amostras.

III.1. CLASSIFICAÇÃO

Biossensores podem ser classificados de acordo com o elemento de reconhecimento biológico ou pelo método de transdução do sinal, ou, alternativamente, através de uma combinação dos dois.

III.1.1. RECEPTOR BIOLÓGICO

O componente biológico faz o reconhecimento da substância de interesse por meio de uma reação química gerando um sinal que pode resultar de uma variação na concentração de prótons, liberação de gases, emissão ou absorção de luz, emissão de calor, variação de massa, mudança de estado de oxidação, etc. O transdutor converte este sinal em uma resposta mensurável, tais como: corrente, potencial, variação de temperatura, dentre outras. (Salgado, 2001).

A seletividade, capacidade de discriminar um entre diferentes substratos, que é uma das características mais importantes de um biossensor, é função principalmente do componente biológico, embora algumas vezes o transdutor também contribua para a seletividade. Por isso, enzimas foram e continuam sendo o elemento biológico mais usado na construção de biossensores (Du et al., 2008).

Alguns requisitos básicos são exigidos na escolha de um biocomposto para atuar como elemento de reconhecimento biológico, dentre eles (Salgado, 2001):

- Disponibilidade de um sítio reativo que possa reagir/interagir com o analito;
- Estabilidade face ao meio e as condições de medição;
- Possibilidade de modificação / imobilização sobre suporte por métodos químicos sem afetar o seu desempenho.

Baseado nestas exigências, alguns biocompostos são adequados para o uso na composição dos biossensores, entre eles: enzimas, cofatores, receptores, anticorpos, células de microorganismos, organelas e tecidos vegetais e animais.

Assim, de acordo com o elemento biológico utilizado para a sua construção, os biossensores podem ser divididos em várias classes. Dentre elas, as classes mais desenvolvidas são:

- Biossensores enzimáticos
- Biossensores Microbiológicos
- Biossensores que utilizam tecido animal ou vegetal
- Quimiorreceptores
- Imunossensores

A Figura 3 correlaciona esquematicamente os diferentes tipos de receptores biológicos e sua respectiva classe de biossensor.

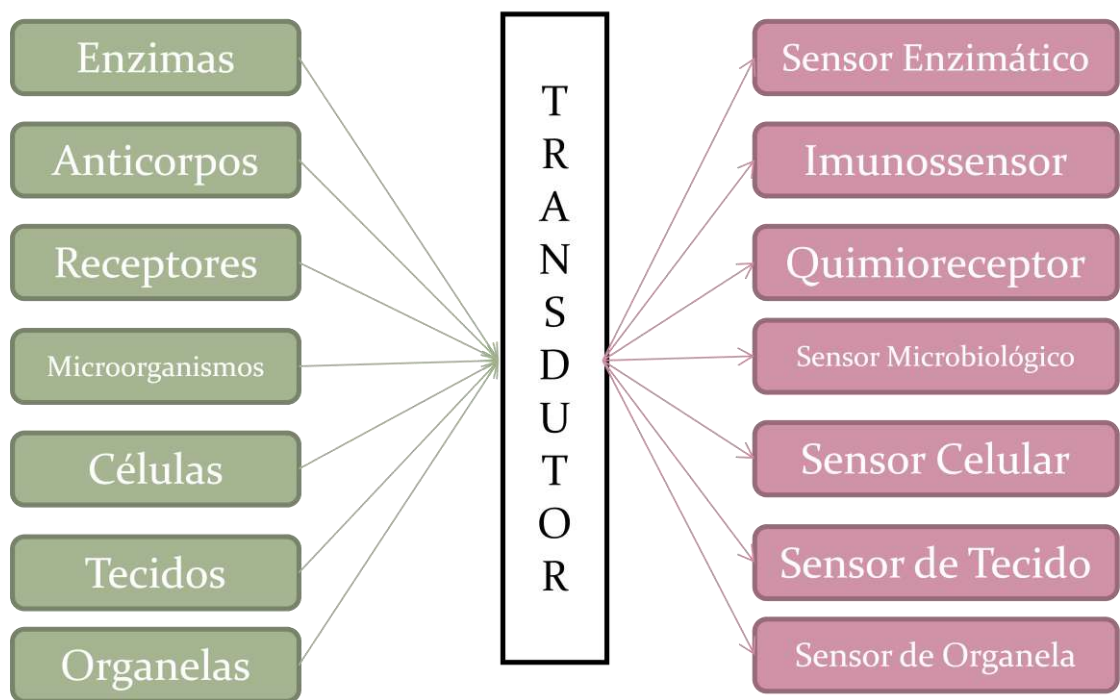


FIGURA 3 - DIFERENTES TIPOS DE BIOSSENSORES PROVENIENTES DE DIFERENTES TIPOS DE COMPONENTES BIOLÓGICOS (FONTE: ADAPTADO DE CHEN ET AL., 1992).

III.1.1.1. BIOSSENSORES ENZIMÁTICOS

Os biossensores enzimáticos utilizam enzimas que geralmente são usadas imobilizadas e possuem a vantagem por serem catalisadores de alta especificidade e altamente seletivos. Uma desvantagem em relação ao uso de enzimas na construção de um biossensor é o fato de apresentar uma estabilidade relativamente baixa, principalmente no que diz respeito à variação das condições

físico-químicas do meio reacional, mas que podem ser contornados usando as condições adequadas de pH, temperatura e pressão que garantam a manutenção da atividade enzimática (Salgado, 2008).

Usando todo um repertório de forças inter-moleculares as enzimas atraem seus substratos específicos em uma orientação ótima iniciando reações de produção ou de ruptura de ligações químicas, em velocidades consideravelmente elevadas. As enzimas são moléculas de estrutura complementar aos complexos ativados das reações que catalisam, e a atração da molécula da enzima pelo complexo ativado leva a uma diminuição da energia de ativação da reação e a um aumento da velocidade da reação (Coelho et al., 2008).

Na análise enzimática de substratos, podem ser usados basicamente dois métodos: o de equilíbrio e o cinético. No método do equilíbrio, espera-se a reação enzimática atingir o equilíbrio antes de realizar o monitoramento de reagentes e/ou produtos, ao passo que o método cinético não há necessidade de esperar o término da reação. Enquanto o método cinético oferece um resultado mais rápido sobre os de equilíbrio, os de equilíbrio são mais precisos e não necessitam de um controle rigoroso de temperatura (Coelho et al., 2008).

III.1.1.2. BIOSSENSORES MICROBIOLÓGICOS

Os biossensores microbiológicos utilizam a estrutura celular intacta apresentando também vários tipos de biomoléculas que respondem para várias espécies químicas (Salgado, 2008).

Os biossensores microbiológicos são formados por um microrganismo imobilizado, sensível e que especificamente reconhece a espécie de interesse, interligada a um adequado sistema de transdução. O princípio de funcionamento dessa classe de biossensores envolve assimilação do composto orgânico pelo microrganismo, acompanhado por uma variação na atividade respiratória ou na produção de metabolitos, que são monitorados diretamente por um transdutor.

Os biossensores microbiológicos apresentam algumas vantagens em relação ao enzimático, como serem menos sensíveis às variações das condições do meio (pH, temperatura, pressão). Dessa forma apresentam-se mais estáveis, pois a enzima está protegida em seu ambiente natural, podem ainda serem regenerados pela simples imersão dos mesmos em meio de crescimento e são mais baratos que os enzimáticos, apresentando um tempo maior de vida. No entanto, têm a desvantagem de apresentarem um longo tempo de resposta quando comparados aos enzimáticos, e serem menos seletivos, visto que um microorganismo contém inúmeras enzimas (Salgado, 2008).

Meios de melhorar o tempo de resposta têm sido estudados, utilizando células permeabilizadas, além disso, a utilização de microorganismos mutantes onde estão ausentes certas enzimas pode melhorar o problema de seletividade e especificidade desses biossensores. A utilização de microorganismos modificados geneticamente, fazendo uso da tecnologia do DNA recombinante tem permitido obter espécies mais específicas aumentando assim a sensibilidade do sensor. A permeabilização das células abre poros na membrana da célula ou destroem a própria membrana, retirando parte do metabolismo e deixando a enzima em seu ambiente natural ativa durante mais tempo, facilitando a própria reação enzimática. Desta forma, o uso de células permeabilizadas reduz o tempo de resposta, permitindo assim que células de microorganismos possam ser usadas sem inconvenientes (Salgado, 2008).

A maior parte dos biossensores microbiológicos utiliza transdutores eletroquímicos e seu princípio de funcionamento envolve a variação da atividade respiratória. Na literatura são citados também alguns sensores foto-microbiológicos, onde a intensidade luminescente produzida pela atividade metabólica é medida usando fotodetectores; e sensores termo-microbiológicos, onde a variação de calor produzida pela atividade metabólica é medida usando termistores (Salgado, 2008).

III.1.1.3. IMUNOSSENSORES

Imunossensores utilizam em grande parte imunoglobulinas – anticorpos – que formam parte de um importante grupo de proteínas altamente específicas. Dentre os anticorpos usados, podem ser citados, anticorpos policlonais, anticorpos monoclonais, fragmentos de anticorpos, conjugados anticorpo-enzima, e anticorpos marcados (Salgado, 2008).

Segundo Salgado (2008), a formação do complexo pode ser monitorada pelo método direto (não necessitam da utilização de um marcador) apresentando baixas sensibilidades ou indiretas (necessitam de um marcador). Pode ser radioativo, compostos fluorescentes ou enzimas (métodos indiretos). Os indiretos podem ainda ser classificados em:

- Homogêneos (não é necessário separar espécies marcadas e livres);
- Heterogêneos (necessário separações das frações livres e ligadas das espécies marcadas);
- Competitivo
- Tipo Sandwich

QUADRO 1 - QUADRO COMPARATIVO DE IMUNOSSENSORES (FONTE: ADAPTADO DE HALL, 1990).

TIPO DE ANTICORPO	VANTAGENS	DESVANTAGENS
Anticorpos policlonais	Relativamente baratos	Seletividade limitada
Anticorpos monoclonais	Boa seletividade, uniforme	Alto custo, disponibilidade limitada
Fragmentos de anticorpos	Baixo peso molecular	Disponibilidade limitada, custo incerto
Conjugado enzima-anticorpo	Alta amplificação do sinal	Difícil preparo

O principal problema deste biossensor é o elevado peso molecular dos anticorpos que dificulta a sua adaptação ao transdutor.

A maior parte dos imunossensores desenvolvidos é usado em áreas clínicas e médicas, visando rápidas determinações de células tumorais, microorganismos patogênicos, toxinas etc. O Quadro 1 relaciona os tipos de anticorpos usados nos imunossensores com suas vantagens e desvantagens.

III.1.1.4. BIOSSENSORES COM TECIDO ANIMAL OU VEGETAL

O Brasil tem uma grande variedade de vegetais que podem se constituir em fontes inesgotáveis de enzimas para serem aplicadas nas mais diversas áreas do conhecimento. Em química analítica, por exemplo, o tecido vegetal pode ser utilizado na construção de diversos tipos de biossensores e/ou procedimentos enzimáticos de análise. Há uma tendência recente de utilização de tecidos vegetais e/ou extratos brutos no lugar de enzimas purificadas na confecção dos biossensores (Salgado, 2008).

O uso de tecidos vegetais e/ou extratos brutos pode apresentar, em alguns casos, certa desvantagem na seletividade do método analítico, no entanto, são extremamente econômicos e, geralmente, possuem tempo de vida superior àqueles métodos que utilizam enzimas purificadas. Essa estabilidade se deve ao fato das enzimas estarem em seu habitat natural, isto é, estarem naturalmente imobilizadas nas células do material biológico (Arnold et al., 1987). Outra desvantagem é que os biossensores de tecido estão sujeitos a um grande número de interferências e contaminações. O Quadro 2 apresenta uma lista de aplicações de tecidos animais e vegetais em biossensores.

QUADRO 2 - DIFERENTES APLICAÇÕES DE TECIDOS ANIMAIS E VEGETAIS EM BIOSSENSORES (FONTE: SALGADO, 2008).

SUBSTRATO	TECIDO BIOCATALISADOR	TRANSDUTOR ELETROQUÍMICO
Glutamina	Células de rim suíno	Sensor de NH ₃
Adenosina	Células da mucosa do intestino delgado de rato	Sensor de NH ₃
Guanina	Fígado de coelho	Sensor de NH ₃
Peróxido de hidrogênio	Fígado bovino	Sensor de O ₂
Piruvato	Semente de milho	Sensor de CO ₂
Dopamina	Polpa de banana	Sensor de O ₂
Cisteína	Folha de pepino	Sensor de NH ₃
Tirosina	Beterraba	Sensor de O ₂
Uréia	“Feijão de porco” triturado	Sensor de NH ₃

III.1.1.5. QUIMIORRECEPTORES

Segundo Salgado (2008), podemos dividir os quimiorreceptores de acordo com o tipo de biomolécula utilizada, como descrito a seguir:

- Quimiorreceptores que utilizam biomoléculas que agem como intermediários nas vias metabólicas (proteínas que interagem com espécies químicas, tais como hormônios, lipídeos, moléculas de DNA etc, resultando em variações conformacionais).

No caso dos Biossensores quimiorreceptores de DNA estes permitem um aumento da atividade, alteração ou remoção da dependência de pH, variação da faixa de resposta linear à concentração de substrato, aumento da estabilidade durante estocagem e operação, redução da susceptibilidade a interferentes, aumento da especificidade ao substrato e não exigem cofatores.

- Quimiorreceptores que utilizam biomoléculas que apresentam propriedades neurais (sentidos de base química, como olfato e gosto). Neste caso são acopladas estruturas sensoriais intactas procedentes de animais, por exemplo, pés de crustáceos que tem funções fisiológicas sensitivas adaptadas a meios em “solução”. A interação entre uma biomolécula estimulante e as zonas quimiorreceptivas de uma estrutura sensorial (antenas e antenúlas de caranguejos como *Callinectes sapidus*), acoplada a um condutor metálico inerte produz um neurosinal de pulsos elétricos, cuja frequência é função da concentração da biomolécula estimulante (aminoácidos, hormônios, nucleotídeos, fármacos e toxinas).

Ainda segundo Salgado (2008), o uso destes quimiorreceptores nas próprias biomembranas depende da integridade destas. Por este motivo em geral são incorporadas a biomembranas sintéticas. Alguns quimiorreceptores atuam alterando a permeabilidade a íons (K, Na, Ca, Cl) destas membranas que os incorporam, como resultado da interação. A variação da permeabilidade permite monitorar a reação de interação através de medidas de potencial, intensidade, capacitância ou resistência. Em geral os biossensores quimiorreceptores apresentam problemas de ligação ao transdutor (devido a sua fragilidade), dificuldade de manipulação e um tempo de vida curto dos ditos componentes biológicos.

O Quadro 3 a seguir lista os possíveis componentes biológicos usados em quimiorreceptores, apresentando suas vantagens e desvantagens.

QUADRO 3 - POSSÍVEIS TIPOS DE QUIMIORRECEPTORES E SUAS VANTAGENS E DESVANTAGENS (FONTE: ADAPTADO DE HALL, 1990).

Componente Biológico	Vantagens	Desvantagens
Estruturas intactas	Uso das estruturas naturais que fornecem ótimos estados para detecção	Tempo de vida limitado, frágeis
Preparações contendo os quimiorreceptores isolados	Podem ser preparadas de modo a manter altas estabilidade e resistências	Dificuldades para estocagem, pouca variedade, limitada seletividade

III.1.2. ELEMENTO DE TRANSDUÇÃO

Segundo Thévenot et al. (1999), de uma forma genérica, define-se transdutor como sendo todo dispositivo que transforma uma forma de energia a outra forma de energia. No âmbito da instrumentação elétrica, define-se transdutor como sendo todo equipamento que converte qualquer grandeza física não elétrica (temperatura, som, luz, como exemplos) em um sinal elétrico. Sob o ponto de vista da confecção de um biossensor, transdutor é o equipamento que converte o produto da reação biológica em um sinal elétrico quantificável e processável. O papel deste equipamento consiste em detectar a presença, a mudança, a amplitude ou a frequência de uma grandeza submetida à medição e providenciar na saída um sinal elétrico que, quando convenientemente processado e aplicado a um aparelho de medição, seja possível quantificar o elemento medido.

A combinação das mais variadas áreas, como eletroquímica, física, eletrônica, tecnologia de sistemas integrados de silício e de fibras óticas no desenvolvimento de novos transdutores, aliada à bioquímica e imunquímica, tem tornado

possível o surgimento de micro-biossensores altamente sensíveis, específicos, seletivos e acurados. A escolha do transdutor é realizada mediante três requisitos básicos: que ele seja adequado para adaptação ao material biológico imobilizado; que seja altamente específico para o analito de interesse, sendo capaz de detectar alguma variação específica que ocorra durante a reação biológica e; que esta variação ocorra na faixa de concentração apropriada. Outros aspectos também devem ser atendidos, como: frequência da resposta; compatibilidade com o meio ambiente onde tem que operar; exatidão; características elétricas (relação entre sinal e ruído; possibilidade de amplificação do sinal quando insuficiente; limitações da frequência de resposta) e condições de aplicação e robustez (peso, dimensões, robustez mecânica e elétrica) (Salgado, 2001).

Além da classificação de acordo com o seu componente biológico, os biossensores podem ser classificados de acordo com o seu sistema de transdução.

Baseado no transdutor, os biossensores podem ser classificados em:

- Biossensores Eletroquímicos:
 - Biossensores Amperométricos;
 - Biossensores Potenciométricos;
 - Biossensores Condutimétricos;
- Biossensores Acústicos;
- Biossensores Óticos;
- Biossensores Calorimétricos.

Dos vários transdutores empregados na construção dos biossensores, os mais utilizados são os eletroquímicos, óticos e calorimétricos. No Quadro 4, encontram-se os métodos de medição, os transdutores utilizados e os analitos correspondentes.

QUADRO 4 - TIPOS DE BIOSSENSORES SEGUNDO SEU ELEMENTO DE TRANSDUÇÃO (FONTE: ADAPTADO DE ROGERS, 1995).

Tipo de medição	Transdutor	Analito
Potenciométrico	Eletrodos seletivo de íon	K ⁺ , Cl ⁻ , Ca ⁺² , F ⁻
	Eletrodos de vidro	H ⁺ , Na ⁺ , ...
	Eletrodos de gás	CO ₂ , NH ₃
	Eletrodos de metal	Espécies redox
Amperométrico	Eletrodos de metal ou carbono	O ₂ , açúcares, álcoois, ...
	Eletrodos modificados	Açúcares, álcoois, fenóis, oligonucleotídeos, ...
Condutimétrico	Eletrodos de metal	Uréia, espécies com carga, oligonucleotídeos, ...

Idealmente, o transdutor a ser utilizado juntamente com o material biológico deverá detectar apenas um reagente ou produto específico, não respondendo a outras substâncias (espécies) presentes na amostra a ser analisada. Dependendo da espécie que é monitorada durante a catálise enzimática pode-se desenvolver diversos biossensores para detecção de um mesmo substrato (Capelato et al., 1992).

A natureza do transdutor e o parâmetro de transdução dependem do tipo de evento bioanalítico relacionado com a detecção do analito (substrato). O transdutor a ser utilizado juntamente com o material biológico, deve detectar apenas um reagente ou produto específico, não respondendo a outras substâncias (espécies) presentes a ser analisada (Capelato et al., 1992).

III.1.2.1. TRANSDUTOR ELETROQUÍMICO

Os transdutores eletroquímicos são os mais frequentemente usados em biossensores. Eles são baseados no fato de que durante o processo de bio-interação, elétrons são consumidos ou gerados, produzindo um sinal eletroquímico, e o modo de transdução desse sinal torna importante o conhecimento da técnica a ser usada.

Estudos de processos de oxidação e redução em vários meios, de adsorção em superfícies e de mecanismos de transferência de elétrons, inclusive com a utilização de eletrodos modificados, exemplificam algumas das numerosas aplicações atuais das chamadas técnicas eletroanalíticas. Uma de suas mais importantes características relaciona-se com o fato dessas técnicas possibilitarem o estabelecimento de relações diretas entre a concentração do analito e algumas propriedades elétricas como corrente, potencial, condutividades, resistência ou carga. Como as medidas destas propriedades são facilmente acessíveis experimentalmente, as técnicas eletroanalíticas são adequadamente utilizadas na quantificação de espécies de interesses nas diferentes áreas de estudo (Souza et al., 2003).

A técnica a ser utilizada necessita de equipamentos e eletrodos apropriados, sendo o referido equipamento um potenciostato, que tem a função de controlar o potencial aplicado ao eletrodo de trabalho e permitir a medição de corrente que passe por este. Um potenciostato, conforme a técnica a ser utilizada, requer uma célula eletroquímica com 3 eletrodos. Um eletrodo de referência, usado na medida do potencial do eletrodo de trabalho. Este eletrodo necessita ter um potencial que seja estável com o tempo e a temperatura e que não seja alterado por pequenas perturbações do sistema, ou seja, pela passagem de uma pequena corrente. A corrente que flui na solução via eletrodo de trabalho, deixa a solução via eletrodo auxiliar, que é geralmente um condutor inerte. Os eletrodos são imersos em um eletrólito. O conjunto de eletrodos, solução e o recipiente que

contém a solução, são chamados célula eletroquímica. As Figuras 4 e 5 ilustram os equipamentos citados acima.



FIGURA 4 - POTENCIOSTATO AUTOLAB (FONTE: [HTTP://WWW.METROHM.COM.BR](http://www.metrohm.com.br)).

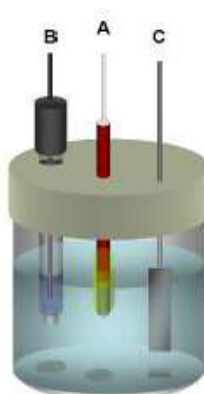


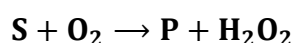
FIGURA 5 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DE UMA CÉLULA ELETROQUÍMICA COM 3 ELETRODOS: (A) TRABALHO, (B) REFERÊNCIA, (C) AUXILIAR (FONTE: [HTTP://WWW.METROHM.COM.BR](http://www.metrohm.com.br)).

III.1.2.1.1. TRANSDUTOR AMPEROMÉTRICO

A amperometria é baseada na medição da corrente resultante de uma oxidação ou redução eletroquímica de espécies eletroativas. De maneira geral, mantém-se um potencial constante em um eletrodo de trabalho e a corrente resultante é correlacionada diretamente com a concentração das espécies eletroativas ou com suas taxas de consumo ou formação. Como as taxas de reações biocatalíticas são geralmente de primeira ordem, o estado estacionário da corrente elétrica atingida é proporcional a concentração do analito (Thévenot et al., 1999).

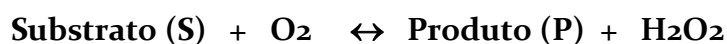
Biossensores Amperométricos dependem tipicamente de um sistema biológico que converta cataliticamente analitos inativos eletroquimicamente em produtos que possam ser oxidados ou reduzidos em um eletrodo operante, o qual é mantido em um potencial específico de acordo com um eletrodo de referência. A corrente produzida pela reação redox é linearmente proporcional à concentração do produto eletroativo, a qual é proporcional ao analito (substrato da enzima) não eletroativo (Sharmat et al., 1994).

Segundo Salgado (2008), dentre os métodos de detecção, a amperometria é o que tem maior aceitação e por isso é a classe mais utilizada. Sabe-se também que, em relação ao elemento biológico para o uso da amperometria, as enzimas classificadas como oxidases são as mais encontradas nesse sistema. De uma maneira genérica, elas catalisam reações como a representada abaixo.



A detecção amperométrica pode ser feita oxidando o peróxido de hidrogênio formado durante a reação. Diversas estratégias estão sendo utilizadas para isso, como por exemplo, a utilização de sistemas bienzimáticos, onde uma segunda enzima catalisa a oxidação do peróxido, liberando elétrons que vão ser quantificados de forma conveniente. Por fim, os transdutores amperométricos medem o fluxo de corrente elétrica através de uma célula eletroquímica, submetida a um potencial constante. A corrente gerada pela reação redox do analito é diretamente proporcional à concentração de analito na superfície do eletrodo. O método amperométrico pode fornecer alta sensibilidade por análise de espécies eletroativas presentes numa amostra biológica (Chaubey et al., 2002). A maioria dos compostos biológicos não são eletroativos sendo necessário fazer uma combinação de forma a produzir um composto eletroativo. Este método de detecção basicamente envolve a aplicação de um potencial constante entre o eletrodo de trabalho ou um arranjo de eletrodos com seus respectivos eletrodos de referência que pode servir de eletrodo auxiliar, caso as correntes sejam baixas.

Estes biossensores constituem a classe mais utilizada e os mais típicos usam oxidases que catalisam reações do tipo:



Onde, geralmente, o oxigênio produzido é detectado pelo uso de um eletrodo de O_2 .

As principais desvantagens destes sensores é que apresentam uma faixa dinâmica pequena devido à cinética de saturação da enzima, os potenciais relativamente elevados podem oxidar outras espécies diferentes do composto de interesse e podem ocorrer alterações na corrente por vários fatores, tais como o próprio potencial de operação e a natureza do eletrodo.

Algumas inovações tem tentado superar estes problemas, como o uso de membranas limitantes de difusão para manter as concentrações de substrato abaixo dos níveis de saturação da enzima e o uso de mediadores de oxi-redução para regenerar a enzima durante a reação e para facilitar a transferência de elétrons da enzima para o eletrodo polarizado que também reduz o potencial necessário para a detecção do analito, evitando interferências (Coelho et al., 2008).

III.1.2.1.2. TRANSDUTOR POTENCIOMÉTRICO

O transdutor potenciométrico mede o potencial do eletrodo de trabalho em relação ao eletrodo de referência, funcionando sob condições de equilíbrio. O transdutor pode ser um íon seletivo (ISE) que é um sensor eletroquímico baseado em um filme delgado ou membrana seletiva como elemento de reconhecimento que detecta pela sensibilidade as alterações de potencial de eletrodo, quando o íon se liga a uma membrana trocadora apropriada (Thévenot et al., 1999). Esse tipo de transdutor, geralmente é utilizado para determinação e monitoramento de gases, tais como poluentes ambientais (Turner et al., 1987).

Os eletrodos de íons seletivos apresentam as vantagens de serem rápidos, sensíveis, de baixo custo e apresentarem simplicidade na medição, onde somente a medição do pH é necessária, não um sistema polarográfico como requerem os sensores amperométricos (Turner et al., 1987).

Biossensores potenciométricos tem sua medição afetada pela atividade de um dado íon em solução por isso espécies que podem formar complexos como o íon de interesse reduzindo sua atividade, devem ser removidos ou mascarados. Para isso é necessário usar uma solução tampão para forçar o controle iônico prevenindo variações na atividade do íon causadas por oxidação, redução ou formação de complexo. Embora estes sensores tenham uma ampla faixa de medida, apresentam inconvenientes de responder a outros contaminantes e tem uma limitação que é seu baixo limite de detecção (Karube et al, 2000).

III.1.2.1.3. TRANSDUTOR CONDUTIMÉTRICO

Biossensores condutimétricos medem a mudança de condutância entre um par de eletrodos metálicos como consequência de um componente biológico. Biossensor condutimétrico faz uso da mudança da condutância que resulta da geração do produto de uma reação enzimo-catalítica. A enzima é usualmente imobilizada na superfície do eletrodo, feitos de metais nobres, e uma interação específica com o analito leva a produção de espécies (quando o campo elétrico é aplicado) que modificam a condutância na camada enzimática (Cullen et al., 1999).

III.1.2.2. TRANSDUTOR ELETROMAGNÉTICO

Os transdutores eletromagnéticos estão fundamentados no fenômeno físico do eletromagnetismo (quando uma carga elétrica encontra-se estacionária, ou estática produz forças elétricas sobre as outras cargas situadas na mesma região do espaço; já quando está em movimento, produz também efeitos magnéticos).

Os efeitos elétricos dependem da posição e do movimento relativos das partículas carregadas. Os irmãos Currie demonstraram em 1880 que cristais de sal de Rochelle podiam produzir eletricidade quando submetidos a uma pressão e direção cristalográfica. Anos após, provaram que o efeito reverso poderia ser efetuado, isto é, produção de uma deformação pela aplicação de eletricidade. Esse efeito passou a ser conhecido como piezeletricidade (Ngeh-Ngwainbi et al., 1990).

Transdutores acústicos ou piezoelétricos são dispositivos de onda acústica, que operam no espectro de ultra-som. Nas faixas de frequência administradas, encontram-se as vibrações elásticas de certos materiais, incluindo os materiais piezelétricos naturais. Materiais cerâmicos e poliméricos sintetizados têm sido desenvolvido com propriedades piezelétricas. O fenômeno da piezeletricidade é próprio de cristais anisotrópicos, que não tem centro de simetria. A direção do dipolo é orientada por um eixo polar, quando um cristal desse tipo é colocado em situações de tensão, o dipolo é realinhado determinando o aparecimento de um campo elétrico. Também é possível aplicar um campo elétrico sobre o material piezelétrico provocando uma deformação, e estas variações mecânicas do cristal podem seguir as variações de direção da mesma maneira que a perturbação elétrica (efeito piezelétrico reverso) (Varela et al.,2000).

Portanto uma voltagem aplicada pode deformar mecanicamente um cristal. Quando uma voltagem é aplicada através das faces opostas, os cátions movem-se para o eletrodo negativo e os ânions para o eletrodo positivo. Uma voltagem aplicada faz com que se crie um campo elétrico que expande, na direção oposta, o cristal.

III.1.2.3. TRANSDUTOR ÓTICO

Devido a sua confiabilidade e grande variedade de técnicas, os métodos óticos de transdução física são muito usados em análises bioquímicas para quantificação de determinadas substâncias (Salgado, 2008).

Sistemas óticos de detecção estão sendo usados em sensores e biossensores (Kovacs et al., 2003) incluindo entre outros, elipsometria, espectroscopia, interferometria e ressonância de plasma de superfície (SPR). O princípio dos sensores óticos se baseia em que algumas reações enzimáticas alteram as propriedades óticas de determinadas substâncias e a luz emitida por estes elementos biológicos, ou sua resposta à iluminação, podem ser convenientemente monitoradas via fibra ótica ou outro equipamento ótico.

Segundo Kovacs et al. (2003), os métodos de absorção de luz se baseiam na propriedade das moléculas orgânicas de quando excitadas promoverem seus elétrons a outros níveis de energia. A fração de luz não absorvida pode ser detectada e usada para quantificar determinado analito baseada na relação entre absorvância e concentração expressa na Lei de Lambert-Beer descrita a seguir,

$$\text{Log} (I_0 / I) = \epsilon c L ,$$

Onde: I – intensidade da luz transmitida; I_0 – intensidade da luz incidente; ϵ - coeficiente molar de extinção; c – concentração da espécie; L – comprimento do caminho ótico.

Na construção do biossensor ótico o componente biológico pode ser imobilizado com um indicador ótico, que provoca uma mudança das propriedades óticas da solução analisada no momento em que ocorre a reação entre o componente biológico e o substrato de interesse. Isto possibilita que, mesmo que a reação biológica por si só não produza nenhuma alteração das propriedades óticas do meio, esta possa ser monitorada via transdutor ótico pelo uso do indicador (Salgado, 2008).

III.1.2.4. TRANSDUTOR CALORIMÉTRICO

A maioria dos processos bioquímicos envolve mudança de entalpia. Reações enzimáticas estão associadas com mudanças elevadas da entalpia molar. Os biossensores calorimétricos permitem este acompanhamento, embora tenham as

desvantagens de apresentarem alto custo, serem altamente complexos e terem baixa especificidade na análise, pois toda variação de entalpia ocorrida seja na reação de mistura ou pelo efeito da diluição e solvatação ou mesmo perda de calor para o exterior, contribui para o resultado final levando a possíveis erros de análise (Spink et al., 1976).

Dois tipos de técnicas tem sido desenvolvidas: calorimetria adiabática, que mede a ausência de trocas de calor entre a célula e o meio ambiente; e a calorimetria de condução de calor, que envolve a medida de transferência de calor da célula para a sua vizinhança (Bataillard et al., 1993).

Os compostos são imobilizados sobre a superfície ou na vizinhança de materiais sensíveis a temperatura (transdutores calorimétricos) (Bataillard et al., 1993). Um dos campos mais promissores de aplicação de biossensores calorimétricos é a biotecnologia.

III.2. MÉTODOS DE IMOBILIZAÇÃO DO ELEMENTO BIOLÓGICO

A grande maioria dos biossensores utiliza o componente biológico imobilizado e a escolha adequada da técnica de imobilização é de extrema importância, pois desta dependerá uma maior conversão por parte do componente biológico e um maior tempo de estabilidade do sensor desenvolvido.

Para a escolha do método de imobilização deve-se levar em consideração vários fatores, tais como a natureza e características do componente biológico, o tipo de transdutor utilizado e sobretudo as condições operacionais da análise. Deve-se observar a adaptabilidade, confiabilidade e o alto grau de pureza do método como características imprescindíveis. A adaptabilidade garante que o método de imobilização seja aplicável tanto a enzimas, como microorganismos, anticorpos, tecidos, mantendo a atividade e a estabilidade do componente biológico após a sua fixação à matriz de suporte (Salgado, 2008).

A pureza do método é importante pois apenas pequenas quantidades do componente biológico são utilizadas durante a imobilização, devendo-se assim garantir a não existência de outras substâncias que possam interferir na análise. Além disso, deve-se evitar a presença de outros componentes biológicos que catalisem reações que gerem produtos detectáveis pelo transdutor escolhido (Salgado, 2008).

Estas características garantem a boa estabilidade do componente biológico no meio ambiente de amostra e a manutenção do seu alto grau de especificidade, evitando sua contaminação ou biodegradação, tentando fazer com que o componente biológico possa exibir uma atividade quando imobilizado, comparável à sua atividade em solução.

As técnicas de imobilização são divididas em 2 grupos principais:

1. Métodos que não envolvem ligação covalente ao suporte. Esses métodos são baseados em adsorção, encapsulamento físico da enzima por forças de Van der Waals ou ligação iônica.

2. Métodos baseados na ligação covalente da enzima ao suporte, através da reação entre os grupos funcionais da proteína e do suporte. Os grupos funcionais disponíveis são principalmente originários dos aminoácidos. Eles incluem, por exemplo, os grupos amino da lisina, carboxílicos do ácido aspártico e do ácido glutâmico e grupos sulfidril da cisteína.

Os procedimentos mais utilizados na imobilização de componentes biológicos variam entre si pelo tipo de ligação estabelecida entre o componente e a matriz de imobilização. Quatro procedimentos principais são utilizados, especialmente na imobilização de enzimas: adsorção física, encapsulamento, reticulação ou ligação cruzada e ligação covalente.

Na Figura 6 temos um esquema dos métodos de imobilização dessas enzimas.

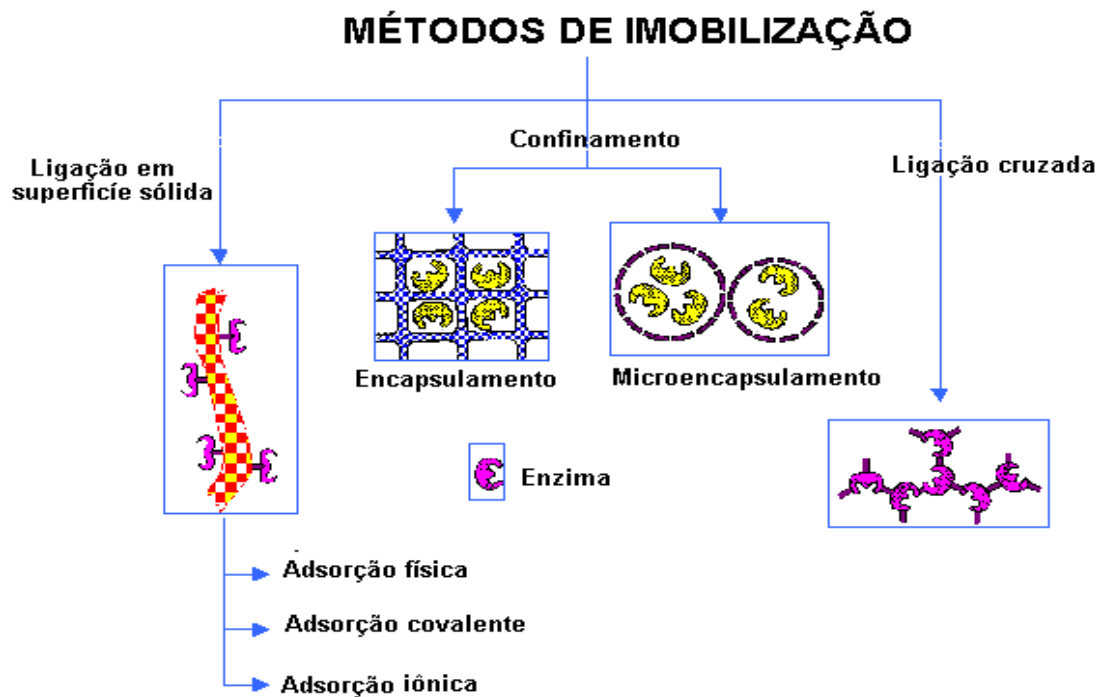


FIGURA 6 - MÉTODOS DE IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMAS (FONTE: [HTTP://WWW.ENQ.UFSC.BR](http://www.enq.ufsc.br)).

III.2.1. ADSORÇÃO FÍSICA

A adsorção é o processo pioneiro e mais simples de se fixar um elemento biológico em um eletrodo. Consiste basicamente da exposição, em geral por imersão, do eletrodo na solução. Pode também envolver a deposição desta solução, por exemplo, com o auxílio de uma micropipeta, sobre a superfície do eletrodo, com posterior evaporação do solvente (Coelho et al, 2008).

Embora os primeiros estudos envolvendo adsorção tenham utilizado eletrodos de platina, a maioria dos trabalhos subsequentes foram realizados com eletrodos de carbono. O procedimento de imobilização por adsorção normalmente não requer o uso de reagentes químicos e envolve espécies não reativas não havendo, portanto, nenhuma modificação do biocomponente. No entanto estes métodos são muito suscetíveis a mudanças ambientais, tais como: pH, temperatura, força iônica, ou mesmo à presença do substrato e apresentam baixa estabilidade (Silva, 2010).

III.2.2. ENCAPSULAMENTO OU APRISIONAMENTO EM GEL

Um caminho muito utilizado para a imobilização de elementos biológicos é a oclusão em gel. Uma solução contendo o biocomponente é usada na preparação do gel polimérico como amido, borracha, nylon, poliacrilamida, sílica, alginato de cálcio, agarose, polietileno glicol, entre outros, ficando o biocomposto aprisionado dentro da matriz de gel que se forma tendo este tamanho de poro de 100-400 nm. O aprisionamento do biocomposto é feito em uma rede tridimensional, sendo mantido no seu estado natural sem risco de bloqueio dos seus sítios ativos, grupos ou moléculas na ligação química, mantendo a sua estabilidade por várias semanas (Coelho et al, 2008).

As maiores desvantagens deste método são: a formação de grandes barreiras difusionais ao transporte de substrato e produto, principalmente aos de alto peso molecular, levando ao retardamento da reação. A outra desvantagem é a possibilidade da enzima se lixiviar da rede polimérica e ainda o decréscimo da resposta eletroquímica devido às propriedades não condutoras do gel (Coelho et al, 2008).

III.2.3. MICROENCAPSULAMENTO

Membranas inertes de porosidade de 300 µm (celulose, policarbonato, colágeno, politereftalato, polímeros em geral) são usadas para encapsular o biocomposto no transdutor. Fornece um acoplamento do biocomponente com o transdutor adaptável, seguro e bem fechado, mantendo a estabilidade e atividade das enzimas (Coelho et al, 2008).

III.2.4. LIGAÇÃO CRUZADA

Método que envolve o uso de agentes bifuncionais, em geral diaminas alifáticas ou glutaraldeído, que induzem a auto-reticulação das enzimas,

resultando assim na formação de uma rede tridimensional de moléculas de enzima. É um método caro e ineficiente visto que parte do material biológico inevitavelmente atuará principalmente como suporte, o que implicará na perda da atividade enzimática. A formação de barreiras difusionais ao substrato ou ao produto e a carência de rigidez ou de resistência mecânica tornam o método ainda mais insatisfatório (Salgado, 2008).

III.2.5. LIGAÇÃO COVALENTE

Este é o tipo de método mais empregado na imobilização de biocomponentes, em especial de enzimas. Envolve a ligação do biocomposto a matriz de imobilização por meio de grupos funcionais nucleófilos presentes em cadeias laterais de aminoácidos que formam a enzima e que não são essenciais a sua atividade catalítica (Coelho et al., 2008).

A ligação covalente se dá pela ligação de grupos - NH₂, -COOH, -OH, -SH, entre outros, a matrizes como vidro, cerâmica, polímeros sintéticos, celulose, nylon e alumina, preferencialmente em condições fisiológicas brandas, baixa temperatura, baixa força iônica, pH ótimo e muitas vezes na presença do substrato, a fim de proteger o sítio ativo da enzima evitando que haja diminuição da atividade da mesma quando imobilizada. Este método garante que dificilmente a enzima se desprenderá do seu suporte durante o uso, ou seja, a não reversibilidade do método pela ação do pH, força iônica ou substrato. São estáveis por vários meses (4 a 14 meses). A maior desvantagem é a possibilidade da enzima se tornar inativa, em parte ou totalmente, quando a ligação se dá nos sítios ativos da mesma (Coelho et al., 2008).

III.2.6. CONSIDERAÇÕES FINAIS SOBRE OS MÉTODOS DE IMOBILIZAÇÃO

Grande parte dos biossensores utilizam técnicas de imobilização em membranas incluindo nylon, teflon, polietileno, polipropileno, acetato de

celulose, que na maior parte das vezes apresentam problemas difusionais, ocasionando baixa sensibilidade e longo tempo de resposta já que o substrato tem maior dificuldade de difundir através da espessa membrana. O Quadro 5 apresenta as vantagens e desvantagens de possíveis métodos de imobilização.

QUADRO 5 - FORMAS DE IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMAS, SUAS VANTAGENS E DESVANTAGENS (FONTE: ADAPTADO DE COELHO ET AL., 2008).

MÉTODO	VANTAGEM	DESVANTAGEM
Encapsulamento	Tratamento brando do biocatalisador; Inalteração química do componente biológico; Especificidade mantida;	Aplicação para baixas composições; Alta resistividade para difusão do produto e do substrato; Perda contínua do catalisador;
Ligação cruzada	Usado junto com o encapsulamento para evitar perdas do biocatalisador;	Tratamento severo do biocatalisador com reagentes tóxicos; Ligação covalente entre moléculas de proteína e não entre proteína e suporte;
Adsorção em suporte inerte	Tratamento brando do biocatalisador; Não há modificação do biocatalisador; Matriz pode ser regenerada;	Ligações muito fracas; Influência de condições do meio (pH e temperatura);
Ligação covalente	Baixa resistência difusional; Ligação forte do elemento com a matriz; Não afetado pelas condições adversas do meio;	Pode envolver reagente tóxicos; Matriz não regenerável;

Avanços nesta área vêm sendo realizados com a descoberta dos chamados polímeros condutores, que além de atuarem como matrizes de imobilização ainda auxiliam na condutividade dos elétrons ao detector. Estes polímeros possuem propriedades tais como condutividade elétrica, baixa energia de transição ótica, baixo potencial de ionização e alta afinidade eletrônica. Uma representação esquemática pode ser vista na Figura 7.

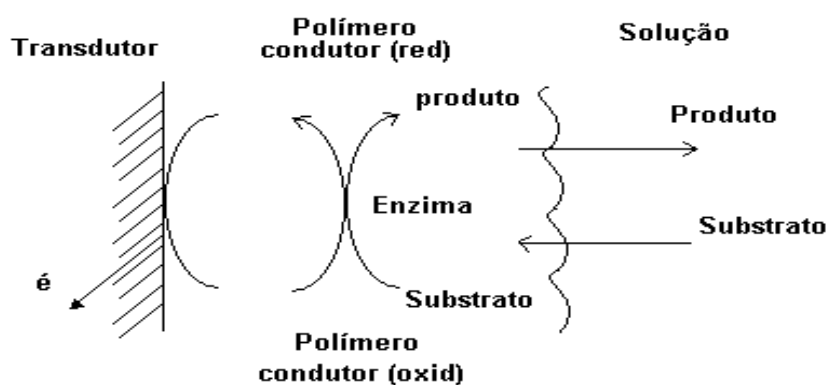


FIGURA 7 - FUNCIONAMENTO DE UM POLÍMERO CONDUTOR NO BIONSSENSOR (FONTE: SEGNI, 2003).

III.4. PARÂMETROS DE DESEMPENHO

Como em qualquer sensor baseado em reconhecimento molecular, a caracterização da resposta obtida pelos biossensores deve ser realizada. É ainda mais importante neste caso, já que os parâmetros de operação podem indicar qual a etapa limitante do processo e facilitar a otimização do biossensor.

Os biossensores, para serem considerados eficientes, devem apresentar resultados satisfatórios em determinados parâmetros registrados durante o seu funcionamento. Estas variáveis são conhecidas como parâmetros de desempenho e é a partir delas que se estuda a viabilidade da implementação de um biossensor em um determinado processo e se compara o desenvolvimento de tecnologias para o biossensoreamento. A seguir, baseando-se em Thévenot et al. (1999), Salgado (2008) e Alhadeff (2005), são descritas as definições de cada um dos parâmetros e o que observa-se para quantificar o seu desempenho.

ACURÁCIA E PRECISÃO

É uma característica estatística, ligada ao desvio padrão da amostra de resultados obtidos durante a análise.

CUSTO

Ser de menor custo frente aos métodos analíticos convencionais, tais como HPLC, CG e espectrometria de massa.

ESTABILIDADE OPERACIONAL

A resposta do biossensor pode variar em função de vários fatores como: geometria do sensor, método de preparo, assim como, receptores e transdutores usados. Depende da difusão externa e interna do substrato, e das condições operacionais de trabalho (concentração analito, temperatura, pH, tampão, presença de solventes orgânicos e outras substâncias e composição da solução matriz que contém a amostra).

FAIXA DE SENSIBILIDADE

É a faixa de concentração mensurável, ou seja, que gera resposta com confiabilidade.

FREQÜÊNCIA DE AMOSTRAGEM

É o número de análises que pode ser realizado em um determinado intervalo de tempo.

REPRODUTIBILIDADE

É a medida da dispersão ou flutuação em uma série de medidas obtidas ao longo de um período de tempo para concentração de um analito dentro de uma faixa de utilização.

SELETIVIDADE

É a característica relacionada à capacidade que certas macromoléculas biológicas possuem em discriminar diferentes substratos. É originada devido as diferenças de conformações geradas pela estrutura quaternária das proteínas. Para caracterizar esse parâmetro é importante ser realizada uma análise de

interferentes com os possíveis analitos que também geram resposta do biossensor.

TAMANHO

É a capacidade de apresentar portabilidade e pequeno tamanho, permitindo a sua fácil instalação no ambiente de medida. Em algumas áreas como no caso da área médica estes biossensores são miniaturizados, sendo considerados como componentes ligados à nanotecnologia.

TEMPO

É relacionado ao TEMPO DE RESPOSTA, TEMPO DE RECUPERAÇÃO (tempo que antecede uma nova análise, isto é, o tempo necessário para que após uma primeira medição o biossensor esteja pronto para analisar uma outra amostra, não devendo ser muito longo) e TEMPO DE VIDA ÚTIL (tempo em que o biossensor está apto para proceder algumas análises, e geralmente é determinado pela instabilidade do material biológico).

CAPÍTULO IV – ANÁLISE PROSPECTIVA

Os estudos prospectivos são importantes ferramentas para a Gestão da Ciência e Tecnologia. Entre muitos possíveis usos, eles podem indicar ameaças ao desenvolvimento tecnológico, apontando demanda por tecnologias. Dentre as ferramentas possíveis de serem utilizadas para a análise prospectiva, as buscas em bases de dados de artigos e patentes foram as selecionadas. As bases de dados Scopus, Scifinder e ISIWebofKnowledge serviram de fonte para os artigos, enquanto as bases de dados USPTO, ESPACENET e INPI serviram de fonte para as patentes.

IV.1. METODOLOGIA

Para artigos científicos, os dados foram obtidos empregando-se como palavras-chave: "ethanol biosensor" e "alcohol oxidase" na primeira busca e "ethanol biosensor" e "alcohol dehydrogenase" na segunda, dentro do intervalo compreendido entre janeiro de 2000 e dezembro de 2010. Ambas as buscas foram feitas de modo a conter as palavras-chave no título, resumo ou no texto. No caso

das patentes, foram realizadas três buscas nas bases USPTO e ESPACENET, empregando, respectivamente, as palavras-chave: "Biosensor" (no resumo) e "ethanol" (todos os campos), "Determination of ethanol" (resumo) e "Biosensor" (resumo) e "ethanol" (resumo); e uma busca no INPI, empregando as palavras-chave "Biossensor etanol". O intervalo de busca não foi restrito. Com os resultados gerados em mãos, foram realizadas análises em relação ao ano e aos países de publicação do artigo/patente, tipos de transdutor empregado, tipos de materiais empregados no eletrodo, forma de imobilização da enzima, principais enzimas utilizadas e condições operacionais.

IV.2. RESULTADOS

IV.2.1. ANÁLISE DE DEPÓSITO DE PATENTES

Realizadas as buscas, foram selecionadas 15 patentes pertinentes ao assunto Biossensor para detecção de etanol. Apesar de os depósitos começarem a ser realizados no ano de 1989, a quantidade até os dias de hoje ainda é relativamente pequena. Na Figura 8 podemos visualizar a evolução histórica desses depósitos de patentes.

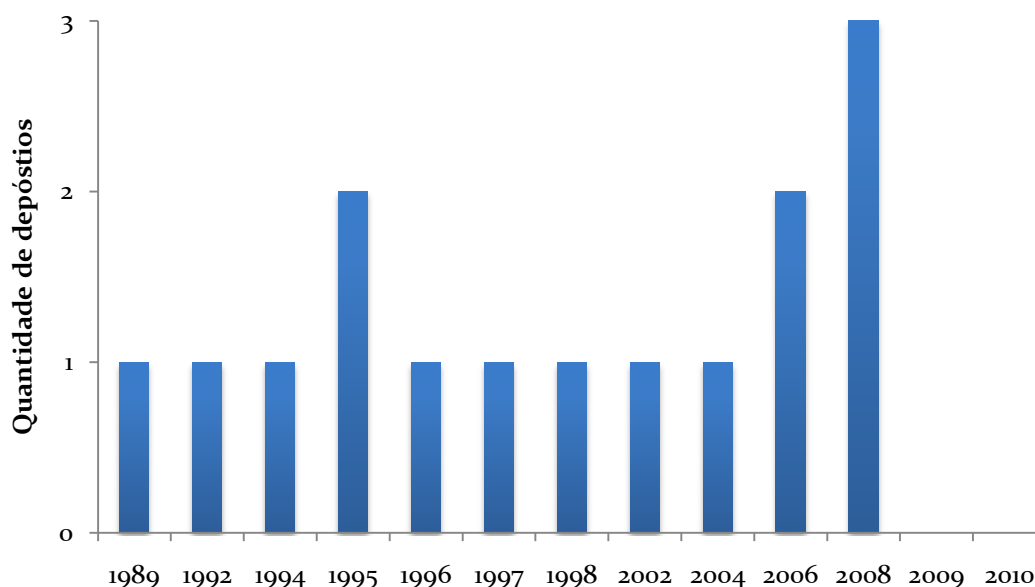


FIGURA 8 - SÉRIE HISTÓRICA DE DEPÓSITO DE PATENTES DE BIOSSENSORES PARA ETANOL (FONTE: ELABORAÇÃO PRÓPRIA).

Analisando a Figura 8, fica evidente que o número de depósitos de patentes relacionados ao tema biossensor para detecção de etanol é extremamente pequeno.

Os EUA desponta como o país com o maior número de patentes depositadas – 6 de um total de 15 – seguido da China, com 3, e Coréia do Sul e Japão, com 2 patentes cada. Podemos ainda observar que o Canadá e o Brasil também realizaram depósitos e, portanto também possuem projetos de pesquisa e desenvolvimento de biossensores para detecção de etanol, como também pôde ser notado pelo número de artigos encontrados. A Figura 9 mostra a distribuição dos depósitos em função do país de origem.

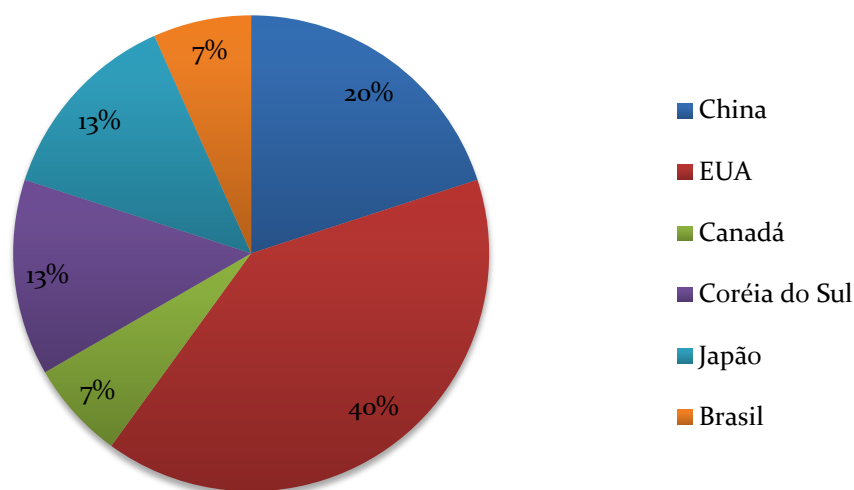


FIGURA 9 - DISTRIBUIÇÃO DOS DEPÓSITOS DE PATENTES EM RELAÇÃO AO PAÍS DE ORIGEM (FONTE: ELABORAÇÃO PRÓPRIA).

Em síntese, observa-se que os EUA é o país detentor do maior número de tecnologias consolidadas para a elaboração de um biossensor de etanol.

O método de detecção de etanol mais utilizado nos biossensores é o eletroquímico. Nele, a concentração do analito de interesse é correlacionada, de diferentes formas possíveis, com a liberação de elétrons nas reações catalíticas. A

proporção entre os diferentes métodos utilizados está representada na Figura 10, anteriormente exposta.

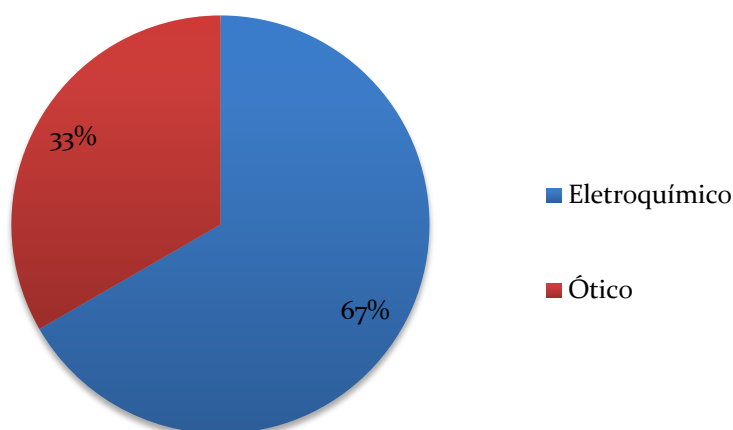


FIGURA 10 - DISTRIBUIÇÃO DOS TIPOS DE TRANSDUTORES UTILIZADOS EM BIOSENSORES, BASEADO EM DEPÓSITO DE PATENTES (FONTE: ELABORAÇÃO PRÓPRIA).

Apesar do número limitado de patentes depositadas relacionadas ao desenvolvimento de um biossensor de etanol, o método de detecção eletroquímica encaminha-se para se tornar o mais promissor, devido à eficiência e a relevância dos resultados obtidos nos critérios de desempenho destes biossensores.

IV.2.2. ANÁLISE DE PUBLICAÇÃO DE ARTIGOS CIENTÍFICOS

Analisadas as patentes, dirigimos agora o foco para a análise de artigos científicos, muito mais complexa e extensa, por ser o reflexo dos inúmeros estudos de instituições de pesquisas em busca de uma solução ótima para o desenvolvimento dos biossensores de etanol. Esta solução ótima exige uma combinação adequada de métodos de detecção, materiais empregados nos eletrodos, métodos de imobilização das enzimas nos eletrodos, entre outros.

Com base na metodologia empregada, foram selecionados 115 artigos, datados de janeiro de 2000 a dezembro de 2010, para que fossem analisados detalhadamente. O número crescente de publicações demonstra o grande interesse no assunto, tanto por parte das instituições de pesquisas quanto pelos órgãos de fomento. A Figura 11 descreve essa evolução histórica, explicitando essa tendência.

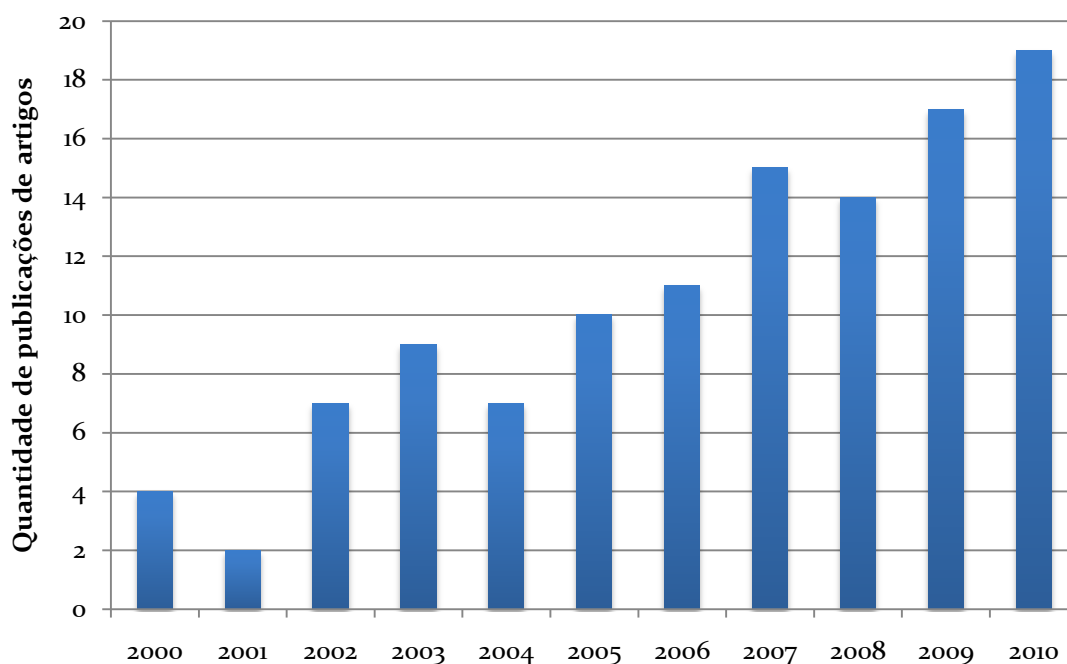


FIGURA 11 - SÉRIE HISTÓRICA DE PUBLICAÇÕES DE ARTIGOS CIENTÍFICOS RELACIONADAS AO TEMA BIOSSENSOR PARA ETANOL (FONTE: ELABORAÇÃO PRÓPRIA).

Atualmente inúmeros métodos para a determinação de etanol estão disponíveis, como a cromatografia gasosa, a cromatografia líquida de alta eficiência e espectroscopia de infravermelho. Entretanto, essas técnicas analíticas encontram barreiras como a dificuldade de operação, a perda de sensibilidade e a necessidade de instrumentos de elevado custo. Estas barreiras são as maiores incentivadoras dos estudos de desenvolvimento de biossensores de etanol e as responsáveis pela crescente publicação de artigos (Shkotova et al, 2006).

Dentre os vinte e cinco países que buscam desenvolver tecnologias nesta área, a China desponta com um total de 27 artigos, seguida pela Lituânia, Alemanha, Espanha, Suécia e EUA.

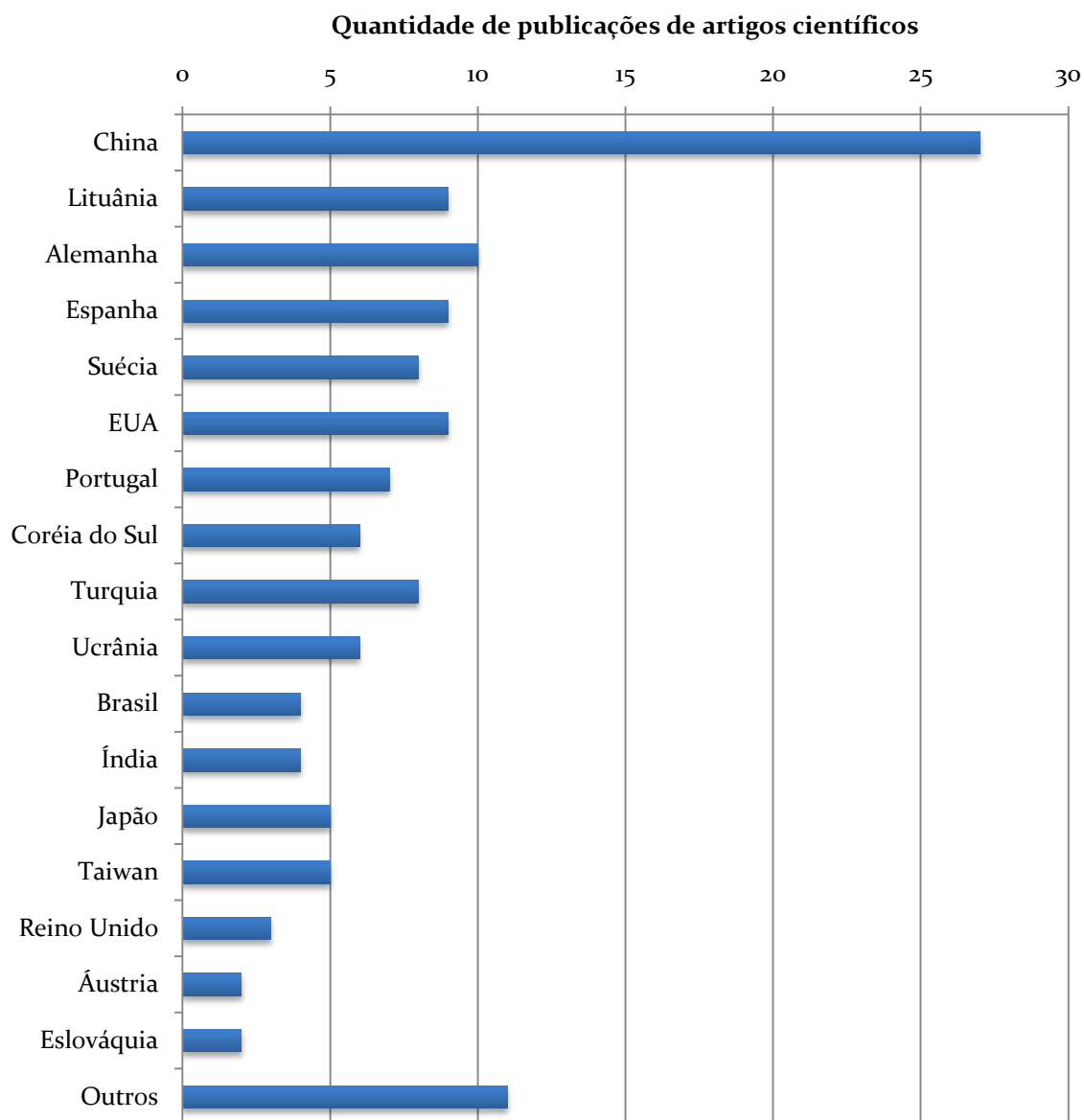


FIGURA 12 - DISTRIBUIÇÃO DE PUBLICAÇÕES DE ARTIGOS CIENTÍFICOS POR PAÍSES (FONTE: ELABORAÇÃO PRÓPRIA).

Fica claro que a China, com 27 publicações de artigos referentes ao tema, investe muito em pesquisas tecnológicas. Em 2010, o valor desses investimentos chegou a quase 2% do imenso PIB chinês, de 6 trilhões de dólares. No Brasil, os

investimentos em pesquisas tecnológicas em 2010, não chegou a 0,35% do seu PIB. Seguindo com a análise dos artigos, é importante demonstrar a tendência dos tipos de transdutores utilizados, pois, como já notado durante a análise de patentes, os biossensores eletroquímicos são, e tendem a ser cada vez mais, o grande alvo de pesquisa no desenvolvimento de biossensores para etanol. A Figura 13 demonstra a distribuição dos métodos e em seguida é feita uma análise mais detalhada do porquê desta discrepância.

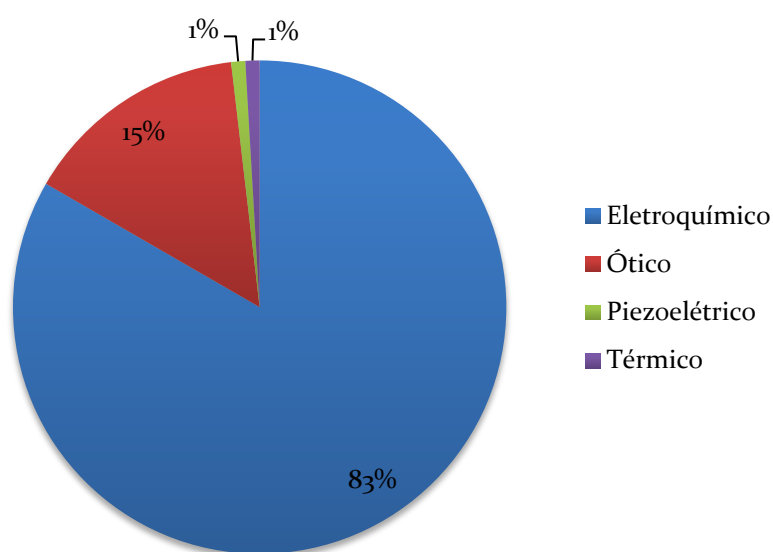


FIGURA 13 - DISTRIBUIÇÃO DOS ARTIGOS POR TIPO DE TRANSDUTOR UTILIZADO (FONTE: ELABORAÇÃO PRÓPRIA).

É relevante começar a explicação citando as vantagens dos biossensores eletroquímicos frente aos outros métodos, já que estes se encontram em extrema maioria. Inicialmente, podemos citar o avanço no estudo da teoria e desenvolvimento de tecnologia no campo da eletroquímica, principalmente na área de instrumentação, com programas cada vez mais elaborados. A utilização de controle computadorizado dá a possibilidade de medição e análise em tempo real, e no caso de sistemas em fluxo, permite inclusive uma monitoração on-line (Brett, 2001).

Outro aspecto relevante da utilização do método eletroquímico é o fato da escolha do material (ou da combinação de materiais) do eletrodo permitir uma maior seletividade, imprescindível nos eletrodos potenciométricos. Já em relação

aos sensores amperométricos essa escolha também se torna importante, uma vez que é possível minimizar problemas de interferentes, obtendo maior seletividade e especificidade nas análises.

Ainda, a utilização de métodos eletroquímicos de detecção possibilita a miniaturização de sensores, para que estes possam ser empregados em situações em que outras técnicas não são viáveis. Isso, aliado com o avanço da nanotecnologia, torna-se uma realidade imediata, e de grande foco de muitos pesquisadores atualmente, como será explicitado mais adiante (Brett, 2001).

Desta forma, as características mais importantes que tornam os biossensores eletroquímicos o alvo de maiores estudos são a sensibilidade, a seletividade, a estabilidade, a precisão, a resposta rápida, a facilidade de uso, o baixo custo relativo e a robustez (Thévenot et al, 1999).

Explicadas as razões para o crescente interesse nos biossensores eletroquímicos, cabe fazer um levantamento mais específico da forma que a resposta eletroquímica é mensurada. Desta forma, podemos classificar estes biossensores em: amperométricos, potenciométricos e condutimétricos. A Figura 14 mostra essa distribuição relativa.

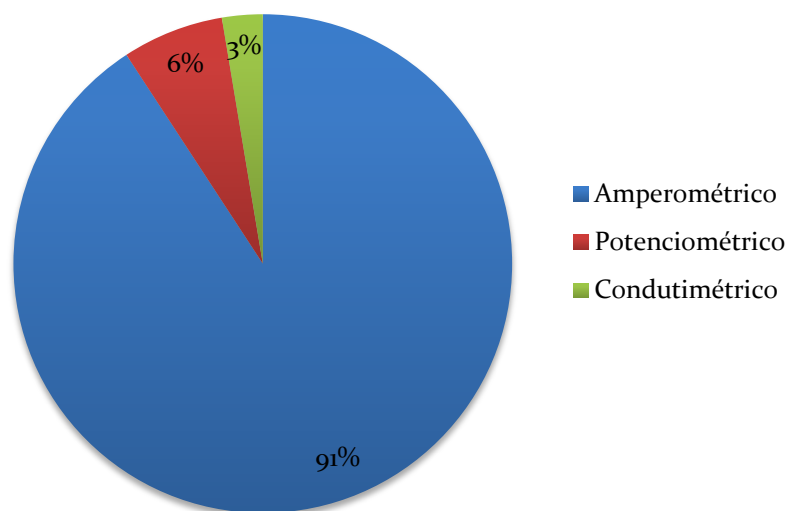


FIGURA 14 - DISTRIBUIÇÃO DOS ARTIGOS POR TIPO DE TRANSDUTOR ELETROQUÍMICO UTILIZADO (FONTE: ELABORAÇÃO PRÓPRIA).

Mais uma vez, um único tipo desponta como o de maior interesse de investigação e as razões disso devem ser analisadas. Os biossensores eletroquímicos amperométricos, abrangem mais de 90% dos estudos descritos nos artigos científicos levantados durante a prospecção.

Colocada as tendências da utilização de transdutores e da forma que a resposta eletroquímica é mensurada, é importante caracterizar os estudos de diferentes materiais para a construção de um eletrodo visando o desenvolvimento de um biossensor eletroquímico para detectar e quantificar etanol. A Figura 15 a seguir demonstra esta distribuição, e em seguida, baseando-se neste resultado, um novo mapa (Figura 16) relata tipo de eletrodo de carbono mais utilizada nos instrumentos.

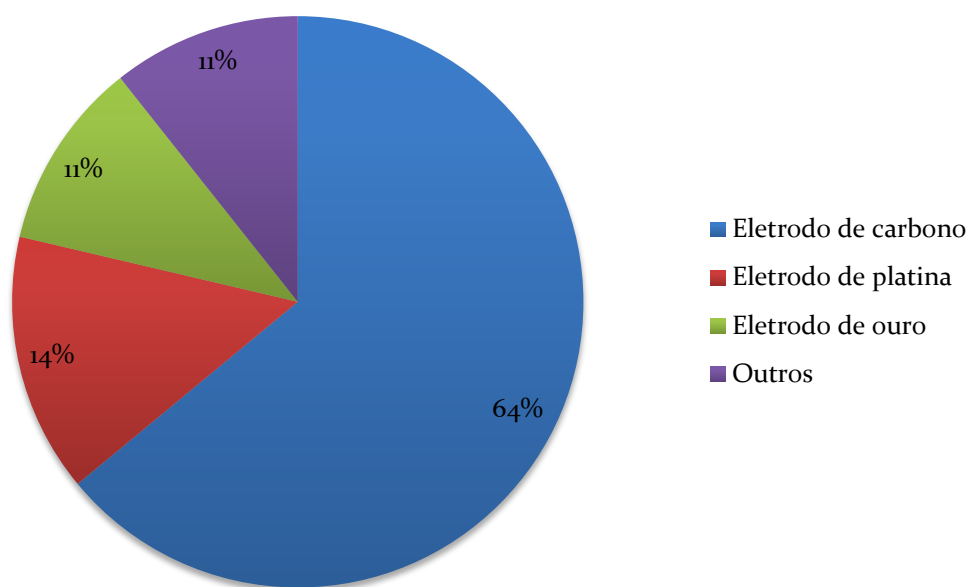


FIGURA 15 - DISTRIBUIÇÃO DOS ARTIGOS POR TIPOS DE ELETRODOS UTILIZADOS (FONTE: ELABORAÇÃO PRÓPRIA).

Com 64% do total de artigos científicos relacionados a biossensores de etanol, os eletrodos de carbono revelam ser o atual material mais eficaz para gerar respostas eletroquímicas que podem ser relacionadas com a concentração de etanol em determinada amostra. Entretanto, não existe apenas uma forma de

carbono utilizada na construção destes eletrodos, e por isso, se faz necessário discriminá-las para avaliar a tendência mais específica.

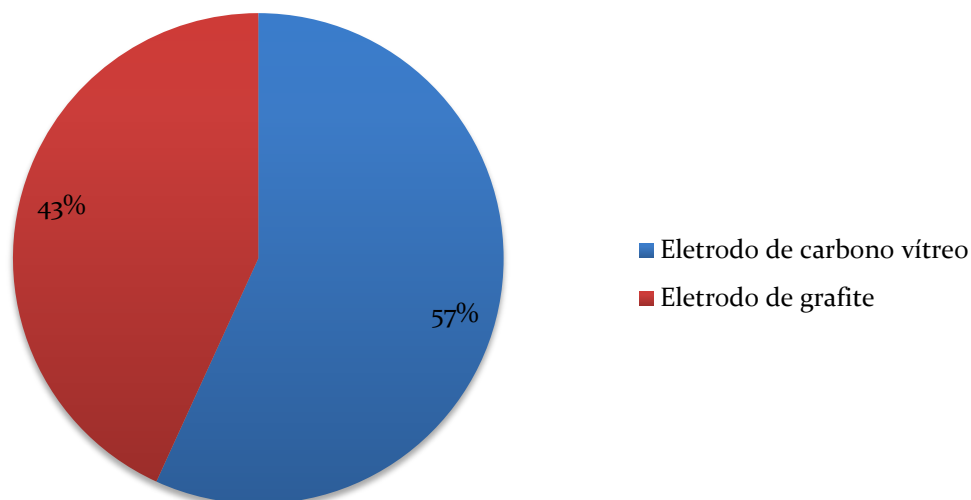


FIGURA 16 - DISTRIBUIÇÃO RELATIVA DOS TIPOS DE ELETRODOS DE CARBONO MAIS UTILIZADOS (FONTE: ELABORAÇÃO PRÓPRIA).

Como já citado anteriormente, a modificação de eletrodos é uma alternativa eficiente para otimizar a operação dos biossensores e, como pode ser visto na Figura 17, existem diversas metodologias utilizadas para esse fim. Dentre os diferentes métodos, observa-se uma enorme variedade de materiais que estão sendo utilizados para realizar essa modificação.

A primeira vista, parece incoerente uma categoria denominada “outros” abranger 38% das modificações dos eletrodos, sem ao menos especificá-las. Porém, dentre esses outros materiais utilizados, nenhum se repete mais de duas vezes nos estudos realizados, revelando que este campo é, e ainda será, alvo de inúmeras pesquisas e tentativas de elaboração de compósitos que tornem a resposta gerada o mais fidedigna possível quando comparada com outros métodos que não o biossensores. Exemplos desses materiais são: polipirrol, politiofenos, tetratiofulvaleno, azul de metileno, verde de metileno, polidiaminobenzeno, polianilina, entre outros. Os resultados obtidos durante

estes estudos utilizam sempre os parâmetros de desempenho descritos anteriormente para testar as novas modificações e quantificar de alguma forma o desempenho do biossensor desenvolvido.

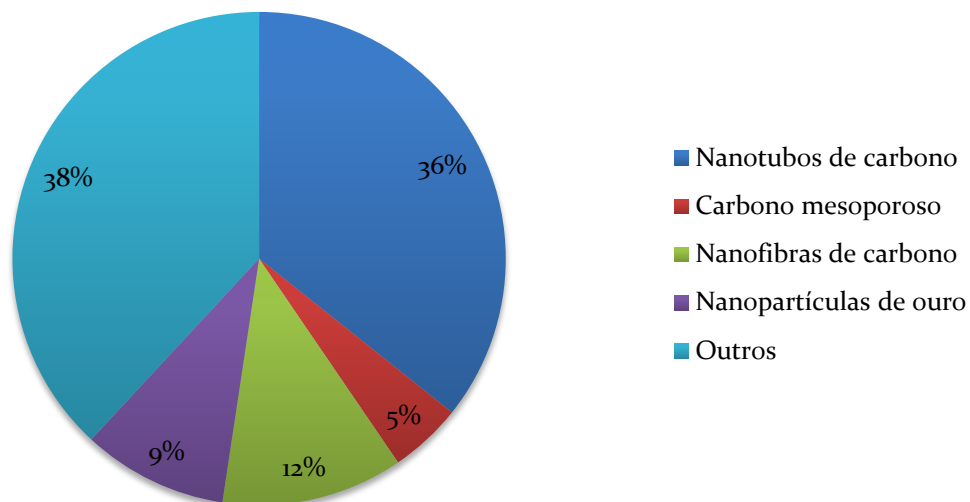


FIGURA 17 – MODIFICAÇÕES DE ELETRODOS DE CARBONO MAIS UTILIZADAS NOS BIOSENSORES PARA ETANOL (FONTE: ELABORAÇÃO PRÓPRIA).

A Figura 18 apresenta a distribuição das publicações de artigo quanto sua classificação em relação ao componente biológico utilizado.

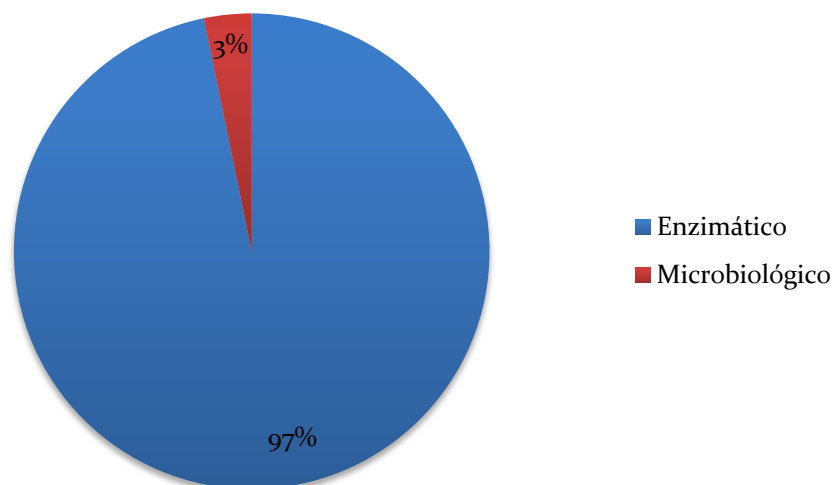


FIGURA 18 - TIPOS DE BIOSENSORES QUANTO AO ELEMENTO BIOLÓGICO (FONTE: ELABORAÇÃO PRÓPRIA).

Um outro detalhamento importante neste estudo prospectivo é a metodologia adotada para a imobilização da(s) enzima(s) utilizadas nos biossensores enzimáticos, apresentado na Figura 19, que são a grande maioria, como pode ser visto na Figura 18, apresentada anteriormente.

Para este detalhamento, uma pesquisa e uma concomitante classificação e padronização das referências aos métodos de imobilização, foram realizadas para podermos visualizar e finalmente prever uma tendência, que podem ser considerada as soluções ótimas atualmente.

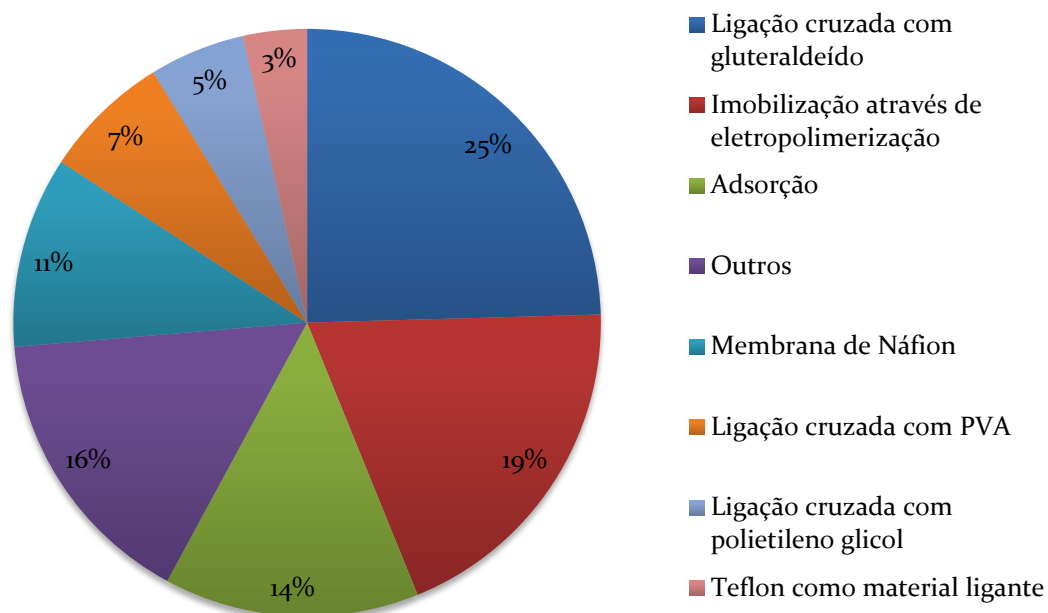


FIGURA 19 - DISTRIBUIÇÃO DOS DIFERENTES TIPOS DE IMOBILIZAÇÃO DAS ENZIMAS USADAS NO BIOSENSOR (FONTE: ELABORAÇÃO PRÓPRIA).

Observando o mapa anterior, podemos dizer que existem 4 metodologias para a imobilização da(s) enzima(s) que vêm sendo empregadas com mais frequência para a construção de biossensores de etanol. É importante citar que o emprego da técnica mais correta é de fundamental importância para o bom funcionamento e, principalmente, para a viabilização econômica do instrumento sensor, já que a imobilização propicia a reutilização da enzima, aumenta a faixa de estabilidade

em relação ao pH e temperatura e, ainda, diminui a interferência de inibidores e ativadores.

Dentre os principais métodos utilizados para imobilizar a(s) enzima(s), vemos que a predominância é daqueles que utilizam um suporte sólido, funcionalizado ou não, para a ligação da molécula, seja por ligação química (covalente ou iônica) ou por ligação puramente física (como a adsorção). Uma outra técnica com resultados relevantes é a ligação cruzada, principalmente utilizando como agente o glutaraldeído. Esta metodologia tem a vantagem de não causar impedimento estérico do substrato por uma matriz, porém podem ocorrer ligações no suporte através do sítio ativo da enzima, tornando-a inativa.

O outro grande grupo de métodos para imobilização de enzima em eletrodos pode ser chamado de confinamento e é representado pelas técnicas em que se promove o aprisionamento da enzima em uma matriz, em um cápsula ou ainda em uma microcápsula. Isso pode ser exemplificado pela utilização de Náfon, que promove um aprisionamento da molécula em uma matriz, e ainda a imobilização através de eletropolimerização, onde, através da aplicação de um potencial, inicia-se a polimerização de um monômero – existem inúmeros em estudo – em solução junto com a enzima para que esta fica aprisionada na matriz polimérica resultante. Dentre as principais vantagens desta técnica, destaca-se a manutenção da integridade da molécula aprisionada.

Sabe-se que as duas enzimas utilizadas como catalisadores específicos nas reações que geram respostas eletroquímicas em um biossensor de etanol são a álcool desidrogenase (ADH) e a álcool oxidase (AOD). Inicialmente os estudos de desenvolvimento destes biossensores eram baseados majoritariamente na ADH como catalisador da reação de conversão do etanol em acetaldeído, com a geração de NADH, que podia ser detectado amperometricamente aplicando um potencial adequado. Porém, além deste tipo de sistema requerir a regeneração contínua do cofator NAD^+ , era necessário a aplicação de um potencial elevado para a oxidação do NADH e a consequente detecção da corrente gerada. Já os sistemas que empregam a AOD como catalisador têm a vantagem de não

necessitar da regeneração de seu cofator – FAD – e ainda utilizar outros métodos, que não a aplicação de um sobrepotencial elevado, para a oxidação do produto da reação (peróxido de hidrogênio), como por exemplo, a co-imobilização de uma peroxidase para catalisar esta reação oxidativa e gerar uma corrente mensurável.

O maior problema da aplicação de um sobrepotencial elevado é a possível oxidação de outras espécies presentes em solução, tornando a resposta suscetível à erros. Para qualificar e quantificar estes problemas se faz necessário uma análise de interferentes, testando-os como analito do instrumento sensor e verificando sua resposta eletroquímica. A Figura 20, demonstra a proporção entre o uso da álcool oxidase e da álcool desidrogenase nos estudos de desenvolvimento do biossensor para etanol à partir de 2007.

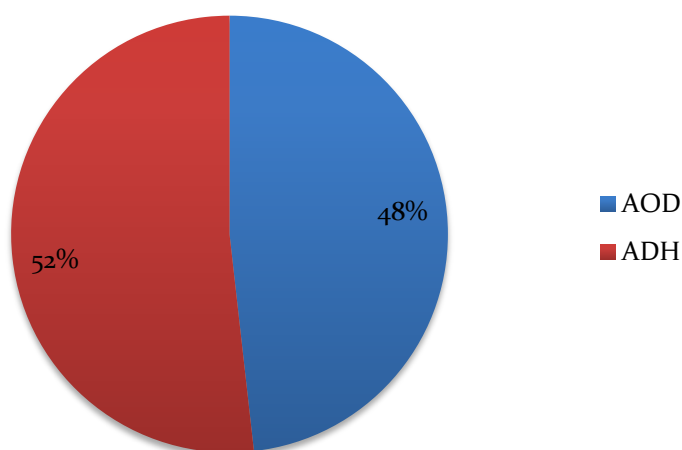


FIGURA 20 - DISTRIBUIÇÃO RELATIVA DAS ENZIMAS UTILIZADAS NOS BIOSSENSORES DE ETANOL (FONTE: ELABORAÇÃO PRÓPRIA).

Apesar do uso da álcool desidrogenase aparecer na maioria dos estudos, uma análise da série histórica do uso das duas enzimas revela que a tendência é a utilização da álcool oxidase como catalisador no desenvolvimento destes biossensores, como revela a Figura 21.

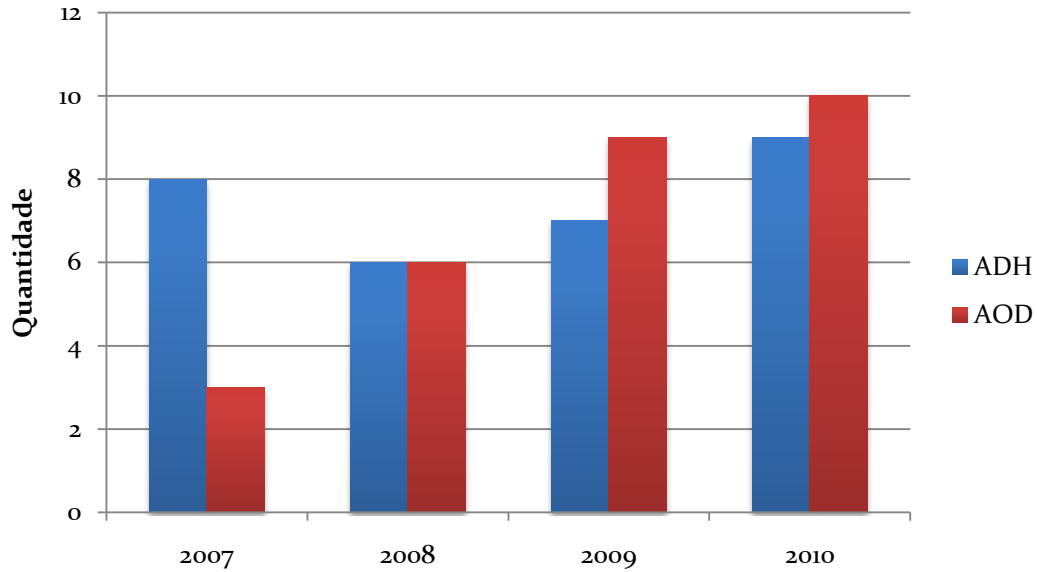


FIGURA 21 - USO DAS POSSÍVEIS ENZIMAS EM RELAÇÃO AOS ANOS (FONTE: ELABORAÇÃO PRÓPRIA).

Durante o processo de desenvolvimento de um biossensor, algumas pesquisas se preocupam com a otimização das condições operacionais do instrumento. Esta etapa se mostra particularmente importante quando se utilizam novos tipos de materiais para a construção do eletrodo, diferentes tipos de imobilização e ainda a utilização de enzimas pouco estudadas ou sistemas bienzimáticos. Como se sabe, cada enzima possui uma faixa ótima de temperatura e pH, que varia com diversos fatores. Dentre os mais importantes estão a origem do extrato enzimático, ou seja, de qual microorganismo a enzima foi obtida, e aonde e como a enzima foi imobilizada, já que nessas condições observamos grandes alterações da estabilidade e atividade enzimática em relação a sua forma livre.

Posto isso, procurou-se avaliar as condições ótimas mais observadas durante o processo de otimização, de um espaço amostral mais restrito de artigos que preocuparam-se em elaborar um planejamento experimental seguindo uma metodologia científica apropriada. É importante ter em mente que esses resultados não significam uma verdade absoluta em termos de tendência, já que, como citado, a origem da enzima e sua imobilização no eletrodo, gera uma gama de possibilidades de condições ótimas.

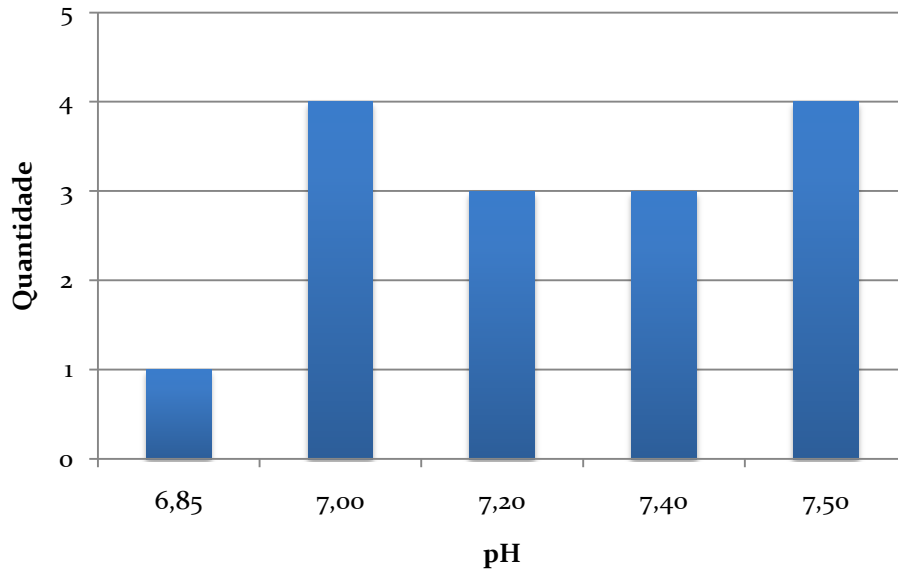


FIGURA 22 – DISTRIBUIÇÃO DAS CONDIÇÕES DE pH MAIS UTILIZADAS (FONTE: ELABORAÇÃO PRÓPRIA).

Observa-se através da Figura 22 que apesar de haver uma variação no pH ótimo de operação do biossensor para detecção de etanol, todos se encontram próximo da neutralidade ou ainda com o pH neutro.

Para a determinação da temperatura ótima de operação do biossensor, procede-se da mesma forma, aplicando-se uma metodologia de planejamento experimental. A dificuldade na construção de um equipamento capaz de controlar a temperatura enquanto ocorre o biossensoreamento, diminui ainda mais o espaço amostral de artigos que propuseram uma otimização em termos de temperatura. Os resultados analisados se encontram na Figura 23 e, da mesma forma que a otimização do pH ótimo, não podemos ter a análise realizada como verdade absoluta e norte para todos os tipos de projetos de P&D relacionado ao tema.

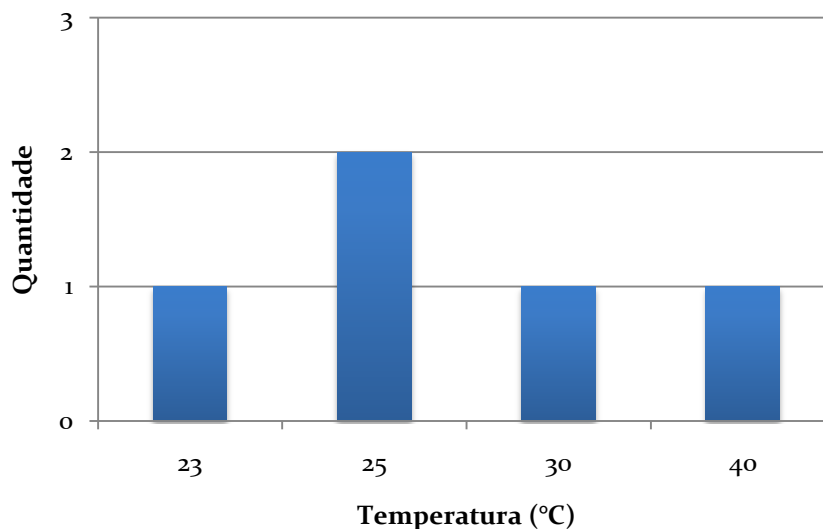


FIGURA 23 - DISTRIBUIÇÃO DAS CONDIÇÕES DE TEMPERATURA MAIS UTILIZADAS (FONTE: ELABORAÇÃO PRÓPRIA).

IV.2.3. ANÁLISE DE ARTIGOS EM RELAÇÃO A NANOTECNOLOGIA

Nos últimos anos, as propriedades únicas e o potencial tecnológico de vários nanomateriais, particularmente nanomateriais de carbono, tem atraído crescente interesse. Nanomateriais de carbono possuem excelente condutividade elétrica, propriedades estruturais e catalíticas únicas, boa estabilidade química e mecânica e excelente capacidade de adsorção e penetrabilidade. Ainda, sua funcionalização tem sido uma estratégia eficaz para aumentar sua solubilidade, alcançando seu potencial em um amplo campo de aplicação (Wu et al., 2007).

Devido a essas características, os nanomateriais de carbono são excelentes candidatos como materiais para eletrodo, pois além de suas excepcionais propriedades eletroquímicas, suas propriedades estruturais o tornam bons candidatos como suporte de imobilização. Isso é efetivamente notado ao analisarmos o número de artigos que menciona o uso da nanotecnologia com o avanço dos anos, como pode ser visto na Figura 24.

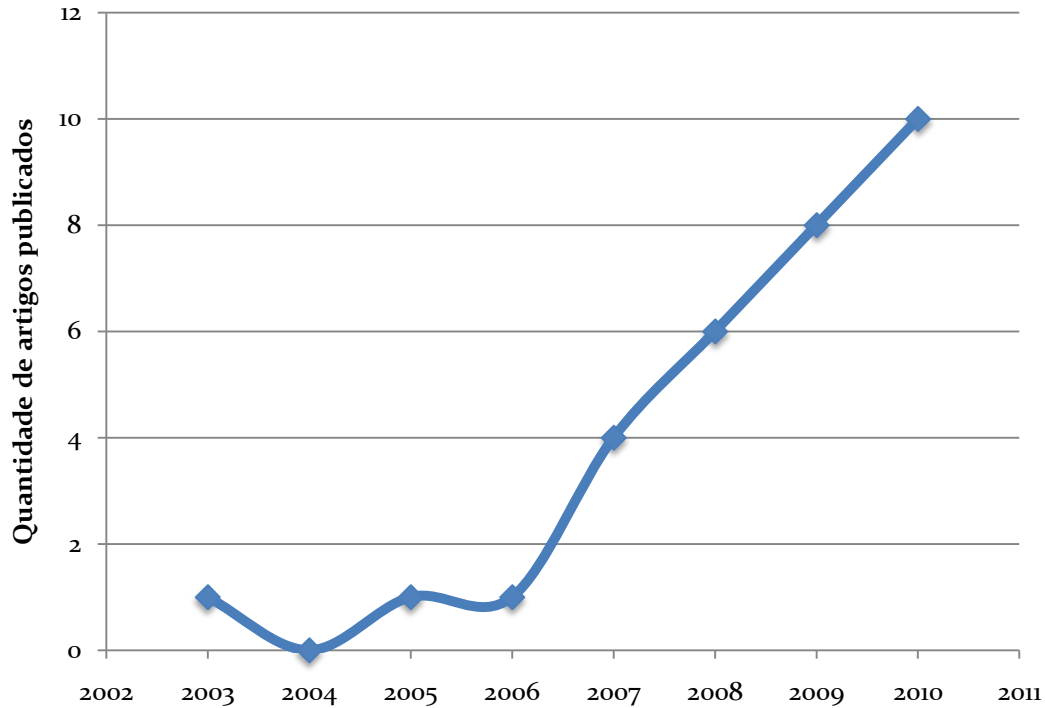


FIGURA 24 - SÉRIE HISTÓRICA DO USO DA NANOTECNOLOGIA NO DESENVOLVIMENTO DE BIOSSENSORES PARA ETANOL (FONTE: ELABORAÇÃO PRÓPRIA).

A análise de tendência mostra um crescimento que é melhor descrito por perfil exponencial, evidenciando o rumo a ser seguido no desenvolvimento de novos biossensores. Como principais causas, destacam-se as propriedades destes materiais, já citadas anteriormente, e o domínio da obtenção, manipulação e funcionalização de materiais nanoestruturados devido ao intenso e crescente estudo da nanotecnologia nos dias atuais. Como consequência, deve ser citada a miniaturização dos dispositivos, cada vez mais compactos e eficientes.

Dentre os eletrodos que utilizam a nanotecnologia em sua construção ou ainda em sua modificação, verificamos que existem três possíveis diferentes materiais usados na construção de um biossensor para detecção de etanol. A Figura 25 identifica esses materiais e mostra a proporção relativa de uso.

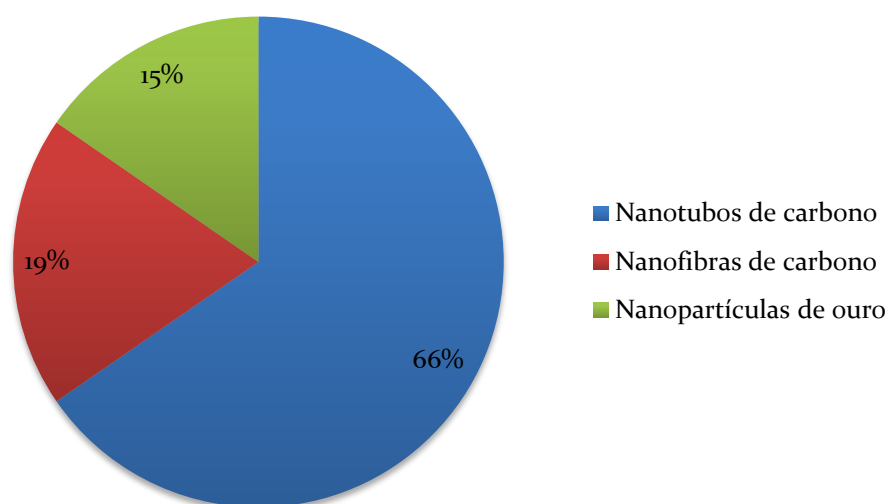


FIGURA 25 - DISTRIBUIÇÃO RELATIVA DOS TRÊS TIPOS DE MATERIAIS NANOTECNOLÓGICOS USADOS NOS BIOSSENSORES PARA ETANOL (FONTE: ELABORAÇÃO PRÓPRIA).

Na Figura 26, observamos que em 2010 o número de artigos publicados em que a nanotecnologia é empregada passou da metade do número de artigos publicados total.

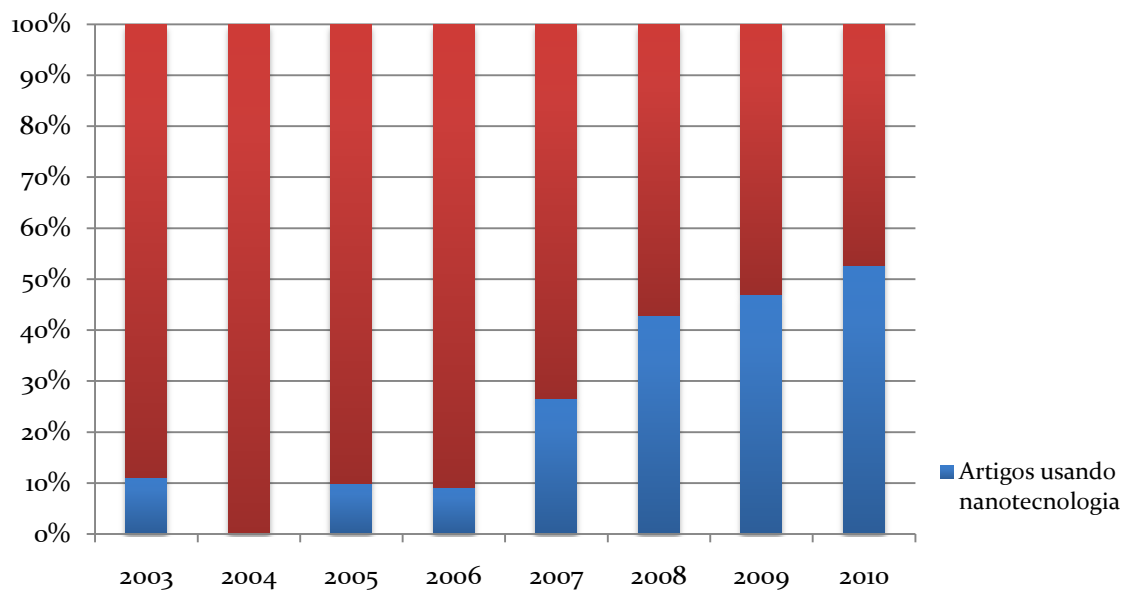


FIGURA 26 - DISTRIBUIÇÃO RELATIVA DE ARTIGOS UTILIZANDO A NANOTECNOLOGIA (FONTE: ELABORAÇÃO PRÓPRIA).

CAPÍTULO V – TENDÊNCIAS

Este capítulo tem como objetivo abordar as principais tecnologias reveladas como tendência durante a prospecção tecnológica. O uso da nanotecnologia é explicado com mais detalhes, enfatizando ainda mais a utilização de nanotubos de carbono, sua funcionalização e seu uso em biossensores. Em seguida, detalha-se as duas formas de carbono utilizadas como material base dos eletrodos. Também é realizada uma análise mais minuciosa do método de imobilização mais encontrado durante os estudos prospectivos: a ligação cruzada. Por último, falamos sobre as alternativas tecnológicas para atingir uma resposta dos biossensores com o mínimo de interferência possível, o que torna o biossensor mais eficaz.

V.1. A NANOTECNOLOGIA

O rápido avanço da nanociência e nanotecnologia fez com que uma grande variedade de materiais nanoestruturados, com propriedades óticas, elétricas, magnéticas e catalíticas únicas, fossem desenvolvidos. Nanoestruturas – estruturas com no mínimo uma dimensão entre 1 a 100 nm – tem atraído crescente interesse devidos às suas características e seu potencial de aplicação (Daniel et al., 2004).

A dimensionalidade exerce uma papel crucial na determinação das propriedades do material, como por exemplo, as diferentes formas em que os elétrons interagem em estruturas 3D, 2D, 1D e 0D. Comparadas com nanoestruturas 0D (quantum dots e nanopartículas) e 2D (filmes finos), nanoestruturas 1D (incluindo nanotubos de carbono e nanofios) são ideais como sistemas modelo para investigação da dependência do transporte de elétrons e de propriedades mecânicas, assim como para várias potenciais aplicações, incluindo materiais compósitos, eletrodos, nanoeletrônicos e sensor em nanoescala (Lieber et al., 1996).

Em comparação com nanopartículas, entretanto, a integração de nanoestruturas 1D com elementos biológicos tem sido lenta até recentemente, por apresentar dificuldades associada a síntese e fabricação desses materiais com dimensões muito bem controladas, a morfologia, a pureza e a composição química. Ao passo que melhores técnicas são desenvolvidas, nanoestruturas 1D deve encontrar um extenso campo de aplicação na construção de dispositivos em nanoescala, como os biossensores, que combinam propriedades condutivas e semi-condutivas dos nanomateriais com o reconhecimento do elemento biológico (Lieber et al., 1996).

Devido a elevada razão superfície volume das nanoestruturas 1D, a variação da sua condutância elétrica para espécies adsorvidas é sensível o suficiente para se chegar a detecção de apenas uma molécula (Lieber et al., 1996).

V.1.1. NANOTUBOS DE CARBONO

Nanotubos de carbono é uma nova classe de nanomateriais 1D de carbono descoberta em 1991 por Iijima. Suas extraordinárias propriedades mecânicas bem como suas propriedades elétricas únicas tem estimulado extensas atividades de pesquisa pelo mundo afora, resultando em muitos artigos científicos e livros sobre o assunto (Dresselhaus et al., 2004).

Estruturas compreendendo apenas um tubo cilíndrico são chamados de “single-walled carbon nanotube” (SWCNT). SWCNT’S possuem um diâmetro relativamente pequeno – em torno de 4 nm – e podem ter características metálicas ou semi-condutoras, dependendo de suas estruturas. Estruturas que contém uma quantidade de tubos cilíndricos concêntricos com uma espessura entre as camadas constante, de aproximadamente 0,34 nm, são chamadas “multi-walled carbon nanotubes” (MWCNT’S). MWCNT’S têm um diâmetro relativamente grande, variando de poucos nanômetros até dezenas de nanômetros, e são materiais com características condutoras (Baughman et al., 2002). Na Figura 27 vemos representações de CNT’s e MWCNT.

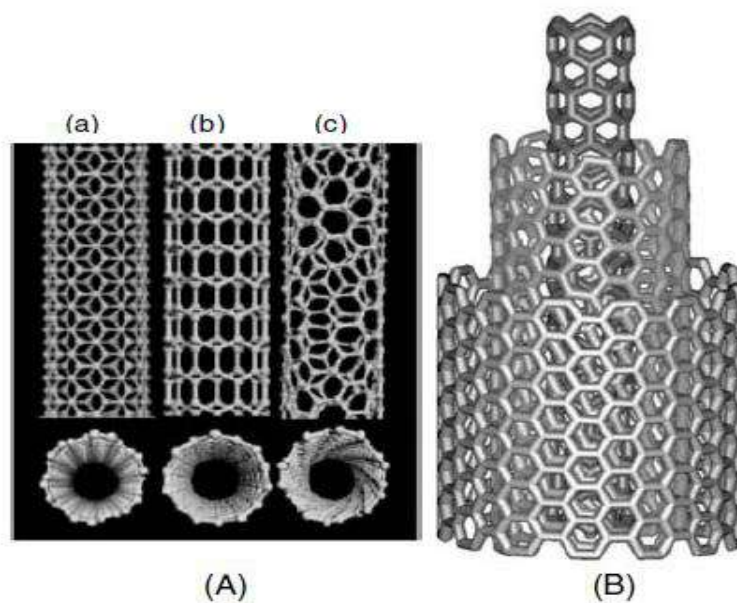


FIGURA 27 - (A) ILUSTRAÇÃO ESQUEMÁTICA DE CNT’S (A) ARMCHAIR, (B) ZIG-ZAG E (C) SWCNT QUIRAL. (B) ILUSTRAÇÃO ESQUEMÁTICA DE MWCNT (FONTE: BALASUBRAMANIAN ET AL., 2005).

Nanotubos de carbono apresentam inúmeras propriedades extraordinárias, incluindo propriedades mecânicas, óticas, térmicas e químicas. Seu módulo de Young chega a 1 Terapascal, sua força de tensão fica em torno de 200 Gigapascal e sua condutividade térmica pode ultrapassar 3000 W/mK. CNT's possuem alta estabilidade química e podem ser funcionalizados, ou seja, é possível anexar uma variedade de grupos atômicos e moleculares em suas estruturas (Baughman et al., 2002).

O desafio atual é controlar a síntese dessas nanoestruturas de forma que permita que as potenciais aplicações dos nanotubos de carbono sejam exploradas. Por exemplo, um crescimento padronizado e alinhado dos nanotubos, com estrutura, dimensão e morfologia controladas.

V.1.2. FUNCIONALIZAÇÃO DE NANOTUBOS DE CARBONO PARA USO EM BIOSENSORES

A integração da biologia e de materiais em nanoescala tem um potencial de revolucionar a nanobiotecnologia. As propriedades elétricas dos CNT's são muito sensíveis a transferência de carga superficial e mudanças no ambiente a sua volta, e drásticas mudanças podem ser causadas pela interação de uma única molécula. Para controlar as propriedades químicas e físicas dos CNT's para uso em biossensores, é de suma importância o desenvolvimento de técnicas de funcionalização dos mesmos (Someya et al., 2003).

É bem conhecido que a modificação química da superfície de nanomateriais geralmente é necessária para gerar funcionalidade e biocompatibilidade desses materiais. Particularmente, a funcionalização de nanotubos de carbono com diferentes componentes biomoleculares pode introduzir unidades funcionais, como sítios de reconhecimento, elementos catalíticos ou grupos bioativos, os quais são essenciais para várias aplicações. Para promover um fácil acesso das biomoléculas ao CNT no procedimento de funcionalização, é vantajoso realizar a solubilização do mesmo (Burda et al., 2005).

Existem inúmeras técnicas para biofuncionalização de nanotubos de carbono, incluindo modificação covalente e não-covalente. CNT's podem ser funcionalizados por várias biomoléculas através de adsorção espontânea ou através de imobilização (Burda et al, 2005). Na Figura 28 podemos observar cinco tipos de funcionalização de nanotubos de carbono.

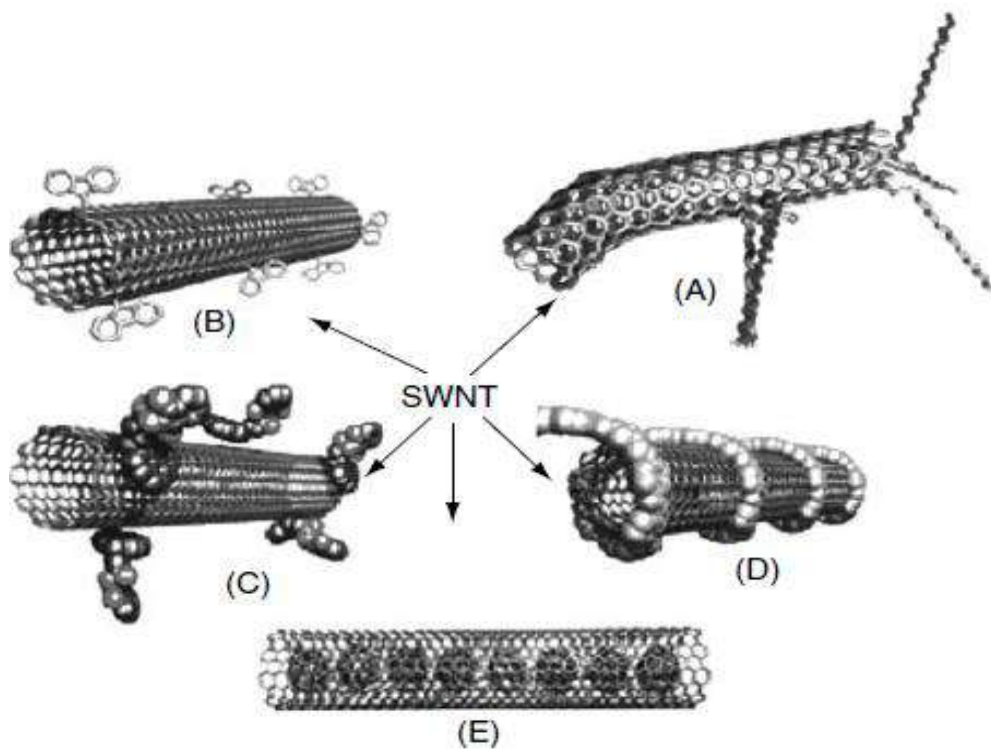


FIGURA 28 - (A) FUNCIONALIZAÇÃO "DEFECT GROUP", (B) FUNCIONALIZAÇÃO COVALENTE, (C) FUNCIONALIZAÇÃO EXOÉDRICA NÃO-COVALENTE COM SURFACTANTE, (D) FUNCIONALIZAÇÃO EXOÉDRICA NÃO-COVALENTE COM POLÍMEROS, E (E) FUNCIONALIZAÇÃO ENDOÉDRICA COM C₆₀ (FONTE: HIRSCH, 2002).

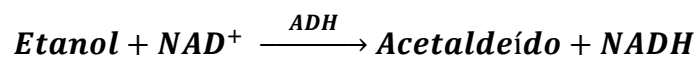
Uma variedade de proteínas, como anticorpos, enzimas e peptídeos, podem ligar-se não especificamente a superfície externa dos CNT's. Oligonucleotídeos também pode ligar-se não especificamente a superfície e a cavidade aberta dos nanotubos. A ligação covalente de biomateriais a CNT's é importante para atingir-se as especificações requeridas para a aplicação dos nanotubos em biossensores (Azamian et al., 2002).

V.1.3. BIOSSENSORES ELETROQUÍMICOS BASEADOS EM NANOTUBOS DE CARBONO

O primeiro estudo da possível aplicação de nanotubos de carbono como material de eletrodo foi realizado por Britto et al. em 1996. Um eletrodo de MWCNT modificado foi construído. O estudo de voltametria cíclica em tampão fosfato (pH=7,4) revelou uma oxidação da dopamina a dopaminaquinona com reversibilidade ideal. Esses resultados obtidos com MWCNT foram superiores aos observados anteriormente utilizando eletrodos comuns de carbono.

Seguindo a demonstração científica do aumento da eletroatividade dos eletrodos de nanotubos de carbono modificado, Davis et al., em 1998, estudou as propriedades eletroquímicas de eletrodos de MWCNT modificado com enzimas redox imobilizadas. Foram obtidas respostas voltamétricas reprodutíveis e com um comportamento ideal tanto com o citocromo c quanto com uma proteína azul de cobre, azurina. Esses resultados demonstraram a possibilidade de aplicação de nanotubos de carbono em dispositivos biossensores.

Wang et al, em 2003, reportaram pioneiramente a construção de eletrodos de nanotubos de carbono modificados para a detecção de NADH aplicando-se um baixo potencial. NADH é um cofator envolvido em centenas de reações enzimáticas catalisadas por desidrogenases $NAD^+/NADH$ dependentes, como no exemplo abaixo:



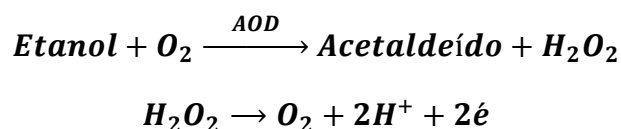
O NADH produzido pela reação enzimática é eletroquimicamente detectado. Problemas associados com a detecção anódica de NADH são o alto sobrepotencial requerido para sua oxidação em eletrodos de carbono comuns e o “fouling” da superfície devido ao acúmulo dos produtos da reação. Por isso,

esforços consideráveis estão sendo empregados para o desenvolvimento de novos materiais para eletrodos que reduzem o sobrepotencial exigido para a oxidação de NADH.

Wang et al, em 2003, reportou um biossensor amperométrico para detecção de etanol baseado em nanotubos de carbono co-imobilizando álcool desidrogenase e NAD^+ na matriz de um compósito de nanotubos de carbono e Teflon. Os resultados obtidos atingiram as expectativas de boa seletividade e sensibilidade.

Wang et al, em 2003, reportaram um enorme aumento da atividade electrocatalítica dos nanotubos de carbono para a oxidação de peróxido de hidrogênio. Eles desenvolveram um eletrodo com nanotubos de carbono modificado com Náfion que ofereceu um decréscimo significativo na sobrevoltagem para oxidação do peróxido, o que permitiu uma detecção amperométrica sob baixo potencial conveniente.

Embora um eletrodo de carbono vítreo não exiba atividade redox para H_2O_2 em uma ampla faixa de potencial, um eletrodo de nanotubos de carbono exibe uma corrente de oxidação ou redução significativa começando em torno de +0,20 V. Esta descoberta pioneira abriu as portas para a preparação de biossensores electroquímicos utilizando enzimas oxidases, como na equação a seguir.



O peróxido de hidrogênio liberado pela reação enzimática é sensivelmente detectado em um eletrodo com nanotubos de carbono, o que permite a construção de um biossensor amperométrico altamente sensível (Wang et al., 2003).

V.2. ELETRODOS DE CARBONO

O carbono por apresentar diferentes alótropos, diferentes microtexturas (de maior ou menor ordem), diferentes níveis de grafitação, uma variedade de dimensionalidade (de 0 a 3D) e existir em diferentes formas (pó, fibras, espumas e compósitos), se apresenta como um material muito atrativo em aplicações eletroquímicas. Os eletrodos de carbono são facilmente polarizáveis, entretanto, sua condutividade elétrica é extremamente dependente do tratamento térmico utilizado, de sua microtextura, hibridização e número de héteroátomos presentes na estrutura. Além disso o caráter anfótero do carbono permite o uso das propriedades eletroquímicas desse material tanto como doador como receptor de elétrons (Frackowiak, 2001).

Durante os últimos anos, um grande interesse tem sido focado na utilização de materiais a base de carbono como eletrodos. Esse material possui estabilidade química em diferentes meios (básicos até extremamente ácidos), capacidade de operação em uma ampla faixa de temperatura e possui métodos de ativação que permitem o desenvolvimento de estruturas com controle da área superficial e distribuição dos poros, que determinam a interface eletrodo/eletrólito para aplicações eletroquímicas (Bachtold et al., 2000).

As reações eletroquímicas são, normalmente, mais lentas em carbono que em eletrodos metálicos, sendo que a cinética de transferência do elétron depende da estrutura e preparação da superfície do eletrodo. O carbono tem uma atividade superficial elevada. Ligações com hidrogênio, grupos hidroxila e carboxila, e algumas vezes quinonas, podem ser formadas na superfície do carbono. A presença desses grupos implica que o comportamento desses eletrodos seja sensível ao pH. A presença destes grupos funcionais também vem sendo usada para modificar a superfície do eletrodo, com o objetivo de obter novas propriedades (Segnini, 2003).

V.2.1. ELETRODOS DE CARBONO VÍTREO

Vários tipos de carbono são usados como eletrodos, dentre eles o carbono vítreo, as fibras de carbono, carbono amorfo e grafite. O mais utilizado é o carbono vítreo, que possui alta estabilidade térmica, alta resistência a ataques químicos, bem como poros de pequenas dimensões, e ainda se caracteriza como um material praticamente impermeável a gases e líquidos. Estas características fazem do carbono vítreo um ótimo eletrodo inerte, onde entre os diferentes tipos de pré-tratamento visando melhorar a sua performance eletroquímica destacam-se o polimento mecânico, a ultra-sonificação, tratamento térmico á vácuo, irradiação com laser e o pré-tratamento eletroquímico (Dekanski et al., 2001). Na Figura 29 podemos ver uma estrutura de carbono vítreo.



FIGURA 29 - FOTO DE UMA ESTRUTURA DE CARBONO VÍTREO (FONTE: [HTTP://WWW.FEM.UNICAMP.BR/~LEE/INFRA_ESTRUT.HTM](http://www.fem.unicamp.br/~lee/infra_estrut.htm)).

A estrutura do carbono vítreo foi debatida durante muito tempo. Modelos estruturais recentes assumem que encontramos hibridização sp^2 e sp^3 em sua estrutura, porém hoje já é conhecido que o carbono vítreo é 100% sp^2 (Dekanski et al., 2001).

É importante citar que o carbono vítreo não deve ser confundido com o carbono amorfo. Segundo a IUPAC: “Carbono vítreo não pode ser descrito como carbono amorfo porque ele consiste de uma estrutura em duas dimensões e não

exibe ligações pendentes”. A Figura 30 representa esquematicamente o plano basal do carbono vítreo sob visão frontal e lateral.

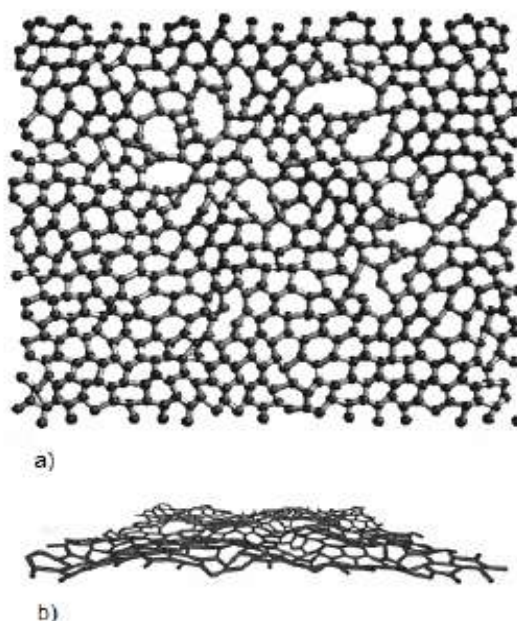


FIGURA 30 – REPRESENTAÇÃO ESTRUTURAL ESQUEMÁTICA DE UM PLANO BASAL DO CARBONO VÍTREO. (A) VISÃO FRONTAL DO EIXO C; (B) VISÃO LATERAL DO EIXO B (FONTE: OAMALLEY, 1998).

V.2.2. ELETRODOS DE GRAFITE

Os eletrodos de grafite, também conhecidos como eletrodos de pasta de carbono, consistem em preparações envolvendo grafite em pó e óleo mineral ou alguma outra resina, como epóxi.

Os eletrodos de pasta de carbono (EPC) são exemplos de modificação utilizando compósitos. As pastas de carbono consistem em uma mistura homogênea de grafite em pó e um líquido orgânico hidrofóbico (óleo mineral, óleo de parafina, óleo de silicone, etc.) colocados em um tubo de vidro ou plástico. A sua superfície é facilmente renovada, uma vez que a camada mais externa pode ser removida, por lixamento ou corte. O aglutinante, cuja função é dar consistência à mistura e também preencher os interstícios entre as partículas de grafite, deve ser eletroinativo, quimicamente inerte, imiscível com a água, apresentar baixa volatilidade e não conter impurezas (Svancara et al., 2009).

A principais vantagens do eletrodo de grafite são o baixo custo e facilidade de preparação, baixo ruído, corrente residual baixa, ampla janela de operação em solução aquosa e a possibilidade de renovação da superfície. Na literatura são relatados vários trabalhos utilizando EPC, por exemplo na determinação de flavonóides, traços de metais e peróxido de hidrogênio e etanol (Varma et al., 2002).

V.3. IMOBILIZAÇÃO COM LIGAÇÃO CRUZADA

Os parâmetros cinéticos da enzima álcool oxidase dependem fortemente dos métodos de imobilização, como afirmado por Dmytruk et al (2007): K_M aumenta de 1,5 mM, condição da enzima livre em solução, para 6,8 mM após a imobilização electroquímica em polipirrol. Para além dos métodos de imobilização, existe uma dependência crítica na cinética da álcool oxidase com a natureza da enzima, i.e., com o organismo que produziu a enzima. Por exemplo, a constante aparente de Michaelis-Menten da álcool oxidase obtida de diferentes mutantes da levedura *Hansenula polymorpha* variam de 1,3 a 12,1 mM para o etanol.

De acordo com a análise prospectiva, a utilização de ligação cruzada com glutaraldeído como metodologia de imobilização das enzimas é a mais eficaz já que sua atividade não apresenta um decréscimo significativo quando comparado com a enzima livre. Ainda, adiciona-se na grande maioria dos estudos albumina bovina sérica (BSA) com o objetivo de mimetizar o ambiente nativo da enzima.

V.4. USO DA ÁLCOOL OXIDASE

A álcool oxidase é uma enzima oligomérica que consiste de oito subunidades idênticas. Ela catalisa a oxidação de álcoois de cadeia curta aos seus respectivos aldeídos, enquanto oxigênio molecular é reduzido a peróxido de hidrogênio (Asav

et al., 2009). Devido ao forte caráter oxidante do oxigênio, a oxidação promovida pela AOD é irreversível.

A reação é acompanhada através da medição do consumo de oxigênio molecular ou da produção de peróxido de hidrogênio, usando transdutores óticos ou eletroquímicos. A segunda técnica vem sendo mais utilizada atualmente e pode ser realizada de duas formas distintas:

1. Através da aplicação de um sobrepotencial para a oxidação do H_2O_2 ;
2. Através do uso de peroxidases, que catalisam a oxidação do H_2O_2 .

No segundo caso, temos que desenvolver um sistema bienzimático, onde tanto a álcool oxidase quanto a peroxidase devem estar imobilizadas nos eletrodos, de forma que exerçam sua função catalítica simultaneamente.

Uma grande vantagem de biossensores que usam a álcool oxidase em relação aqueles que usam álcool desidrogenase é que sua ação independe da adição de cofatores como NADH e FADH, necessitando apenas da presença de oxigênio molecular para realizar a oxidação (Turkarlan et al., 2010).

V.5. METODOLOGIAS EMPREGADAS PARA DIMINUIR O SOBREPOTENCIAL APLICADO EM BIOSSENSORES AMPEROMÉTRICOS

Um dos problemas durante a operação de um biossensor amperométrico é a possível oxidação de outras substâncias além do analito de interesse, devido ao elevado sobrepotencial que deve ser aplicado para seu funcionamento.

O uso de reagentes moleculares para manipular deliberadamente a superfície de eletrodos tem vasta aplicação em eletroanalítica, pois conduz a melhoria na capacidade de reconhecimento e/ou na amplificação de sinais de corrente, ao mesmo tempo em que pode tornar as determinações mais seletivas pelo efeito eletrocatalítico (diminuição da sobretensão dos processos eletródicos) ou pela

restrição da passagem de espécies interferentes empregando-se membranas apropriadas (Lowinsohn et al., 2006).

Num eletrodo modificado, a superfície do eletrodo pode ser propositadamente alterada por adsorção irreversível direta, por ligação covalente a sítios específicos da superfície do eletrodo, por recobrimento com filmes poliméricos ou, ainda, na preparação de eletrodos à base de pasta de carbono, com um modificador pouco solúvel em água para a sua adsorção neste tipo de substrato. Os compostos modificadores são selecionados de acordo com o analito que se pretende determinar, bloqueando o acesso direto e/ou inibindo processos de eletrodo, e promovendo outros, permitindo deste modo uma maior seletividade nas análises (Labuda, 1992).

A preparação de um eletrodo quimicamente modificado (EQM), que pode ser efetuada através de vários procedimentos sumariados no Quadro 6, depende do material do eletrodo (suporte) que deve apresentar características eletroquímicas apropriadas e, também ser adequado para o método de imobilização pretendido. Segundo Baldwin et al. (1991), os EQM's devem preencher as seguintes características:

- Boa estabilidade mecânica e química.
- Correntes de fundo baixas.
- Facilidade de preparação com uniformidade de um eletrodo para outro.

A modificação com filmes poliméricos consiste no recobrimento da superfície do eletrodo com filmes poliméricos condutores ou permeáveis ao eletrólito de suporte e ao analito de interesse. A modificação com membranas poliméricas permite a imobilização de várias monocamadas da espécie ativa na superfície modificada, ampliando consideravelmente a resposta eletroquímica (Pereira et al, 2002). No Quadro 6 são listadas as técnicas de modificação de eletrodos e suas características.

Modificações	Características
Adsorção	Incorporação simples e rápida de compostos numa ampla gama de eletrodos suporte
Ligação covalente	Incorporação de um vasto número de substâncias, de maneira estável, através da manipulação da reatividade dos grupos funcionais existentes na superfície do eletrodo
Filmes poliméricos	Imobilização de policamadas da espécie ativa na superfície do eletrodo – ampliação da resposta eletroquímica
Materiais compósitos	Possibilidade de modificação interna do material do eletrodo. Exemplos: pasta de carbono, resina epóxi, poliestireno, etc.

No caso de eletrodos utilizados em voltametria de redissolução, a modificação dos eletrodos com polímeros tem sido utilizada para reduzir fenômenos de adsorção, por exclusão seletiva das espécies interferentes e por proteção da superfície do eletrodo. O revestimento polimérico pode também permitir alcançar efeitos eletrocatalíticos com uma consequente pré-concentração do analito no interior do filme, um benefício extremamente importante quando se pretendem detectar analitos em concentrações da ordem dos nanomolar. Os filmes poliméricos podem representar uma nova superfície de eletrodo, ou seja, filmes formados por polímeros condutores ou polímeros redox, ou podem ser semi-permeáveis, selecionados de forma a permitir a passagem dos analitos requeridos para a superfície do eletrodo impedindo que outros compostos adsorvam na superfície ou sofram reações de eletrodo (Oyama et al., 1980). Na Figura 31 vemos uma representação esquemática do mecanismo de transferência de elétrons em um eletrodo modificado.

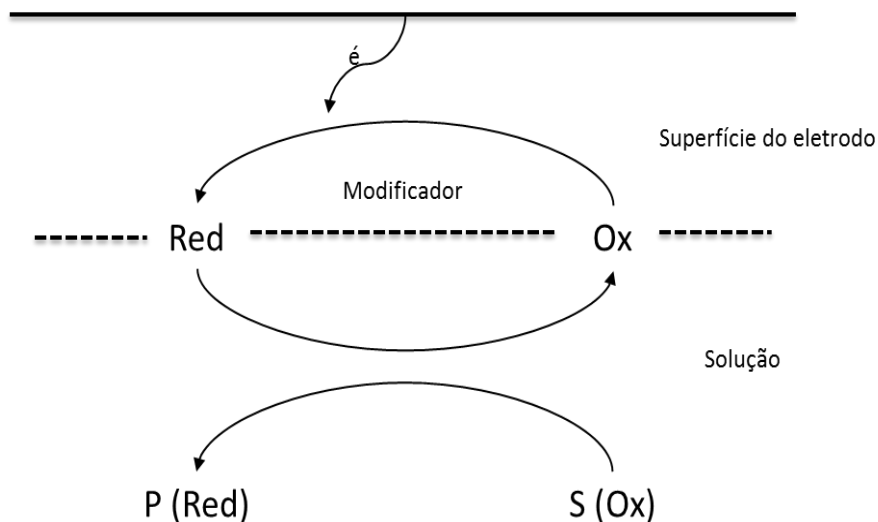


FIGURA 31 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO MECANISMO DE AÇÃO DO MODIFICADOR NA SUPERFÍCIE DE UM ELETRODO (FONTE: ADAPTADO DE SEGNINI, 2003).

Na avaliação da eficiência catalítica de um eletrodo modificado, fatores relacionados à difusão do substrato na solução, propagação da carga elétrica no filme, penetração do substrato no filme e posterior difusão e velocidade da etapa de transferência eletrônica entre mediador e substrato devem ser considerados (Durst et al., 1997).

Outra metodologia empregada para diminuir o sobrepotencial aplicado nos biossensores amperométricos para detecção de etanol é a utilização de sistemas bienzimáticos. Segundo Castillo et al. (2003), a co-imobilização da álcool oxidase e da peroxidase modifica o princípio de detecção, de uma oxidação eletroquímica para um processo de redução que acontece sob um potencial bem menos elevado, aumentando conseqüentemente a seletividade do biossensor.

Ainda segundo Castillo et al. (2003), peroxidases estão entre as poucas enzimas capazes de transferir elétrons diretamente a um eletrodo sob um potencial relativamente baixo.

A combinação das duas metodologias citadas acima é capaz de promover o desenvolvimento de um biossensor altamente seletivo.

CONCLUSÃO

O monitoramento tecnológico de biossensores para detecção de etanol revelou, através da análise comparativa de depósito de patentes e publicações de artigos científicos ao longo do tempo, que apesar de muito investimento em P&D, pouca tecnologia se encontra consolidada para inserção de biossensores como principal instrumento de análise de teor de etanol. Dentre o universo de países envolvidos em pesquisas na área, a China é a com maior intensidade de publicações, superando a Alemanha, que encontra-se em segundo lugar, em mais de 150%.

Comparando-se os tipos de biossensores em relação ao transdutor utilizado, como já foi explicitado no Capítulo IV, o método eletroquímico é o maior alvo de pesquisa devido suas propriedades que geram uma maior sensibilidade, seletividade, robustez, rapidez na resposta e ainda permite o uso de sistemas de controle computadorizados. Detalhando ainda mais o uso desses transdutores, a técnica amperométrica é a mais utilizada relativamente, com 91% do total dos transdutores eletroquímicos. Isso é visível não só nas publicações de artigos

científicos, mas também nos depósitos de patentes, onde 67% destas propõe o uso de um transdutor eletroquímico.

Existe a necessidade da utilização de eletrodos nos sistemas de biossensoreamento cujo transdutor é eletroquímico, e por isso a análise comparativa entre os materiais usados na fabricação dos eletrodos de trabalho revelou que o carbono, mais especificamente o carbono vítreo, possui vantagens que o tornam o mais utilizado. Como já foi colocado nos capítulos anteriores, a modificação do eletrodo de trabalho promove uma análise mais eficiente, principalmente por possibilitar a minimização de interferentes na resposta eletroquímica gerada. E dentro desse contexto, a modificação utilizando a nanotecnologia, principalmente nanotubos de carbono possui grandes vantagens devido às características deste tipo de material.

Os biossensores enzimáticos são, de longe, os mais amplamente utilizados, e por isso é necessária a imobilização deste componente biológico para promover um maior número de análises antes que a célula eletroquímica tenha que ser refabricada, promovendo a viabilidade econômica do instrumento. Por isso foi realizada uma análise dos diferentes métodos de imobilização utilizados e através da interpretação dos resultados observa-se que, tanto a ligação cruzada com glutaraldeído quanto a imobilização através de eletropolimerização são as metodologias com maiores aplicações e resultados satisfatórios.

As duas enzimas utilizadas nos biossensores enzimáticos são a álcool oxidase e a álcool desidrogenase. De uma maneira geral, o uso das duas enzimas é aproximadamente igual. Entretanto, uma análise temporal do uso destas, revela que a tendência é a utilização da álcool oxidase, cujo produto, peróxido de hidrogênio, pode ser oxidado através da aplicação de um sobrepotencial específico, ou ainda através da utilização de uma outra enzima (HRP) para catalisar a oxidação do peróxido.

Ao realizar uma análise temporal em relação ao uso da nanotecnologia, esta apresenta um crescimento com tendência exponencial, devido a fatores como as propriedades únicas e um domínio atual maior na manipulação deste tipo de

material. Este advento promove ainda um aumento significativo no que tange a miniaturização desses dispositivos, o que pode ser visto como uma vantagem competitiva já desta forma tornamos o instrumento mais portátil, podendo ser usado para diferentes fins e em diferentes situações que exijam essa característica, como a análise de qualidade de combustíveis em diferentes domínios, desde a produção até a comercialização deste produto.

Por fim, esta monografia serve como uma estrutura dissertativa capaz de apontar o atual estado da arte dos biossensores para detecção de etanol e ainda como um guia, ou indicador de tendência, para o desenvolvimento de novas tecnologias relacionadas ao tema.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALHADEFF, E. M. (2005); Projeto e Aplicação de Sistemas de Biossensores Integrados para Detecção de Etanol. Tese de doutorado. Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

ARNOLD, M. A., RECHNITZ, G. A. (1987); Biosensors based on plant and animal tissue. In Biosensors: Fundamentals and Applications; Turner, A. P. F., Karube, Wilson, G. S., Eds.; Oxford University Press; New York, pp. 30-59.

ARYA, S. K., DATTA, M., MALHOTRA, B. D. (2008); Recent advances in cholesterol biosensor. Biosensors and Bioelectronics, v. 23, pp. 1083-1100.

ASAV, E., AKYILMAZ, E. (2009); Preparation and optimization of a bienzymic biosensor based on self-assembled monolayer modified gold electrode for alcohol and glucose detection. Biosensors and Bioelectronics, 25, 1014-1018.

AZAMIAN, B. R., DAVIS, J. J., COLEMAN, K. S., BAGSHAW, C. B., GREEN, M. L. H. (2002); Bioelectrochemical Single-Walled Carbon Nanotubes. J. Am. Chem. Soc., 124, 12664-12665.

BACHTOLD, A., FUHRER, M. S., PLYASUNOV, S., FORERO, M., ANDERSON, E. H., ZETTL, A., MCEUEN, P. L. (2000); Scanned Probe Microscopy of Electronic Transport in Carbon Nanotubes. Physical Review Letters, v. 84, p.6082.

BALASUBRAMANIAN, K., BURGHARD, M. (2005); Chemically Functionalized Carbon Nanotubes. Small, 1, 180-192

BALDWIN, R. P., THOMSEN, K. N. (1991); Talanta 38, 1.

BARRÉ, R. (2000); Foresights and their Themes: Analysis, Typology and Perspectives. In.: The Role of Foresight in the Selection of Research Policy Priorities.

BATAILLARD, P., STEFFGEN, E., HAEMMERLI, S., MANZ, A., WIDMER, H. M. (1993); An integrated silicon thermophile as biosensor for the thermal monitoring of glucose, urea and penicillin. *Biosensors and Bioelectronics*, 8, p. 89-98.

BAUGHMAN, R. H., ZAKHIDOV, A. A., DE HEER, W. A. (2002); Carbon Nanotubes—The Route Toward Applications. *Science*, 297, 787–792.

BIOWISE, *Biosensors for Industrial Applications: A Review of Biosensor Technology*, This review has been produced by the BIO-WISE Programme with the assistance of David Stafford of Enviro - Control Ltd. Clark L. & Lyons, C.; *Ann. N.Y.Acad.Sci.* (1962), 102, 29.

BRETT, C. M. A. (2001); *Pure App. Chem*, vol 73.

BRITTO, P. J., SANTHANAM, K. S. V., AJAYAN, P. M. (1996); Carbon Nanotube Electrode for Oxidation of Dopamine. *Bioelectrochem. Bioenerg.*, 41, 121–125.

BURDA, C., CHEN, X., NARAYANAN, R., EL-SAYED, M. A. (2005); Chemistry and Properties of Nanocrystals of Different Shapes. *Chem. Rev.*, 105, 1025–1102.

CAPELATO, M. D., FATIBELLO-FILHO, O. (1992); *Quim. Nova*, 15, 28.

CASTILLO, J., GASPAR, S., SAKHAROV, I., CSOREGI, E. (2003); *Biosensors and Bioelectronics*, 18(5-6), 705.

CHAUBEY, A.; MALHOTRA, B. D. (2002); Mediated biosensors. *Biosensors and Bioelectronics*, v. 17, n. 6-7, p. 441-456.

CHEN, C. Y., KARUBE, I. (1992); *Biosensors and flow injection analysis. Current opinion in Biotechnology*, 205, p. 195-205.

COELHO, M. A. Z, SALGADO, A. M., RIBEIRO, B. D. (2008); *Tecnologia Enzimática*. FAPERJ, EPUB.

CULLEN, D. C., SETHI, R. S., LOWE, C. R. (1999); *Anal. Chim. Acta* 231, 33.

DANIEL, M. C., ASTRUC, D. (2004); Gold Nanoparticles: Assembly, Supramolecular Chemistry, Quantum-Size-Related Properties, and Applications Toward Biology, Catalysis, and Nanotechnology. *Chem. Rev.*, 104, 293–346.

DAVIS, J. J., CREEN, M. L. H., HILL, H. A. O., LEUNG, Y. C., SADLER, P. J., SLOAN, J., XAVIER, A. V., TSANG, S. C. (1998); The Immobilization of Proteins in Carbon Nanotubes. *Inorg. Chim. Acta*, 272, 261–266.

DEKANSKI, A., STEVANOVIC, J., STEVANOVIC, R., NIKOLIC, B. Z., JOVANOVIC, V. M. (2001); Glassy carbon electrodes: I. Characterization and electrochemical activation. *Carbon*, v. 39, p.1195-1205.

DMYTRUK, K.V., SMUTOK, O.L., RYABOVA, O.B., GAYDA, G.Z., SIBIRNY, V.A., SCHUHMANN, W., GONCHAR, M.V., SIBIRNY, A.A. (2007); *BMC Biotech.* 7, 33.

D'ORAZIO, P. (2003); Biosensors in clinical chemistry. *Clinica Chim. Acta*, v. 334, pp. 41-69.

DRESSELHAUS, M. S., DAI, H. (2004); Special Issue on Carbon Nanotubes. *MRS Bull.* 29, 237–281.

D'SOUZA, S. F. (2001); Microbial biosensors. *Biosensors and Bioelectronics*, v. 16, pp. 337-353.

DU, P., ZHOU, B., CAI, C. (2008); Development of an amperometric biosensor for glucose based on electrocatalytic reduction of hydrogen peroxide at the single-walled carbon nanotube/nile blue A nanocomposite modified electrode. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, v. 614, pp. 149–156.

DURST, R. A.; BAUMNER, A. J., MURRAY, R. W.; BUCK, R. P.; ANDRIEUX, C. P. (1997); *Pure Appl. Chem.*, 69, 1317.

EGGINS, B. R. (1999); Biosensors: an introduction, *John Wiley & Sons*, New York.

FATIBELO-FILHO, O., VIEIRA, I. C. (2002); Uso analítico de tecidos e de extratos brutos vegetais como fonte enzimática. *Química Nova*, v. 25, n. 3, pp. 455-464.

FERNANDES, E. G. R. (2005); Biossensores nanoestruturados para monitoração de glicose. Dissertação de Mestrado em Ciências dos Materiais para Engenharia, Universidade Federal de Itajubá, MG, Brasil.

FRACKOWIAK, E., BÉGUIN, F. (2001); Carbon materials for the electrochemical storage of energy in capacitors. *Carbon*, v. 39, p.937-950.

GORIUSHKINA, T. B., SOLDATKIN, A. P., DZYADEVYCH, S. V. (2009); Application of Amperometric Biosensors for Analysis of Ethanol, Glucose, and Lactate in Wine. *J. Agric. Food Chem.*, 57, 6528-6535.

GUILBAULT, G.G. & MONTALVO, J.G.; *J.Am. Chem. Soc.* (1969), 91, 2164.

HALL, E. A. H. (1990); *Biosensors*. Londres, p. 541.

HIRSCH, A. (2002); Functionalization of Single-Walled Carbon Nanotubes. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 11, 1853-1859.

HNAIEN, M., LAGARDE, F., JAFFREZIC-RENAULT, N. (2010); A rapid and sensitive alcohol oxidase / catalase conductimetric biosensor for alcohol determination. *Talaranta*, vol 81, 222-227.

JIA, T., CAI, Z., CHEN, X. M., LIN, Z., HUANG, X., CHEN, X., CHEN, G. (2009); Electrogenerated chemiluminescence ethanol biosensor based on alcohol dehydrogenase functionalized Ru(bpy)₃²⁺ doped silica nanoparticles. *Biosensors and Bioelectronics* 25.

KARUBE, I., NOMURA, Y. (2000); Enzyme sensors for environmental analysis. *Journal of Molecular Catalysis B*, v. 10, pp. 177-181.

KENNA, A. (1999); Sensor market goes global. *Intech*, v. 6, pp. 40-43.

KOVACS, G.T.A. (2003); Electronic sensors with living cellular components. Proc. IEEE 91, p. 915–929.

LABUDA, J. (1992); Selective electrode reviews 14, 33.

LASTRES, H., ALBAGLI, S. (1999); Informação e globalização na era do conhecimento. Campus.

LEMOS, C. (1999); Inovação na era do conhecimento, Informação e globalização na era do conhecimento, Rio de Janeiro, Cap 5.

LIEBER, C. M., LIU, J., SHEEHAN, P. E. (1996); Understanding and Manipulating Inorganic Materials Using Scanning Probe Microscopes. Angew. Chem. Int. Ed. Engl., 35, 686–704.

LOWINSOHN, D., BERTOTTI, M. (2006); Sensores eletroquímicos: considerações sobre mecanismos de funcionamento e aplicações no monitoramento de espécies químicas em ambientes microscópicos. Quim. Nova, Vol. 29, No. 6, 1318-1325.

MACHOLAN, L. (1991); “Biocatalytic Membrane Electrodes”, in Bioinstrumentation, and Biosensors, D.L Wise, Ed., Marcel Dekker, New York, p.366-367.

MATSUMOTO, K., YAMADA, K., OSAJIMA, Y. (1981); In: Analytical Chemistry, pp. 53.

MELLO, L. D., KUBOTA, L. T. (2002); Review of the use of biosensor as analytical tools in the food and drink industries. Food Chemistry, v. 77, pp. 237-256.

MOSES, P. R., WIER, L., MURRAY, R. W. (1975); Anal. Chem. 47, 1882.

NGEH-NGWAINBI, J., SULEIMAN, A. A., GUILBAULT, G. G. (1990); Piezoelectric crystal biosensors. Biosensor and Bioelectronics, 5, 13-26.

OÂMALLEY, B., SNOOK, I., MCCULLOCH, D. (1998); Reverse Monte Carlo analysis of the structure of glassy carbon using electron-microscopy data. *Physical Review B*, v. 57, p. 14148.

OYAMA, N., ANSON, F. C. (1980); *J. Electrochem. Soc.* 127, 247.

PEREIRA, A. C., SANTOS, A. D., KUBOTA, L. T. (2002); *Quim. Nova* 25 1012.

POWELL, T. (1999); TW Powell Company/Knowledge Agency - "The Knowledge Value Chain - Aligning Knowledge Workers with Competitive Strategy".

P. BERGVELD, D. R. THÉVENOT (1993); In *Advances in Biosensors*, Supplement 1 (A. P. F. Turner, ed.), p. 31. JAI Press, London, UK.

RIBAUT, MARTINET, LEBIDOIS (1991); *Le Management des Technologies* Les Editions de l'Organisation, Paris.

ROGERS, K. R. (1995); *Biosensores for environmental applications. Biosensors and Bioelectronics*, 10, p. 533-541.

ROSATTO, S. S., FREIRE, R. S., DURÁN, N., KUBOTA, L. T. (2001); *Biosensores amperométricos para determinação de compostos fenólicos em amostras de interesse ambiental. Química Nova*, v. 24, n. 1, pp. 77-86.

SALGADO, A. M. (2001); *Desenvolvimento e aplicação de sensores e sistemas de monitoração de biomassa, etanol e de substrato por modelo. Tese de doutorado. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil.*

SALGADO, A. M. (2008); *Sensores Especiais. Dinâmica, controle e instrumentação de processos. Série Didáticos. Ed. UFRJ.*

SANTOS, A. S. (2003); *Desenvolvimento de um biossensor amperométrico para álcool, empregando mediadores de elétrons imobilizados sobre SiO₂/Nb₂O₅. Tese de doutorado, Universidade Estadual de Campinas.*

SANTOS, D. M., SANTOS, M. M. (2003); A atividade de foresight e a União Européia. *Parcerias Estratégicas*, n. 17, p. 165-192.

SCHUMPETER, J. (1970); *Teorias econômicas de Marx a Keynes*. Rio de Janeiro, Zahar.

SEGNINI, A. (2003); Uso de pirrolidinoditiocarbamatos de manganês (II) e vanadila na preparação e aplicação de eletrodos de pasta de carbono modificados. Dissertação de Mestrado, IQ-USP.

SERRA, B., MATEO, E., PEDRERO, M., REVIEJO, A.J. AND PINGARRÓN, J.M. (1999); Graphiteteflon-tyrosinase composite electrodes for the monitoring of phenolic compounds in predominantly non-aqueous media. *ANALUSIS*, 27, N° 7

SHARMAT, F., ROGERS, K. (1994); "Article review - Biosensors", *Meas Sci. Technology*, v. 5, pp. 461-472.

SHKOTOVA, L. V., SOLDATKIN, A. P., GONCHAR, M. V., SCHUHMANN, W., DZYADEVYCH, S. V. (2006); Amperometric biosensor for ethanol detection base on alcohol oxidase immobilized within electrochemically deposited Resydrol film. *Materials Science and Engineering, C* 26, 411-414.

SILVA, J. S. (2010); Biossensor amperométrico à base de peroxidase em matriz de bastão de grafite comercial: estudos preliminares. Tese de doutorado. Escola de Química, UFRJ.

SOMEYA, T., SMALL, J., KIM, P., NUCKOLLS, C., YARDLEY, J. T. (2003); Alcohol Vapor Sensors Based on Single-Walled Carbon Nanotube Field Effect Transistors. *Nano Lett.*, 3, 1421-1423.

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

SPINK, C., WADSO, I. (1976); *Methods Biochemistry Anal.*, 23, 1.

ŠVANCARA, I., SCHACHL, K. (1999); Testing of unmodified carbon paste electrodes. *Chemiké Listy*, v. 93, p.490-499.

THÉVENOT, D. R., TOTH, K., DURST, R. A., WILSON, G. S. (1999); Electrochemical biosensors: recommended definitions and classifications. *Biosensors and Bioelectronics*, v. 16, pp. 121-131.

TURKARSLAN, O., BOYUKBAYRAM, A. E., TOPPARE, L. (2010); Amperometric alcohol biosensors based on conducting polymers: Polypyrrole, poly(3,4-ethylenedioxythiophene) and poly(3,4-ethylenedioxyppyrrrole). *Synthetic Metals*, 160, 808-813.

TURNER, A. P. F., KARUBE, I., WILSON, G. S. (1987); *Biosensors: Fundamentals and Applications*. Oxford University Press, Oxford.

UPDIKE, S.J., & HICKS, G.P.; *Nature* (1967), 214, 986.

VARELA, H., MALTA, M., TORRESI, M. (2000); Técnicas in situ de baixo custo em Eletroquímica: A microbalança a Cristal de Quartzo. *Química Nova*. 23(5), 664 – 679.

VARMA, S., MITRA, C. K. (2002); Bioelectrochemical studies on catalase modified glassy carbon paste electrodes. *Electrochemistry Communications*, v. 4, p.151-157.

VELASCO-GARCIA, M. N., MOTTRAM, T. (2003); Biosensor technology addressing agricultural problems. *Biosystem Bioengineering*, v. 84, pp. 1-12.

WANG, J., MUSAMEH, M. (2003); A reagentless amperometric alcohol biosensor based on carbonnanotube/Teflon composite electrodes. *Anal. Lett.* 36: 2041–2048.

WANG, J., MUSAMEH, M. (2004); Carbon nanotube screen-printed electrochemical sensors. *Analyst* 129: 1–2.

WANG, J., MUSAMEH, M., LIN, Y. (2003); Solubilization of Carbon Nanotubes by Nafion Toward the Preparation of Amperometric Biosensors. *J. Am. Chem. Soc.*, 125(9), 2408–2409.

WU, L., MCINTOSH, M., ZHANG, X., JU, H. (2007); Amperometric sensor for ethanol based on one-step electropolymerization of thionine-carbon nanofiber nanocomposite containing alcohol oxidase. *Talanta*, vol 74, 387-392.

YANG, S., LI, Y., JIANG, X., CHEN, Z., LIN, X. (2006); Horseradish peroxidase biosensor based on layer-by-layer technique for the determination of phenolic compounds. *Sensors and Actuators B*, 114774–780.

Sites acessados entre janeiro de 2010 e dezembro de 2010:

- [HTTP://WWW.USPTO.GOV](http://WWW.USPTO.GOV)
- [HTTP://WWW.ESPACENET.COM](http://WWW.ESPACENET.COM)
- [HTTP://WWW.INPI.GOV.BR](http://WWW.INPI.GOV.BR)
- [HTTP://WWW.SCOPIUS.COM](http://WWW.SCOPIUS.COM)
- [HTTP://WWW.ISIWEBOFKNOWLEDGE.COM](http://WWW.ISIWEBOFKNOWLEDGE.COM)
- [HTTP://WWW.CAPES.GOV.BR/SERVICOS/SALA-DE-IMPrensa/36-NOTICIAS](http://WWW.CAPES.GOV.BR/SERVICOS/SALA-DE-IMPrensa/36-NOTICIAS)
- [HTTP://WWW.ENQ_UFSC.BR](http://WWW.ENQ_UFSC.BR)
- [HTTP://WWW.FEM.UNICAMP.BR/~LEE/INFRA_ESTRUT.HTM](http://WWW.FEM.UNICAMP.BR/~LEE/INFRA_ESTRUT.HTM)
- [HTTP://WWW.METROHM.COM.BR](http://WWW.METROHM.COM.BR)