



*Nanobiossensores: conceito e aplicações na  
avaliação de parâmetros bioquímicos e  
diagnóstico precoce de patologias*

**Alexandre Filipe Águas da Avó Barroso**

Dissertação

**Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas**

Trabalho efetuado sob a orientação de: Professora Doutora Ana Grenha

**2014**



*Nanobiossensores: conceito e aplicações na  
avaliação de parâmetros bioquímicos e  
diagnóstico precoce de patologias*

**Alexandre Filipe Águas da Avó Barroso**

Dissertação

**Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas**

Trabalho efetuado sob a orientação de: Professora Doutora Ana Grenha

**2014**

# *Nanobiossensores: conceito e aplicações na avaliação de parâmetros bioquímicos e diagnóstico precoce de patologias*

## Declaração de autoria de trabalho

Declaro ser o autor deste trabalho, que é original e inédito. Autores e trabalhos consultados estão devidamente citados no texto e constam da listagem de referências incluída.

Alexandre Barroso<sup>©</sup>. A Universidade do Algarve tem o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicitar este trabalho através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, de o divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

## **Agradecimentos**

À Professora Dr.<sup>a</sup> Ana Margarida Grenha pela orientação que me prestou, pela dedicação, apoio e profissionalismo.

A todo o corpo docente do curso pelos conhecimentos transmitidos e entrega aos alunos.

À minha família, em especial a minha mãe sem a qual nada disto seria possível.

Aos amigos e namorada pelo apoio constante e voto de confiança.

A todos

Muito obrigado

## Resumo

Um nanobiossensor consiste num sistema de medição, de dimensão nanométrica, para a deteção de analitos biológicos ou avaliação dos seus níveis em estados de doença ou saúde. Este é constituído por um elemento de reconhecimento biológico que poderá ser um anticorpo, enzima, proteína, célula ou mesmo um organismo completo, por um transdutor físico ou químico do sinal gerado pela interação com o analito, e por um processador de sinal que permita o output dos resultados.

Os avanços dos últimos anos na área da Nanotecnologia, nomeadamente no diagnóstico nanomolecular, têm originado um crescente desenvolvimento de nanobiossensores, destacando as suas características de elevada sensibilidade e especificidade para o analito. Os nanobiossensores constituem assim, juntamente com os biossensores, uma alternativa futura aos métodos tradicionais de análise garantindo um resultado com maior rapidez e flexibilidade. Na área da saúde estes têm apresentado progressos positivos no que se refere à deteção de marcadores biológicos e outros compostos de relevância clínica, monitorização de concentrações de fármaco na célula, deteção de bactérias e vírus, e diagnóstico de diversas patologias tais como diabetes, algumas doenças infecciosas e doenças oncológicas.

Esta monografia tem por objetivos focar o desenho, caracterização e produção dos diferentes tipos de nanobiossensores existentes, assim como as suas aplicações na investigação científica e em novos métodos de diagnóstico, destacando os principais trabalhos publicados até ao presente e perspetivando futuros desenvolvimentos.

**Palavras-chave:** análises clínicas, biomarcadores, diagnóstico, nanobiossensor, nanotecnologia

## **Abstract**

A nanobiosensor consists of a measurement system, with nanometric dimensions, for detection of biological analytes or evaluation of their levels in illness states or health. This consists in a biological recognition element which can be an antibody, enzyme, protein, cell or even a whole organism, by a chemical or physical transducer of generated signal by interaction with the analyte, and a signal processor which allows the results output.

The recent advances in the area of Nanotechnology, particularly at nanomolecular diagnosis, have led to an increasing development of nanobiosensors highlighting their characteristics of high sensitivity and specificity for the analyte. Therefore the nanobiosensors represent, along with the biosensors, a future alternative to the traditional analysis methods ensuring a faster and more flexible result. In the biomedical field, these have shown positive progress for the detection of biological markers and other clinical relevant compounds, monitorization of intracellular drug concentration, detection of bacteria and viruses, and diagnosis of various diseases such as diabetes, as well as some diseases and oncological diseases.

This work aims to focus on the design, characterization and production of different sort of existing nanobiosensors, as well as their applications in scientific research and new diagnosis methods, focusing the main published works in order to present and discuss about future developments.

**Keywords:** biomarkers, clinical analysis, diagnosis, nanobiosensor, nanotechnology

## Índice de Figuras

<b>Figura 3.1-</b> Esquema genérico de um nanobiossensor com as suas diferentes componentes: bioreceptor, transdutor e processador de sinal .....	7
<b>Figura 4.1-</b> Representação de diferentes configurações mecânicas dos cantilevers. ....	13
<b>Figura 4.2-</b> Esquema de funcionamento de um nanobiossensor de canais iônicos. ....	17
<b>Figura 4.3-</b> Representação de um nanossensor eletrônico e esquema de detecção. ....	18
<b>Figura 4.4-</b> Esquema de um nanobiossensor baseado em LSPR. ....	23
<b>Figura 4.5-</b> Etapas na preparação e resposta de um nanobiossensor baseado em LSPR. ....	24
<b>Figura 5.1-</b> Gráfico da variação da condutância em função do tempo e esquema do nanossensor de nanofios PANI. ....	34
<b>Figura 5.2-</b> Representação do mecanismo de interação do MTX com as bases nucleotídicas do ADN .....	37
<b>Figura 5.3-</b> Gráfico da intensidade de fluorescência em função da concentração das amostras de carboplatina e paracetamol. ....	38
<b>Figura 5.4-</b> Design de um nanobiossensor eletroquímico para a detecção de DENV-2. ....	40

## Índice de Tabelas

<b>Tabela 2.1-</b> Principais áreas de investigação da Nanomedicina e respetivas aplicações .....	<b>4</b>
<b>Tabela 3.1-</b> Exemplos de alguns nanomateriais utilizados nos biossensores enquadrados na respetiva categoria .....	<b>6</b>
<b>Tabela 5.1-</b> Principais biomarcadores para cada tipo de cancro .....	<b>26</b>
<b>Tabela 5.2-</b> Exemplos de alguns nanobiossensores desenvolvidos com o respetivo sistema de transdução, estabilidade e limite de deteção/margem dinâmica .....	<b>31</b>
<b>Tabela 6.1-</b> Exemplos de nanobiossensores na deteção de agentes patogénicos e pesticidas. ....	<b>45</b>

## Lista de Abreviaturas

ADN- ácido desoxirribonucleico

ARN- ácido ribonucleico

ATP- adenosina trifosfato

BNP- peptídeo natriurético tipo B

BSA- albumina sérica bovina

CFU- unidade formadora de colónias

CK-MB- isoenzima MB da creatina quinase

CNT- nanotubos de carbono

CTC- células tumorais circulantes

cTNI- troponina cardíaca I

DNT- 2,4-dinitrofenol

ELISA- Ensaio imunoabsorvente ligado à enzima

FDA- Food and Drug Administration

FET- transistor de efeito de campo (“Field-Effect Transistor”)

FRET- transferência de energia de ressonância por fluorescência

HE4- proteína secretora 4 do epidídimo humano

HSV- vírus Herpes Simples

LD- limite de Detecção

LSPR- “Localized surface plasmon resonance”

mAc- anticorpo monoclonal

MTX- mitoxantrona

Myo- mioglobina

MWCNT- nanotubo de carbono de várias camadas

PBS- “Phosphate Buffered Saline”

PEBBLE- “Probes Encapsulated By Biologically Located Embedding”

PCR- reação em Cadeia da Polimerase (“Polimerase Chain reaction”)

PSA- antígeno específico da próstata

QT- quantum dots

SIDA- síndrome da imunodeficiência adquirida

SWCNT- nanotubo de carbono de camada simples

WHO - Organização Mundial de Saúde (“World Health Organization”)

UE- União Europeia

## **Índice Geral**

<b>Resumo/Abstract</b> .....	<b>v</b>
<b>Índice de Figuras</b> .....	<b>vii</b>
<b>Índice de Tabelas</b> .....	<b>viii</b>
<b>Lista de Abreviaturas</b> .....	<b>ix</b>
<b>1- Introdução</b> .....	<b>1</b>
<b>2- Nanotecnologia e Nanomedicina</b> .....	<b>2</b>
<b>3- Nanobiossensores</b> .....	<b>5</b>
3.1- Conceito .....	5
3.2- Constituição de um nanobiossensor .....	7
3.2.1- Elemento biológico e imobilização.....	7
3.2.2- Transdutor .....	9
3.2.3- Processador de informação.....	10
3.3- Parâmetros de qualidade .....	10
<b>4- Tipos de nanobiossensores</b> .....	<b>11</b>
4.1- Cantilevers .....	12
4.2- Biossensores de Nanotubos de Carbono.....	14
4.3- Nanossensores de ADN baseados em FRET .....	15
4.4 Nanobiossensor de Canais Iônicos .....	16
4.5 Nanobiossensores Eletrônicos.....	17
4.6- Nanobiossensores Eletroquímicos.....	19
4.7- Nanobiossensores de Micro e Nanobalança de Quartzo .....	19
4.8- Nanobiossensores Virais.....	20
4.9- Nanobiossensores PEBBLE.....	21

4.10- Nanobiossensores Óticos .....	21
4.11- Biossensores de Nanofios .....	24
<b>5- Aplicações dos nanobiossensores na área analítica e de diagnóstico.....</b>	<b>25</b>
5.1- Diagnóstico e monitorização tumoral.....	25
5.2- Monitorização dos níveis de glucose.....	29
5.3- Avaliação de Doenças Cardiovasculares .....	33
5.4 Controlo de fármacos.....	36
5.5 Microbiologia e Virologia.....	39
5.6- Estudo da função celular e deteção de ácidos nucleicos .....	40
5.7- Determinação de outros analitos com significado clínico .....	42
<b>6- Outras aplicações e o seu papel na saúde pública.....</b>	<b>43</b>
<b>7- Conclusão.....</b>	<b>46</b>
<b>8- Bibliografia.....</b>	<b>48</b>

## 1- Introdução

Desde os primórdios que a humanidade tem sido devastada por várias enfermidades que levaram à morte ou incapacidade de milhões de pessoas. Nos últimos anos, com o aumento populacional e esperança de vida, existe uma clara tendência de aumento das doenças crônicas como a maior causa de mortalidade e morbidade mundial. Segundo a Organização Mundial de Saúde (WHO) em 2012 as doenças cardiovasculares e o cancro foram as principais causas de morte a nível mundial, estimando-se que tenham dizimado 17.5 e 8.2 milhões de vidas respetivamente. As doenças infecciosas como o Síndrome da imunodeficiência adquirida (SIDA) ou dengue tiveram uma ligeira diminuição, embora a sua prevalência ainda seja grande, sobretudo na maioria dos países subdesenvolvidos. As consequências que estas doenças acarretam para os países são enormes e são expressas por um aumento nos gastos em Saúde, tanto a nível de tratamentos como compensações/suplementos proporcionadas, diminuição da produtividade laboral ou do número de anos de vida saudável (1,2).

A evolução na ciência em áreas como a farmacologia, medicina, bioquímica ou microbiologia em muito tem contribuído para o aparecimento de novos fármacos e metodologias de tratamento com uma maior eficácia, menor aparecimento de efeitos adversos e menor custo. No entanto, a promoção da saúde não deve basear-se somente no tratamento, é igualmente importante que exista uma forte componente de prevenção e diagnóstico prévio das doenças a fim de evitar o agravamento das mesmas. A deteção antecipada de uma patologia permite uma ação imediata que pode em alguns casos salvar a vida do doente. Os métodos e protocolos de diagnóstico são variados conforme a doença em causa, sendo as suas características determinantes a rapidez, ou seja, a apresentação de resultados num curto espaço de tempo, e a possibilidade de deteção da patologia numa fase o mais inicial possível. A presença de alguns analitos ou marcadores em amostras biológicas, mesmo em baixas concentrações, podem ser um indício da ocorrência de um problema de saúde futuro. A investigação em Nanotecnologia na última década, em novos e mais avançados métodos de diagnóstico tem revelado um grande potencial e estima-se que num futuro próximo várias aplicações estejam disponíveis no mercado (3).

## 2- Nanotecnologia e Nanomedicina

A Nanotecnologia define-se como “o design, caracterização, produção, e aplicação de estruturas, dispositivos, e sistemas por manipulação controlada do tamanho e forma à escala manométrica (escala atômica, molecular e macromolecular) ... [de forma a produzi-los] com pelo menos uma característica ou propriedade melhorada/superior.” (4).

As bases conceptuais da nanotecnologia foram inicialmente referidas pelo físico Richard Feynman em 1959 no seu discurso “*There’s plenty of room at the bottom*” no Instituto de Tecnologia da Califórnia, onde o próprio analisava o vasto leque de possibilidades que o controlo da matéria a nível atómico traria no futuro. Em 1974 é utilizado pela primeira vez o termo “nanotecnologia” pelo investigador da Universidade de Tóquio, Norio Taniguchi, para se referir à capacidade de operar materiais ao nível nanométrico. Este conceito é mais tarde largamente difundido pelo engenheiro K. Eric Drexler no seu livro “*Engines of Creation: The Coming Era of Nanotechnology*”, onde avalia o potencial da nanotecnologia molecular e perspetiva uma nova forma de produzir materiais, átomo por átomo, equiparável a uma nova revolução industrial que traria um profundo impacto na sociedade. A partir da década de 90 começa a observar-se um investimento público, que é ampliado sobretudo no século XXI, no apoio a investigações científicas e tecnológicas, na criação de infraestruturas e plataformas industriais que leva à publicação de mais de 2 000 000 de artigos relacionados com nanotecnologia e à apresentação de um número superior a 1 000 000 de pedidos de patente. Entre os países com um maior investimento na nanotecnologia destacam-se os Estados Unidos, o Japão e a Alemanha (5-9).

No que diz respeito à síntese de nanoestruturas existem duas abordagens de construção: “bottom up” e “top down”. O primeiro processo inicia-se a partir de pequenas subunidades, que podem ir de átomos até moléculas mais complexas, e que são manipulados de forma a obter um produto final desejado. Essa manipulação pode resultar de diferentes técnicas tais como a síntese química ou a localização direta de fragmentos através da microscopia de força atómica. Por outro lado, no processo de “top down” a matéria-prima inicial é uma estrutura de grandes proporções que é sujeita a condições controladas ou técnicas de microfabricação, como é o caso da litografia, a

fim de provocar alterações a nível das ligações entre átomos ou moléculas permitindo as suas movimentações e moldando desta forma até se obter a estrutura final (10,11).

O desenvolvimento e aplicação da nanotecnologia têm contribuído para potenciação de um vasto e diversificado conjunto de áreas tais como medicina, farmácia, biotecnologia, engenharia e telecomunicações. O seu impacto visa, para além de reduzir custos de produção e melhorar processos e produtos, oferecer a longo prazo novas abordagens na resolução de questões fulcrais de saúde e sociais. Para tentar dar resposta aos problemas relacionados com a saúde a partir da nanotecnologia surge a “nanomedicina” que é definida, segundo a *European Science Foundation*, como “a ciência e tecnologia do diagnóstico, tratamento e prevenção de doenças e alívio da dor de lesões traumáticas, e da preservação e melhoramento da saúde humana, usando métodos e conhecimentos moleculares do corpo humano”. As principais aplicações da nanomedicina são apresentadas na Tabela 2.1, na qual se destacam o nanodiagnóstico *in vitro* e *in vivo*, a vetorização de fármacos e a medicina regenerativa (11-13).

O conhecimento do comportamento e controlo da matéria a dimensões na ordem dos nanómetros permite uma melhor compreensão do funcionamento, monitorização e controlo dos sistemas biológicos humanos atingindo desta forma benefícios médicos. Os materiais nanoestruturados, que se caracterizam por serem estruturas em que pelo menos uma das suas dimensões é inferior a 100 nm ( $10^{-9}$  m), oferecem várias vantagens na sua utilização uma vez que estes apresentam propriedades e comportamentos distintos de uma massa de maior volume com a mesma composição. A sua relação de superfície/volume é superior à medida que o tamanho dos sistemas diminui o que permite que haja uma maior superfície disponível para interações químicas com biomoléculas. Dado o reduzido tamanho, os tempos das reações químicas são menores e garantem uma melhor eficiência nos instrumentos analíticos onde são aplicadas. As estruturas dos diferentes nanosistemas, como por exemplo os quantum dots, os lipossomas, os dendrímeros ou os nanotubos, podem ser muito variadas conferindo-lhes propriedades específicas para a sua utilização em nanomedicina (12,13).

Nos últimos anos, o diagnóstico molecular, a par de outras aplicações como a vetorização de fármacos, tem sido uma das áreas de maior evolução na nanomedicina. Este é considerado uma parte essencial do desenvolvimento da medicina personalizada proporcionando recursos para uma melhor prestação de cuidados de saúde no que diz respeito a procedimentos de diagnóstico. Para alguns biomarcadores no soro fisiológico,

que vão desde pequenas moléculas até ácidos nucleicos ou proteínas, tem sido feita a correlação entre a sua presença ou concentração anormal e o aparecimento de uma doença. A deteção direta através de uma amostra biológica requer que o método seja viável e consiga detetar quantidades muito baixas do analito de forma a tornar-se uma base sólida para um diagnóstico que numa patologia em fase inicial poderá levar a um tratamento mais simples e eficaz e assim aumentar a taxa de sobrevivência dos doentes (3,13,14).

**Tabela 2.1-** Principais áreas de investigação da Nanomedicina e respetivas aplicações (adaptado de 13)

Áreas de investigação	Aplicações
<b>Nanodiagnóstico</b>	Diagnóstico molecular Nanoendoscopia Nanoimagiologia
<b>Fármacos baseados em nanotecnologia</b>	Vetorização de fármacos
<b>Medicina regenerativa</b>	Nanotecnologia aplicada à engenharia de tecidos
<b>Medicina de transplantação</b>	Produção de nanosistemas de doação para transplantes de órgãos sem recorrer a fármacos
<b>Tratamentos nanorobóticos</b>	Cirurgia vascular por nanorobôs introduzidos no sistema vascular Nanorobôs para a deteção e destruição de cancros.
<b>Implantes</b>	Sensores bioimplantáveis que fazem a ligação entre os circuitos eletrónicos e neurológicos. Tecidos e órgãos artificiais de longa duração e resistentes a fenómenos de rejeição.
<b>Cirurgia minimamente invasiva utilizando cateteres</b>	Produção de nanossensor implantados em cateteres para fornecer informação detalhada em tempo real. Aplicação de nanopartículas à nanocirurgia.

Os métodos laboratoriais tradicionais de diagnóstico de anticorpos, ácido desoxirribonucleico (ADN), proteínas e outros biomarcadores baseiam-se em várias tecnologias, onde na maioria dos casos estão incluídos o método do ensaio imunoadsorvente ligado à enzima (frequentemente denominado ELISA) ou a amplificação por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). Os imunoenaios baseados em ELISA são uma das tecnologias largamente utilizadas no diagnóstico clínico no que diz respeito à detecção de proteínas e anticorpos específicos associados a doenças. No entanto, apresenta algumas limitações nomeadamente a sua sensibilidade que, embora não seja baixa, nem sempre é a ideal para detecção de proteínas a níveis muito reduzidos, a duração dos procedimentos ou a necessidade de pessoal especializado. Este método também apresenta substanciais obstáculos na detecção de biomarcadores cardíacos para avaliação dos cuidados de saúde ou para a detecção de alguns vírus como o do dengue (14-17).

Por seu lado o PCR é um método relativamente rápido e de baixo custo mas com um grande nível manipulação da sua amostra, não permite um aumento de concentração de proteínas e é muito sensível a contaminações que se tornam altamente concentradas durante o processamento da amostra, podendo gerar falsos negativos. Também de realçar o modo de diagnóstico da bactéria patogénica *Legionella pneumophilla* e de partículas virais infecciosas em que são utilizado métodos baseados em cultura de células cujo resultado pode demorar entre 3 a 10 dias ou várias semanas, respetivamente. Em alternativa ou mesmo em combinação com alguns dos métodos anteriormente referidos encontram-se os nanobiossensores que são sensíveis, simples, de baixo custo e portáteis (15-19).

### **3- Nanobiossensores**

#### **3.1- Conceito**

Os avanços significativos em áreas como a nanobiotecnologia e a ciência dos nanomateriais possibilitaram a criação de um vasto número de materiais e dispositivos com propriedades ideais para numerosas aplicações. Graças às propriedades físico-químicas exclusivas dos nanomateriais foi possível desenvolver novos e arrojados dispositivos para detecção eficaz de analitos, como os nanobiossensores (20).

Um nanobiossensor consiste num dispositivo à escala nanométrica que possui uma região composta por elementos de reconhecimento biológico, que são seletivos para um analito, e que está ligada covalentemente a um transdutor, possuindo ainda um processador de sinal. A interação do analito em causa com o bioreceptor resulta numa perturbação físico-química no nanobiossensor que pode ser convertida sob a forma de um sinal mensurável cuja magnitude aumenta à medida que a sua concentração também aumenta. O primeiro conceito de biossensor surgiu em 1962 pelo Professor Leland C. Clark Jr. quando este publicou o seu trabalho científico sobre o elétrodo de oxigénio. No seu trabalho era descrito um dispositivo que compreendia um elétrodo de oxigénio que continha uma membrana interior semipermeável ao oxigénio e uma membrana de diálise onde se encontrava a enzima glucose oxidase. A determinação da concentração de glucose na amostra era possível graças à diminuição proporcional de oxigénio medido durante o processo de oxidação. Desde este modelo inicial, surgiram vários biossensores com novas modificações que incluíam conhecimentos de áreas tão diversificadas como nanociências, eletrónica, computação e biologia. No séc. XXI surge a tentativa de desenvolver biossensores de menores dimensões utilizando para tal novas matérias de fabrico com base em diferentes categorias de nanomateriais (Tabela 3.1) (21-23).

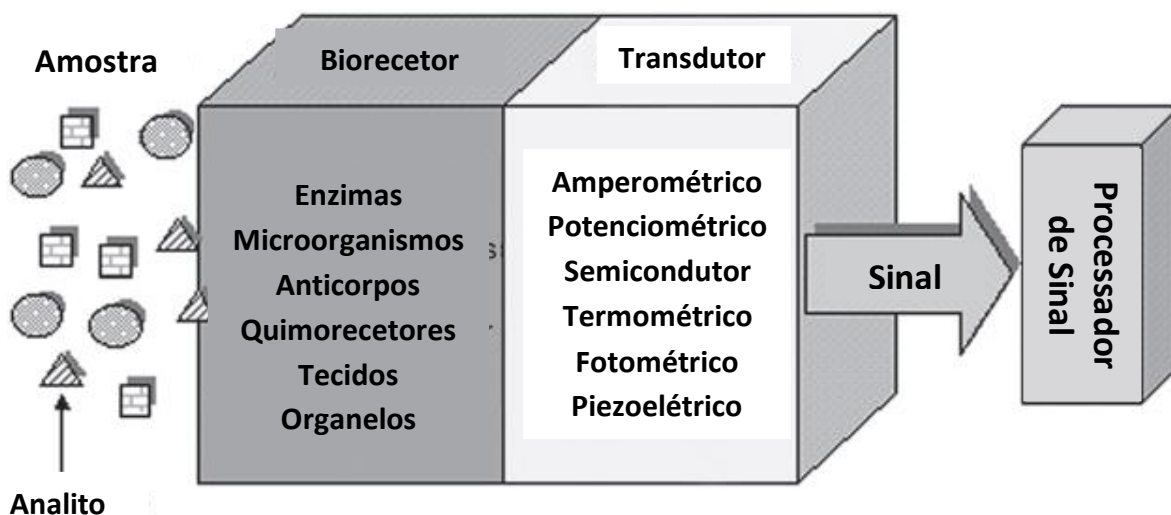
**Tabela 3.1-** Exemplos de alguns nanomateriais utilizados nos biossensores enquadrados na respetiva categoria (adaptado de 23)

Dimensão	Exemplo de Nanomateriais
0D	Nanopartículas
1D	Nanofios, nanotubos, “nanobelts”
2D	Filmes finos, membranas, conjuntos em 2D de nanopartículas ou nanofios
3D	Conjuntos de nanofios/nanotubos sobrepostos, nanomolas.

Atualmente os nanobiossensores são produzidos para diversos fins, tais como detecção de analitos e substâncias tóxicas, detecção de microorganismos, como auxílio ao diagnóstico clínico, descoberta de novos fármacos, entre outros. Algumas das principais aplicações dos nanobiossensores serão descritas no capítulo 5 (24,25).

### 3.2- Constituição de um nanobiossensor

Um nanobiossensor é geralmente composto por 3 partes: um elemento responsável pelo estímulo biológico, um transdutor e um processador de sinal (Figura 3.1). Em alguns casos pode surgir ainda um outro componente incorporado de preparação da amostra, como é o caso dos sensores de glucose de última geração que possuem um sistema de filtração composto por membranas (26,27).



**Figura 3.1-** Esquema genérico de um nanobiossensor com as suas diferentes componentes: bioreceptor, transdutor e processador de sinal (adaptado de 22)

#### 3.2.1- Elemento biológico e imobilização

O elemento biológico, também designado por bioreceptor, é responsável pela detecção do analito através de reconhecimento molecular e pode ser constituído por recetores, enzimas, anticorpos, ácidos nucleicos, materiais biomiméticos, proteínas, tecidos, organelos, células, ou vírus. O bioreceptor é o componente do nanobiossensor que lhe confere características de especificidade e sensibilidade e como tal a sua escolha

deve ter em conta fatores como o tipo de analito a detetar, a natureza da amostra (ex. tecido, sangue, gás), a sua concentração ou tipo de medição. De forma a garantir o normal funcionamento do bioreceptor é necessário que este se encontre protegido de agentes agressivos, como espécies reativas, ou de condições do meio desfavoráveis (ex. alterações de pH ou temperatura) a fim de evitar a sua degradação ou inativação. De forma a obter uma interação específica, com uma transdução credível e mensurável, as moléculas químicas/biológicas do bioreceptor necessitam de ser imobilizadas na superfície do sensor. A escolha do processo de imobilização é uma das etapas chave na elaboração de um sensor de alta resolução e seletividade, sendo que este deve cobrir uma área considerável da superfície do sensor e garantir a sua estabilidade ao longo do tempo, sem no entanto comprometer propriedades como é o caso da estrutura ou afinidade das moléculas fixadas (22,28-31).

Os processos de imobilização de biomoléculas são vários, podendo dividir-se em duas classes: os métodos físicos de que fazem parte a adsorção, o encapsulamento ou a imobilização em matriz, e os métodos químicos como é o caso da reticulação polimérica. De um modo genérico, os métodos físicos são processos relativamente simples quando comparados com os métodos químicos, onde muitas das vezes é necessária a utilização de solventes adicionais (30,31).

Por outro lado as interações entre a biomolécula e a superfície do sensor apresentam uma maior intensidade para os métodos químicos, onde existem muitas das vezes ligações covalentes, sendo uma das principais limitações de alguns métodos físicos uma vez que uma força de interação fraca pode pôr em causa a estabilidade do elemento biológico no sensor. Na elaboração dos biossensores os métodos de imobilização mais utilizados são a adsorção física, a ligação covalente, a imobilização por matriz, a reticulação intermolecular e a imobilização por membrana. A superfície de imobilização também pode variar consoante o método de construção utilizado, o tipo de elemento biológico ou a aplicação a que o sensor se destina sendo comum o uso de suportes sólidos, membranas de diálise, lipossomas, microcápsulas, géis, materiais poliméricos, matrizes de sílica-gel ou nanomateriais (30,32,33).

### 3.2.2- Transdutor

O transdutor corresponde à componente do biossensor que é responsável pela conversão da interação do analito com o bioreceptor num sinal elétrico mensurável e quantificável. Consoante o seu modo de ação os transdutores podem ser divididos em diferentes classes, sendo as principais as dos eletroquímicos, dos óticos, dos sensíveis a variações de massa e dos termométricos (33,34).

Os transdutores eletroquímicos fundamentam-se no princípio de que reações químicas do analito com as moléculas do bioreceptor produzem ou consomem espécies eletroativas (iões ou eletrões), os quais afetam as propriedades eletroquímicas da solução e podem ser detetadas. Dependendo da propriedade elétrica em estudo, pode ainda considerar-se três subclasses: os amperimétricos que medem a corrente produzida por um potencial colocado entre dois elétrodos, os potenciométricos que possuem elétrodos seletivos de iões e que detetam uma resposta elétrica no bioreceptor e os condutimétrico ou impedimétricos que medem alterações da condutividade ou resistência elétrica da amostra ao longo da interação das moléculas do bioreceptor com o analito (33,34).

Os transdutores óticos medem a quantidade de luz recebida ou emitida aquando da interação do analito com o elemento biológico. O seu princípio pode basear-se na deteção por fluorescência, luminescência, colorimetria, ou interferometria. Este tipo de transdutores, e sobretudo os que utilizam o método de fluorescência, apresentam uma grande sensibilidade e seletividade, sendo ideais para aplicações em biossensores (33,34).

Outro método em que alguns transdutores se fundamentam é na variação de massas. Um transdutor deste tipo denomina-se piezoelétrico, contendo um elemento capaz de gerar uma carga elétrica quando aplicada uma força mecânica, como é o caso do quartzo, da turmalina ou o niobato de lítio. Estes cristais, quando aplicado um sinal elétrico de determinada frequência, vibram a uma frequência específica que está dependente da frequência elétrica aplicada e da massa do cristal. Quando existe ligação das moléculas do bioreceptor com o analito ocorre um aumento de massa que leva à alteração da frequência de vibração e que, conseqüentemente, permite a deteção e quantificação do analito. Existem também outros transdutores baseados em variações de massa, como os transdutores acústicos e os nanocantilevers. A classe de transdutores

sensíveis a variação de massa é de uma forma geral mais barata e fácil de utilizar mas nem sempre estes apresentam a seletividade e sensibilidade desejável (33,34).

Por fim surgem os transdutores termométricos cujo funcionamento se baseia na produção de energia sob a forma de calor quando se dá a interação entre o analito e o bioreceptor. Deste modo a variação de entalpia do sistema, por produção ou absorção de calor, é proporcional ao número de moléculas do analito. Este tipo de transdutor não sofre alterações de leitura por propriedades óticas e eletroquímicas da amostra nem requer constantes calibrações. A sua utilização em nanobiossensores tem revelado grande potencial uma vez que a principal desvantagem da fraca sensibilidade tem sido contornada pelos avanços em conformações microfluídas (33-35).

### **3.2.3- Processador de informação**

Após a formação do sinal elétrico no transdutor este chega até um microprocessador, onde é ampliado e analisado. Os resultados são assim transferidos para um sistema de processamento de dados onde serão guardados ou apresentados num formato de fácil leitura e interpretação (24).

### **3.3- Parâmetros de qualidade**

No desenvolvimento de qualquer nanobiossensor são tidos em conta alguns parâmetros essenciais para o seu correto funcionamento. Os esforços de desenvolvimento de melhores e mais avançados nanobiossensores são constantes, a fim de atingir os melhores desempenhos no que se refere à detecção do analito (36).

Um desses parâmetros de grande importância é a *sensibilidade*, o que permite avaliar se um teste de diagnóstico é capaz de identificar corretamente a presença ou ausência de um determinado analito numa amostra da população. O nível de sensibilidade pode ser estimado através do número de verdadeiros positivos obtidos a dividir pelo soma do número de verdadeiros positivos e falsos negativos. Associado à sensibilidade surge também o Limite de Detecção (LD) que corresponde à quantidade mínima do analito de interesse que é capaz de gerar um sinal e ser detetada. A margem dinâmica corresponde à gama de valores detetáveis pelo sensor e, é limitada inferiormente pelo LD e superiormente pela saturação do bioreceptor, por quebra do sensor ou por alterações imprevistas na sua sensibilidade (31,36).

Além da capacidade de produção de um sinal indicativo da presença do analito, o sensor deve ser ainda capaz de distinguir o analito de outras substâncias, ou seja deve possuir *especificidade*. Ao contrário da sensibilidade, esta propriedade é difícil de ser avaliada devido ao enorme número de possíveis materiais que não deveriam produzir nenhum sinal de detecção. A especificidade é de uma grande importância em situações de detecção de um analito específico que se encontre em baixas concentrações num ambiente com concentrações altas de outros materiais, alguns dos quais se podem ligar inespecificamente ao sensor e produzir um sinal anômalo. Os biossensores muitas das vezes utilizam interações específicas e complexas provenientes da natureza como por exemplo anticorpo-antígeno, hibridização de ácidos nucleicos, biotina-estreptavidina e interações enzima-substrato, havendo a possibilidade também de utilizar ligandos artificialmente sintetizados como é o caso dos aptâmeros (31,36).

A capacidade de detecção “multiplex” (medição simultânea de vários analitos) é uma das características fundamentais em alguns tipos de nanobiossensores. É de especial relevância no diagnóstico de doenças através da avaliação de diferentes biomarcadores ou na avaliação da presença de vários agentes patogénicos, podendo fornecer inclusive informação do subtipo e modificações de vírus emergentes. A estabilidade do sensor deve ser garantida em condições normais e o volume da amostra deve ser o menor possível que permita uma detecção viável (31,36).

A nível comercial, o sensor deve possuir uma estrutura e funcionamento simples e de leitura direta. O custo de produção e dos materiais usados no seu fabrico deve ser reduzido permitindo, todavia que o sensor apresente uma longa duração e capacidade de várias análises sucessivas. O seu nível de portabilidade deve ser um fator a considerar nos casos de difícil transporte da amostra até ao laboratório (31,36).

#### **4- Tipos de nanobiossensores**

Tal como foi descrito no capítulo anterior os nanobiossensores podem apresentar inúmeras variações no que diz respeito aos seus constituintes assim como o seu modo de detecção e leitura do sinal. Estas variações estruturais podem definir o fim a que se destina o sensor e o seu maior ou menor grau de sensibilidade e especificidade. Com base nas suas características estruturais, os nanobiossensores podem ser divididos em diferentes tipos, cujo modelo de funcionamento se assemelha entre si, podendo no

entanto existir algumas modificações pontuais particulares para uma dada aplicação. De seguida são apresentados alguns dos modelos de nanobiossensores mais importantes, o seu funcionamento e algumas das suas particularidades (13).

#### **4.1- Cantilevers**

Os sensores baseados em cantilevers são sistemas nanomecânicos, com uma estrutura fina fixa numa das extremidades, capazes de detetar analitos a muito baixas concentrações através da adsorção destes na superfície do cantilever e consequente interação com o bioreceptor. Quanto ao modo de deteção desta interação podem-se dividir em dois tipos: os sistemas de modo dinâmico (Figura 4.1a) e os sistemas de modo estático (Figuras 4.1b,4.1c,4.1d) (15,25).

Os sensores de modo dinâmico, ou sistemas de ressonância, funcionam através de um oscilador que apresenta uma frequência de ressonância equivalente à massa de ressonância. Assim, quando a molécula alvo se liga ao bioreceptor, que existe nas superfícies superior e inferior do cantilever, ocorre uma alteração da frequência resultante do aumento de massa do sistema que pode ser calculada (Figura 4.1a). Devido ao facto de se trabalhar ao nível nanométrico e com quantidades de analito muito baixas, algumas propriedades devem ser tidas em conta, nomeadamente a elasticidade e espessura do material e a densidade do analito a fim de se obter um valor o mais próximo do real (15,36,37).

Os sensores que operam no modo estático, também designados de sensores baseados na deflexão, possuem numa das extremidades um cantilever previamente funcionalizado de um dos lados com um receptor específico e cuja interação deste com a biomolécula alvo resulta numa alteração da forma do cantilever e leva a que este se dobre. A deflexão pode suceder por três razões diferentes: por acumulação de massa do analito que pela força gravítica leva a deformação do cantilever, por diferenças entre o analito e a superfície no coeficiente de expansão térmica que leva à deformação quando sujeito a alterações de temperatura (Figura 4.1b) e por stress superficial causado pela ligação do analito que pode causar uma deflexão negativa ou positiva (Figura 4.1c e 4.1d, respetivamente). Os fatores que resultam no processo de deflexão não foram ainda completamente esclarecidos mas sabe-se que interações através de forças van der Waals, eletrostáticas, de hidratação e estéricas, alterações da hidrofobicidade superficial ou alterações conformacionais das biomoléculas adsorvidas apresentam um papel decisivo

na ligação final do analito ao bioreceptor. A posição que o cantilever adquire após interação pode ser detetada e comparada com a anterior, extrapolando-se assim os valores de concentração do analito em causa (15,24,36,37).

O modo de deteção da frequência de oscilação ou da deflexão do cantilever é normalmente feito através de um elemento piezoelétrico que sofre alteração da sua resistência quando ocorre um stress superficial, ou por método ótico refletindo um laser sobre a superfície do cantilever e medindo a amplitude de oscilação ou o ângulo de deflexão formado com a deteção do analito (15,25).

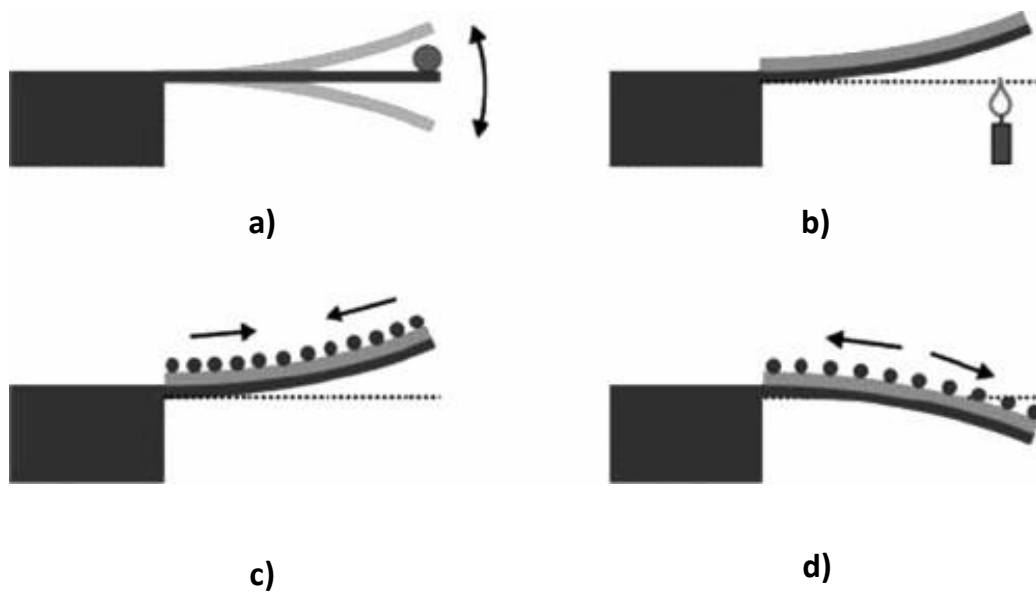


Figura 4.1- Representação de diferentes configurações mecânicas dos cantilevers. O esquema a) representa um sistema de modo dinâmico por variação da frequência de ressonância enquanto os restantes são sistemas estáticos; em b) ocorre uma deflexão por aumento da temperatura em superfícies de coeficiente de expansão termal diferente, em c) deflexão negativa por stress superficial e d) deflexão positivo por stress superficial (adaptado de 15)

Ambos os sistemas podem ser fabricados a partir de silicone ou nitreto de silício, sendo também utilizados outros materiais como polímeros. Os sistemas de modo dinâmico apresentam vantagem em relação aos estáticos no que diz respeito aos níveis de deteção, atingido um LD a nível dos zeptogramas ( $10^{-21}$  g) em condições ideais de vácuo e baixa temperatura, ao contrário do estático que pode atingir um LD máximo na ordem dos picogramas ( $10^{-12}$  g) (15,36).

Quando se compara a capacidade de medição em meios líquidos e gasosos os sistemas dinâmicos são muito limitados devido à viscosidade e amortecimento do meio que afeta seriamente a sua sensibilidade, não sendo este o método ideal para desenvolvimento de um sensor prático e acessível. Esta ideia perdurou até que em 2003, através do trabalho desenvolvido por Burg e Manalis, foi possível adaptar o modo dinâmico através da integração de canais microfluídicos numa tira de cantilever que permitiam a oscilação do cantilever num ambiente de vácuo ao mesmo tempo que o bioreceptor estava em contato com uma amostra líquida. Outros modelos foram construídos com base neste princípio sendo demonstrada a detecção ao nível dos nanogramas ( $10^{-9}$  g). A sua investigação tem sido direcionada para a análise genómica, proteómica, biodiagnóstico e descoberta de fármacos (13,15,36,38).

#### **4.2- Biossensores de Nanotubos de Carbono**

Os nanotubos de carbono (CNT) fazem parte de um grupo de nanomateriais de grande interesse para o desenvolvimento de sensores de alta performance devido às suas propriedades únicas. Os nanotubos de carbono são constituídos por unidades de carbono  $sp^2$  organizados em estruturas hexagonais e podem ser divididos em dois grupos: os nanotubos de carbono de várias camadas (MWCNTs) que consistem em túbulos de grafite concêntricos e fechados nas extremidades, com várias camadas de grafite com um tamanho de 2 a 25 nm, e os nanotubos de carbono de camada simples (SWCNTs) que possuem uma camada única de grafite na forma de cilindro com diâmetro de 1-2 nm. Os métodos de síntese mais comuns, tanto dos MWCNTs como dos SWCNTs, são a descarga em arco elétrico, a ablação por laser e a deposição química a vapor. Independentemente do processo de síntese utilizado são sempre produzidos, juntamente com os CNT, carbonos amorfos e partículas de grafite indesejáveis que sofrem processos de separação complexos. Os CNT apresentam uma dureza superior ao aço devido à sua geometria, que permite uma distribuição da tensão sobre uma vasta área e também devido às fortes ligações entre átomos de carbono. As suas propriedades elétricas, que advêm do facto de existirem eletrões livres na superfície dos nanotubos após hibridização  $sp^2$  nas orbitais de carbono, torna-os ideais para a utilização como sensores, díodos ou transístores. O seu comportamento elétrico pode ser ainda potenciado pelo tamanho do diâmetro e alinhamento da(s) camada(s) ou pela quiralidade que os define como metálicos ou semicondutores (13,15,20,39).

Uma das configurações mais utilizada dos CNT em nanobiossensores é como transistor de efeito de campo ou FET (do inglês Field-Effect Transistor). O FET consiste num sistema semiconductor que faz a ligação entre um eletrodo doador e um eletrodo recetor e no qual o método de deteção é feita a partir de uma transferência de carga do analito para os nanotubos de carbono que sofrem uma alteração na sua condutividade elétrica, sendo esta mensurável pelo limiar de voltagem ou corrente. O uso destes sensores tem incidido sobretudo na deteção de gases uma vez que apresentam alta sensibilidade, contudo o seu desempenho é limitado em analitos com baixas energias de adsorção, fraca cinética de difusão ou com baixa transferência de carga com nanotubos de carbono (20,39).

Outras configurações possíveis são a imobilização de uma enzima aos CNT com afinidade para uma molécula-alvo como a glucose (via funcionalização com a enzima glucose oxidase) ou o peróxido de hidrogénio (via catalase) ou a imobilização de um ácido nucleico de modo a detetar sequências específicas, fenómenos de hibridização ou a interação de agentes intercalantes como a mitoxantrona com o ADN (40-42).

#### **4.3- Nanossensores de ADN baseados em FRET**

A transferência de energia de ressonância por fluorescência ou Förster (FRET) corresponde a um processo no qual um fluoróforo doador, que se encontra num estado excitado, transfere a sua energia para um fluoróforo aceitador nas suas proximidades, fazendo com que este emita fluorescência com um comprimento de onda característico. De forma a tornar esta transferência de energia eficiente deve ser assegurada que a distância entre os fluoróforos é reduzida (1 a 10nm), que existe um alinhamento dipolo-dipolo favorável e que os dois fluoróforos apresentem uma sobreposição de espectro adequada (que deve ser superior a 30%). Alguns dos pares de doador e aceitador mais comuns na FRET's são os quantum dots (QT) e as nanopartículas de ouro, as proteínas de fluorescência ciano e as proteínas de fluorescência amarela e as Cy3 e Cy5 (43,44).

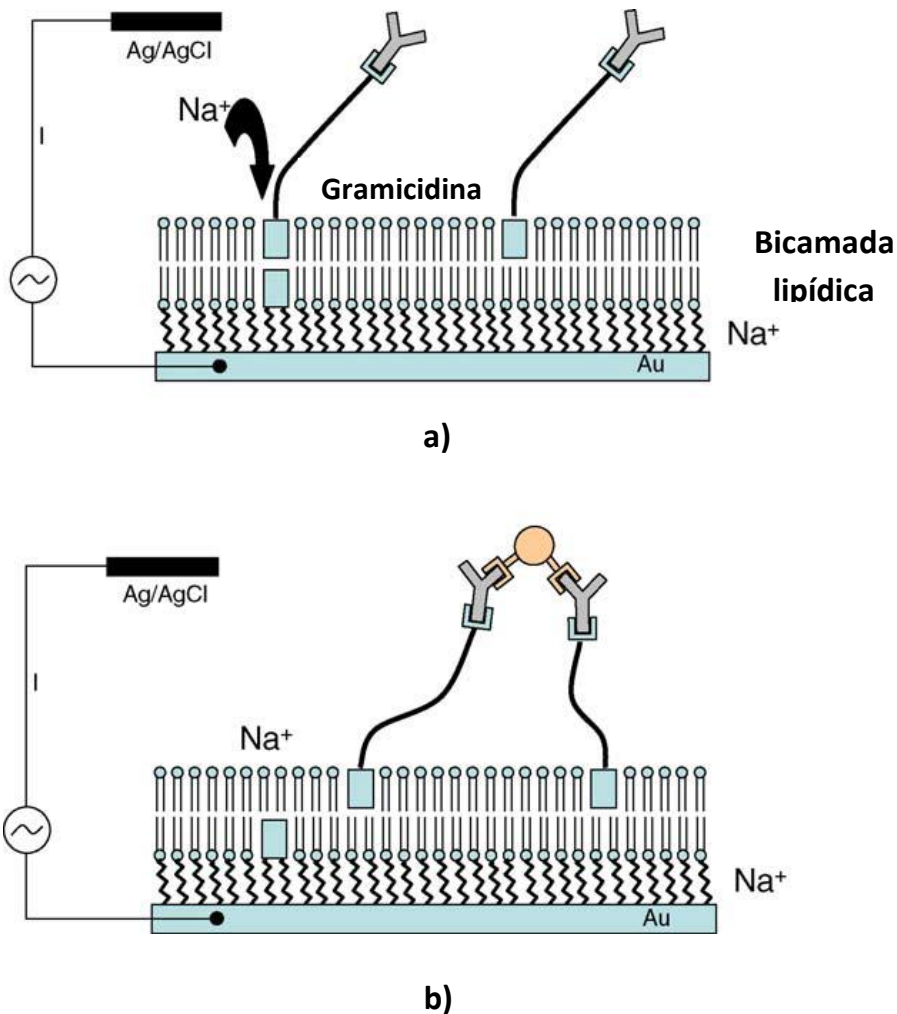
O seu uso está direcionado principalmente para a deteção de ADN (existindo também adaptações para o ARN ou ácido ribonucleico) através da proximidade de um fluoróforo doador com o aceitador em fragmentos de ADN com uma cadeia complementar ou em oligonucleótidos marcados, em que para uma cadeia alvo estes sejam subsequentes. A análise da hibridização do ADN, clivagem, deteção de ácidos nucleicos, estruturas de proteínas, funcionamento e interações, diagnóstico de algumas

doenças genéticas ou detecção de material genético de um elemento patogénico são alguns dos estudos possíveis a partir destes sensores. A avaliação qualitativa de analitos em amostras biológicas é ainda muito limitada embora já tenham sido dados alguns passos como é o caso do trabalho desenvolvido pelo Professor Bo Tang e a sua equipa que conseguiram criar um nanobiossensor baseado em FRET capaz de detetar diretamente os níveis de glucose com alta sensibilidade e seletividade (15,43,45,46).

#### **4.4- Nanobiossensor de Canais Iónicos**

Um nanobiossensor de canais iónicos é constituído por uma membrana sintética onde estão incorporados os canais iónicos que permitem a entrada e saída de iões como o sódio, e que contém à superfície bioreceptores específicos para um determinado analito. Quando ocorre a interação do analito com o bioreceptor, sucede-se um bloqueio no canal iónico que impede a passagem dos iões. A presença do analito pode, assim ser quantificada através da avaliação do valor de condutividade elétrica do canal iónico que deverá diminuir (13).

O Ion Channel Switch (ICS<sup>®</sup>), desenvolvido pela Ambri Ltd, é um exemplo deste tipo de sensor. Este sensor apresenta um suporte coberto por uma camada de ouro que serve como condutor iónico, uma bicamada lipídica que contém moléculas de gramicidina, bioreceptores (neste caso um anticorpo) ligados à gramicidina superior ou à membrana por proteínas de ligação como a streptavidina e biotina e um reservatório ao qual os iões de sódio só têm acesso através dos canais moleculares formados pela gramicidina. Quando ambos os dímeros de gramicidina estão coincidentes (Figura 4.2a), os iões de sódio conseguem passar pelo canal formado e chegar ao reservatório, mantendo um valor de condutância. Porém na presença da biomolécula alvo (Figura 4.2b), vai ocorrer uma interação com o bioreceptor que tem como consequência o desalinhamento do canal iónico formado pelas moléculas de gramicidina e que vai impedir a chegada dos iões de sódio ao reservatório e diminuir o valor de condutância detetado. A sensibilidade do sensor é elevada sendo capaz de detetar concentrações de proteínas ao nível picomolar (13,39).

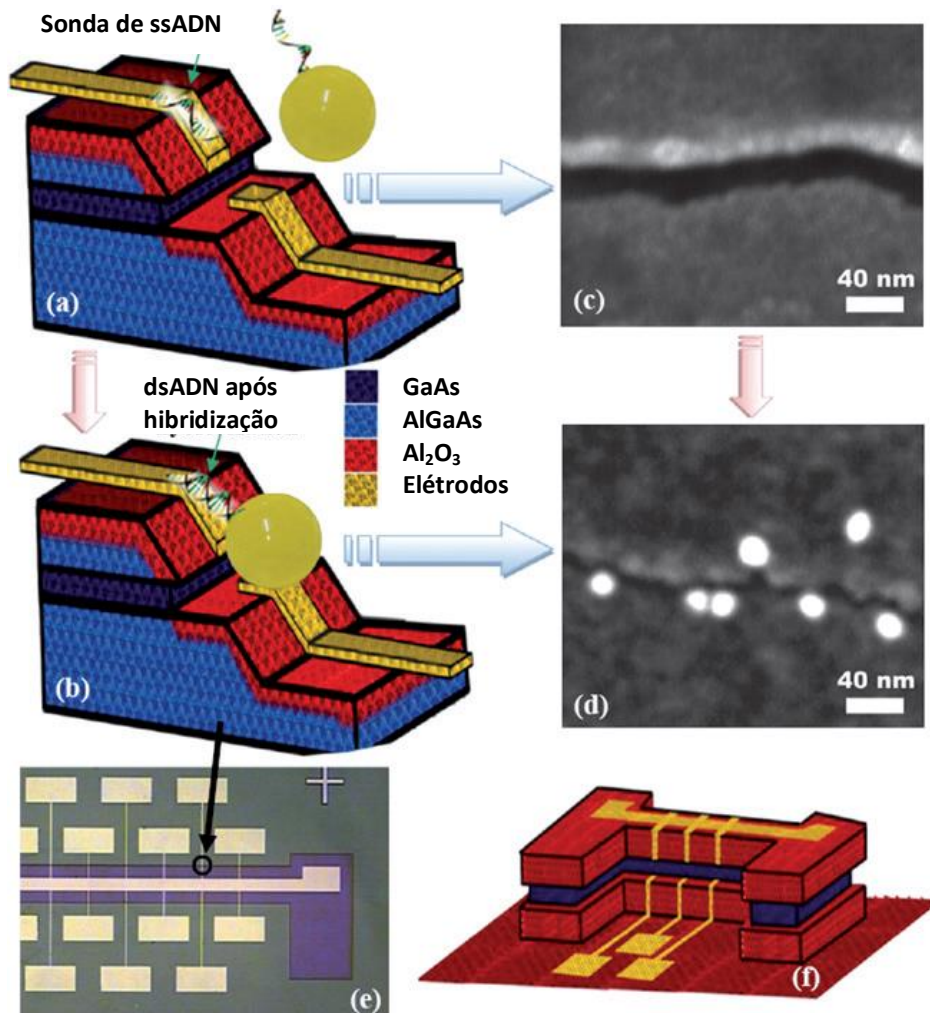


**Figura 4.2-** Esquema de funcionamento de um nanobiossensor de canais iônicos. Em a) o canal iônico está ativado com ambos os dímeros de gramicidina emparelhados a permitirem a passagem do íon  $\text{Na}^+$  mas quando ocorre ligação com o analito específico, em b), esse canal desaparece alterando o valor de condutância (adaptado de 39)

#### 4.5- Nanobiossensores Eletrônicos

Os nanobiossensores eletrônicos distinguem-se pela sua ampla integrabilidade, fácil leitura e alta sensibilidade. A sua estrutura baseia-se, na maioria dos casos, num “interruptor à escala nano” em que existem dois eletrodos separados por uma fenda e cuja presença e posicionamento de uma biomolécula alvo associada a uma espécie condutora altera a condutância elétrica do sistema. É disso exemplo o trabalho desenvolvido por Giuseppe Maruccio e a sua equipa na criação de um nanobiossensor elétrico para a deteção de hibridização do ADN. Os eletrodos foram colocados com uma distância de aproximadamente 20 nm e uma sonda de ADN de cadeia simples

selecionada foi fixada num dos eléctrodos (Figura 4.3a). A molécula alvo neste caso corresponde a um oligonucleótidos específico que está conjugado a uma nanopartícula condutiva (nanocristais de ouro). Quando existe a biomolécula alvo em solução vai ocorrer hibridização da cadeia simples de ADN com o oligonucleótido e forma-se uma dupla cadeia de ADN. Além disso o fenómeno de hibridização leva a que a nanopartícula condutiva, anteriormente conjugada, se posicione na fenda entre os dois eléctrodos (Figura 4.3c) o que vai aumentar a condutância eléctrica em relação ao momento em que só existia a fenda. Assim, este aumento de condutância eléctrica pode ser interpretado como a presença de uma nanopartícula de ouro immobilizada e consequentemente, a presença da biomolécula alvo (47,48).



**Figura 4.3-** Representação de um nanossensor electrónico e esquema de detecção. a) o sistema apresenta um local de junção de proporções manométricas e de um dos lados encontra-se immobilizada uma sonda de ADN de cadeia simples. b) após hibridização com a cadeia alvo e a presença das nanopartículas de ouro. É possível verificar a diferença por microscopia electrónica antes hibridização, c), e após hibridização, d). e) e f) correspondem a representações estruturais num plano superior e em 3d. (adaptado de 48)

Um método semelhante ao anterior é utilizado em microchips como o sistema Biodetect<sup>®</sup> para detecção rápida de microrganismos. Neste dispositivo cada chip contém várias sondas de ADN que se poderão ligar ao presente na amostra e formar um fio de ADN. Esse fio sofre de seguida um processo de metalização para permitir a detecção através da alteração da resistência ou outra propriedade elétrica do sensor (13).

#### **4.6- Nanobiossensores Eletroquímicos**

Os nanobiossensores eletroquímicos são dispositivos que podem integrar uma grande variedade de nanomateriais e baseiam-se na detecção de alterações de corrente ou potencial resultantes de interações a nível da interface biomolecular. Os modelos mais simples envolvem a utilização de enzimas de redução capazes de converter um substrato em produto e gerar, direta ou indiretamente através de mediadores de redução, uma resposta elétrica detetável (49,50).

Nos últimos anos sugeriram-se novas biomoléculas como os anticorpos ou os ácidos nucleicos de cadeia simples que têm revelado resultados bastante positivos. O sinal detetado neste caso deriva da elevada especificidade de reconhecimento que existe para o analito de interesse e pode resultar da aproximação e transferência de eletrões de um marcador da biomolécula alvo para o eléctrodo, numa variação da concentração de marcadores eletroquímicos junto do eléctrodo ou através do método de amplificação de nanopartículas e ouro. Os nanobiossensores eletroquímicos baseados em membranas de nanoporos de alumina (óxido de alumínio) são um protótipo utilizado na detecção de vírus com excelentes níveis de sensibilidade e especificidade, sendo capazes de detetar para o vírus do Nilo Ocidental a presença de duas proteínas ou partículas virais por cada 100 mL de amostra (49-51).

#### **4.7- Nanobiossensores de Micro e nanobalança de Quartzo**

O funcionamento dos nanobiossensores de microbalança de quartzo baseia-se na medição de uma variação de frequência de vibração ou oscilação que está diretamente dependente da massa do sistema. A estrutura do sensor consiste num cristal de quartzo, com um corte em AT que proporciona melhores propriedades mecânicas e piezoelétricas, com dois eléctrodos metálicos (ex. ouro) de ambos os lados. Quando é aplicado no sistema um campo elétrico paralelo ao eixo piezoelétrico leva a que uma

onda elástica (onda S) se gere e propague pelo cristal induzindo a sua oscilação. No cristal de quartzo está fixado o bioreceptor que pode ser um anticorpo ou uma cadeia simples de ADN e, quando este interage e se liga ao antigénio respetivo ou cadeia complementar, vai fazer variar a frequência de ressonância,  $\Delta f$  (HZ). Este valor de frequência de ressonância é calculado através da derivação da equação de Sauerbrey: (52,53)

$$I) \quad \Delta f = -2.26 \times 10^{-6} f^2 \frac{\Delta m}{A}$$

A variação da frequência de ressonância,  $\Delta f$  (HZ), para um sistema com uma frequência fundamental do cristal,  $f$  (MHZ) e uma dada área,  $A$  (cm<sup>2</sup>) é diretamente proporcional à variação da massa,  $\Delta m$  (g). Esta variação está ainda dependente da espessura, uniformidade e densidade de quartzo do cristal que são constantes na medição e é aplicável em medições expostas ao ar, sendo necessárias alterações à equação para medições em meio líquido onde tem de ter sido em conta a viscosidade e densidade do meio (52,53).

Na ausência da biomolécula alvo a variação da frequência de ressonância é próxima de zero, no entanto quando está presente ao ligar-se ao bioreceptor faz com que haja um aumento de massa do sensor que se traduz numa diminuição detetável do  $\Delta f$ . Um processo análogo aplica-se aos sensores de nanobalança de quartzo, com algumas reformulações na equação de Sauerbrey. Este tipo de nanosensores apresenta características apropriadas para a deteção de genes ou sequências de genes específicas e verificação da presença de algumas bactérias e vírus. (13,52-54).

#### **4.8- Nanobiossensores Virais**

Um nanobiossensor viral tira partido do facto das partículas virais apresentarem tamanhos nanométricos sendo possível utilizá-las na preparação de sensores capazes de detetar vírus, mARN específico, proteínas e atividade enzimática. Os vírus Herpes Simples (HSV) e o adenovírus são exemplo disso e a sua utilização prende-se com a importância que ambos têm para a patologia humana e no seu uso em vetores virais na terapia genética (13,55).

J. Manuel Perez e a sua equipa desenvolveram um destes sensores que era constituído por nanopartículas com um núcleo superparamagnético de óxido de ferro revestido por uma camada de dextrano onde estavam imobilizados anticorpos específicos da superfície do vírus. Os vírus, neste caso HSV 1 e adenovírus 5, quando presentes na amostra eram reconhecidos pelos anticorpos específicos formando um conjugado e podiam ser detetados através de ressonância magnética nuclear ou por imagem por ressonância magnética. Graças à sua enorme sensibilidade, o sensor era capaz de detetar cinco partículas virais em 10  $\mu\text{L}$  de amostra de soro tornando-o mais sensível do que os métodos baseados em ELISA (13,55).

#### **4.9- Nanobiossensores PEBBLE**

Um nanobiossensor PEBBLE (Probes Encapsulated By Biologically Located Embedding) consiste num sensor molecular de forma esférica com uma dimensão de 20 a 200 nm que é concebido através de um processo de polimerização em microemulsão de uma molécula seletiva para se ligar a um analito alvo numa matriz quimicamente inerte (ex. polímero) para minimizar as interações com componentes celulares. Este sensor tem a capacidade de monitorizar em tempo real um analito alvo tanto fora como dentro da célula, sendo inserido através da biolística, ou também denominada “gene gun”, sem sofrer interferência significativas das proteínas presentes. A deteção ratiométrica pode ser realizada para a presença de iões de cálcio, oxigénio intracelular no citosol ou marcadores tumorais. Apesar dos enormes progressos que têm sido feitos nestes sensores, alguns pontos devem ser ainda melhor esclarecidos nomeadamente o tamanho máximo possível para permitir a inserção do nanossensor na célula por um mecanismo passivo, as propriedades de superfície do nanossensor que possam desencadear mecanismos celulares não compatíveis com o modelo de deteção como é o caso da endocitose ou a estabilidade do nanossensor em diferentes meios biológicos (13,56).

#### **4.10- Nanobiossensores Óticos**

Os nanobiossensores incluídos neste modelo apresentam uma enorme variedade de modos de funcionamento mas têm todos em comum o facto de usufruírem de propriedades óticas para monitorizar e quantificar interações das biomoléculas com a

superfície planificada do sensor. Nasossensores de laser, nanossensores nanoshell ou nanossensores baseados em LSPR (Localized surface plasmon resonance) são alguns exemplos que fazem parte deste grupo (13,57,58).

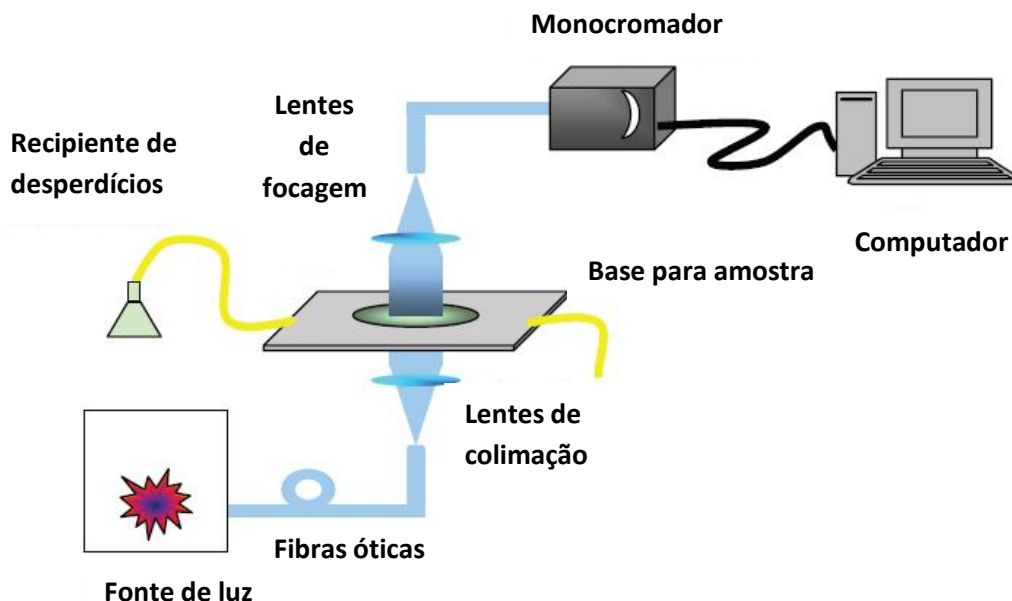
Nos nanossensores de laser é incidida uma luz laser sobre uma fibra que vai gerar um campo eletromagnético na extremidade e vai excitar as moléculas alvo ligadas ao bioreceptor. O sinal ótico advindo dessa interação, que pode ser por exemplo fluorescência, é assim detetado através de um sistema de detecção fotométrico. A sua investigação tem sido direcionada para a detecção de vírus como o HSV e H7N9 (responsável pela gripe aviária em humanos) e proteínas e marcadores em células vivas individuais (13).

Por outro lado existem os nanossensores nanoshell que consistem comumente em nanoesferas com um núcleo de sílica que está revestido por uma camada de um metal. Estas nanoesferas têm a particularidade de aumentar de forma eficiente a magnitude do efeito Raman de uma molécula que consiste na existência de uma fração de luz difundida quando é aplicado um feixe de luz incidente. Cada molécula tem a sua própria difusão Raman pelo qual é possível fazer a sua detecção através deste sensor. A detecção do efeito Raman pode ainda ser otimizada para um comprimento de onda específico uma vez que este é dependente da espessura da camada de metal. Este modelo de sensor tem sido testado para imunoensaios, vetorização de fármacos e diagnóstico de neoplasias (13).

Os nanossensores baseados em LSPR são sistemas em ampla expansão que aproveitam as propriedades únicas das nanopartículas de metais nobres. Estas nanopartículas conseguem exibir uma forte banda de absorção UV-vis que é não observável no espectro dos metais comuns. A banda de absorção surge quando a frequência de luz incidente está em ressonância com a oscilação coletiva dos elétrons condutores e é conhecido como LSPR. Uma excitação do LSPR origina uma absorção de comprimento de onda seletiva com um largo coeficiente de extinção molar de aproximadamente  $3 \times 10^{11} \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ , uma dispersão de Rayleigh com eficácia equivalente a  $10^6$  fluoróforos e um aumento do campo eletromagnético local na superfície das nanopartículas que é responsável pelo intenso sinal observado na espectroscopia amplificada por superfície (57-59).

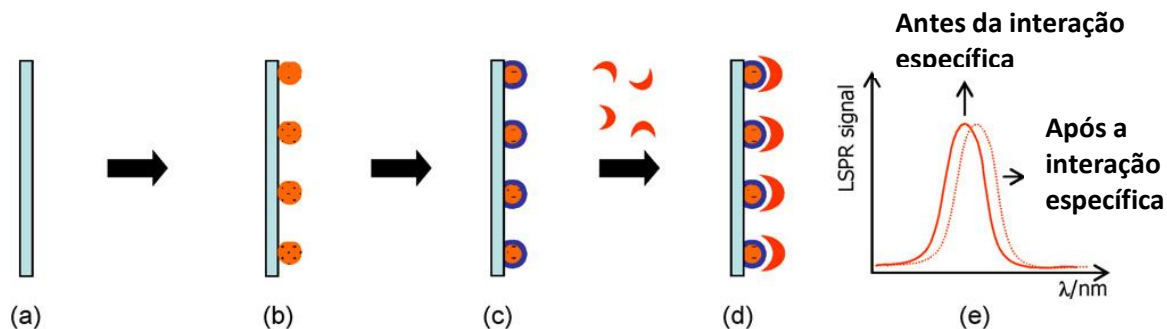
O pico máximo do comprimento de onda ( $\lambda_{\text{max}}$ ) no espectro de LSPR vai depender do tamanho, forma e espaço interparticular das nanopartículas assim como das suas

propriedades dielétricas e do meio local. Um esquema simplificado do funcionamento do sensor está representado na figura 4.4. Para obter a curva do espectro de LSPR são necessários três passos: primeiro é necessário recolher a luz de fundo sem nenhuma emissão ou amostras, depois é necessário recolher a luz de referência sem a presença de sensor e por fim medir a luz transmitida na presença da amostra colocada perpendicularmente à luz incidente (58-60).



**Figura 4.4-** Esquema de um nanobiossensor baseado em LSPR. Uma luz é propaganda pelas fibras ópticas multimodais até às lentes de colimação que vão iluminar o biossensor. Essa luz é depois recolhida nas lentes de focagem e enviada para um monocromador que vai separar a luz proveniente das fibras em luz monocromática para ser analisado por um computador. (adaptado de 58,59)

A especificidade deste nanossensor para um determinado analito é conseguida através da inclusão na superfície da nanopartícula de moléculas com função de bioreceptor que vão interagir com o analito presente na amostra e alterar o índice de refração detetado, fazendo variar o  $\lambda_{max}$  (Figura 4.5). Essa variação vai ser tanto maior quanto a massa do analito em questão que pode ser deste modo quantificada. O nanobiossensor apresenta um LD <1 pM podendo atingir valores altos de femtomolar e tem sido desenvolvido essencialmente como uma alternativa de baixo custo, portátil e de alta sensibilidade para a deteção de proteínas e marcadores tumorais (60,61).



**Figura 4.5-** Etapas na preparação e resposta de um nanobiossensor baseado em LSPR. (a) escolha do substrato. (b) fixação de nanopartículas metálicas por meio de ligações químicas ou por nanolitografia. (c) modificação da superfície do sensor de modo a torná-lo específico a um analito. (d) ligação do analito ao bioreceptor (e) alteração do pico máximo no espetro recolhido (adaptado de 61)

#### 4.11- Biossensores de Nanofios

Este género de sensor é baseado nos nanofios (NW) que são estruturas unidimensionais rígidas que conforme a sua constituição podem ser metálicos (ex. ouro, platina), semicondutores (ex. silício ou nitrito de gálio) ou isolantes (ex. sílica ou dióxido de titânio). A grande maioria destes nanossensores é baseada em FET tal como os CNT com a vantagem de apresentarem uma produção menos complexa. Devido à facilidade em modificar propriedades da superfície dos nanofios, é possível agregar uma molécula para desempenhar a função de bioreceptor. Aquando da interação dessa molécula com o analito alvo é possível detetar uma alteração em tempo real da condutividade do nanofio. Uma abordagem diferente pode ser feita através da não funcionalização do nanofio e ligação do mesmo a dois elétrodos previamente selecionados. Pequenas variações na resistência elétrica possibilitam uma deteção qualitativa de analitos como a amónia ( $\text{NH}_3$ ) ou o óxido nítrico ( $\text{NO}_2$ ) (13,39,62).

As reduzidas dimensões e capacidade dos nanofios em realizar deteções em tempo real, de alta sensibilidade e sem a necessidade de marcar moléculas (designando-se por isso “label-free”) torna-os uma tecnologia potencial para a deteção *in vivo* de anticorpo, proteínas ou agentes patogénicos (13,62).

## **5- Aplicações dos nanobiossensores na área analítica e de diagnóstico**

Os nanobiossensores possuem várias e diversificadas aplicações em áreas tão distintas como a medicina, a indústria ou o ambiente. Na área analítica e de diagnóstico concretamente, a sua investigação tem vindo a crescer amplamente ao longo da última década. Em resultado disso surge a apresentação de numerosos dispositivos e métodos de deteção cada vez mais sofisticados que, comparativamente aos métodos tradicionais, possuem qualidades ou propriedades que os tornam mais vantajosos. Alguns destes sistemas estão inclusive patenteados pelos investigadores ou laboratórios responsáveis devido ao seu potencial para descobertas futuras (4,63).

Atualmente, dado o seu relativo curto período de desenvolvimento, muitos dos nanobiossensores referidos ainda não se encontram disponíveis em larga escala no mercado, restringindo a sua presença sobretudo a alguns hospitais e laboratórios. Os nanobiossensores têm evoluído de forma a se tornarem cada vez mais sensíveis, específicos e portáteis a um baixo custo. Alguns dos processos de deteção destes sensores também poderão ser adaptados com sucesso por exemplo em sistema de configuração “lab-on-chip” com quantidades de amostra necessária muito reduzidas e com capacidade de deteção de vários analitos simultaneamente (13,35).

De seguida são apresentadas as principais aplicações na área analítica e de diagnóstico que os nanobiossensores podem trazer de modo a aperfeiçoar métodos de deteção atuais ou explorar a deteção de novos analitos que até então não eram possíveis de detetar com a exatidão necessária (13).

### **5.1- Diagnóstico e monitorização tumoral**

O cancro é uma doença genética provocada por alterações na sequência de ADN de genes primordiais. Essas mudanças resultam na expressão de genes ou proteínas alteradas ou numa composição de uma proteína diferente nas células tumorais. A não eliminação destas células pode conduzir a uma acumulação de alterações de ADN que leva a uma gradual desregulação do comportamento celular e eventualmente à produção de mais células tumorais. Os tumores são caracterizados por uma divisão celular ilimitada, uma capacidade de invasão dos tecidos próximos e metastização até órgãos distantes, resistência a sinalização de anticrescimento, crescimento autossuficiente,

evasão à apoptose que consiste na morte celular programada e angiogénese sustentada. A palavra cancro congrega mais de 200 doenças distintas que afetam acima de 60 órgãos humanos, constituindo uma das principais causas de morte. O cancro do pulmão, do colon, do pâncreas, da mama nas mulheres, da próstata nos homens e as leucemias, estão entre os que registam um maior número de mortes (64).

É, assim, importante obter métodos sensíveis e específicos que possibilitem um diagnóstico precoce e também permitam avaliar a evolução do cancro e monitorizar a eficácia terapêutica. Um dos métodos mais utilizados é a deteção e quantificação de biomarcadores específicos para o cancro em amostras biológicas. De acordo com o tipo de cancro a investigar, são selecionados alguns biomarcadores previamente estudados. Os níveis de biomarcadores são quantificados e comparados com valores padrão, sendo a sua alteração um indício do desenvolvimento de uma neoplasia. Na Tabela 5.1 surgem alguns exemplos de cancros e os respetivos biomarcadores que permitem a sua avaliação (34,65).

**Tabela 5.1-** Principais biomarcadores para cada tipo de cancro (adaptado de 34)

Localização do cancro	Biomarcadores
<b>Bexiga</b>	BAT, FDP, NMP22, HA-Hase, BLCA-4, CYFRA 21-1
<b>Colon e pâncreas</b>	CEA, CA19-9, CA24-2, p53
<b>Esófago</b>	SCC
<b>Fígado</b>	AFP, CEA
<b>Gástrico</b>	CA72-4, CEA, CA19-9
<b>Mama</b>	CA15-3, CA125, CA27.29, CEABRCA1, BRCA2, MUC-1, CEA, NY-BR-1, ING-1
<b>Ovário</b>	CA125, AFP, hCG, p53, CEA
<b>Próstata</b>	PSA, PAP
<b>Pulmão</b>	NY-ESO-1, CEA, CA19-9, SCC, CYFRA21-1, NSE
<b>Testículo</b>	$\alpha$ -fetoproteína (AFP), $\beta$ - gonadotropina coriônica humana, CAGE-1, ESO-1

Os nanobiossensores podem ser uma ótima alternativa aos métodos tradicionais para a detecção destes biomarcadores, uma vez que fornecem um meio de quantificação viável de analitos em baixas concentrações e podem inclusive ser úteis na identificação de novas moléculas características dos diferentes tumores. Atualmente existem vários estudos realizados para detecção de diferentes biomarcadores por meio de nanobiossensores. Está também em fase de desenvolvimento um dispositivo portátil, apoiado por fundos da União Europeia (UE), denominado BioFinger<sup>®</sup> que utiliza um sistema de nanocantilevers e permite a detecção de cancro, entre outras doenças. Foi demonstrado que este aparelho tinha a capacidade de detetar, entre outros analitos, proteínas específicas do cancro da próstata em amostras de sangue com um custo reduzido (cada medição/chip tinha um valor de aproximadamente 8€) e num pequeno espaço de tempo (15 a 20 minutos) (13,27).

A utilização de sistemas baseados em LSPR tem sido muito proveitosa para criar métodos de detecção sensíveis aliados à especificidade, conseguida através de interações do tipo anticorpo-antigénio. São exemplos os trabalhos desenvolvidos por Phuoc Long Truong et al e Jialing Yuan et al que desenvolveram nanobiossensores para a detecção do biomarcador proteína PSA (antigénio específico da próstata) e HE4 (proteína secretora 4 do epidídimo humano), associado ao cancro no ovário. Também recorrendo ao mesmo modelo de sensor foi possível detetar de uma forma praticável a proteína p53, um importante supressor tumoral que se encontra presente na corrente sanguínea em alguns casos de cancro mas com uma taxa muito considerável no tumor das células escamosas da cabeça e pescoço (59,66,67).

Distintos sensores foram igualmente capazes de quantificar biomarcadores com a apresentação de resultados favoráveis. Um sensor com base em SWCNT foi criado para medir os níveis do marcador tumoral VEGF (fator de crescimento endotelial vascular), uma citocina responsável pela promoção da angeogénese e que permite a distinção entre células normais e células tumorais, para o caso do cancro da mama. Identicamente um nanobiossensor de microbalança de quartzo foi proposta para a identificação de Rho GTPases, responsáveis pelo controlo da proliferação celular e considerado um potencial marcador tumoral (68,69).

Para além do estudo de biomarcadores específicos para determinados cancros tem também surgido o interesse em analisar alguns que estejam presentes na maioria dos casos de cancro. É o caso da enzima telomerase, uma ribonucleoproteína que sofre uma

sobre-expressão em 85 a 90% dos tumores humanos e cuja função é catalisar a manutenção dos telómeros, necessária para a imortalização da célula. Xin Ting Zheng et al propuseram um método de detecção de telomerasas no núcleo das células a partir de um nanobiossensor ótico e ELISA. Neste protocolo foram desenvolvidas nanosondas de fibra ótica envolvidas numa camada de prata, que eram funcionalizadas com anti-telomerasas na sua superfície e inseriram-nas no núcleo de células cancerígenas MCF-7. Após um período de incubação de 30 minutos para permitir a ligação às telomerasas, as sondas foram removidas e lavadas. Seguiu-se um imunoensaio ELISA em sanduíche onde a nanosonda foi incubada durante 1 hora numa solução a 0.1 mg/mL de anti-telomerase marcada com biotina, foi lavada com PBS contendo 0.5% de Tween 20 para remover as ligações inespecíficas, novamente incubada durante 1 hora mas desta vez com um conjugado de streptavidina-fosfatase alcalina a 0.2 mg/mL e por fim lavada. De forma a confirmar a presença da telomerase foi adicionada uma solução de DDAO-fosfato a 0.05 mM que iria servir de substrato a enzima fosfatase e permitiria deste modo distinguir uma alteração na medição da fluorescência face aos valores do núcleo de uma célula normal. Este método de detecção poderá não só servir para a detecção de cancro mas também para detecção de outros biomarcadores que inclusivamente pode ser feita em células vivas com a utilização somente do nanobiossensor (70).

Para a avaliação da progressão de um tumor é relevante ter em conta a presença de células tumorais circulantes (CTCs) nos fluidos fisiológicos e que podem ser resultantes da libertação de um tumor principal ou de um processo de metastização. A sua quantificação pode permitir uma predição do prognóstico do doente ou a verificação da eficácia do tratamento terapêutico. Dado a sua reduzida concentração e grande variedade é extremamente difícil encontrar um método suficientemente sensível para a sua detecção. O sistema Cell Search<sup>®</sup> é atualmente um dos poucos métodos de detecção de CTCs aprovados pela UE e FDA (Food and Drug Administration) e baseia-se na detecção do marcador epitelial epCAM. No entanto estudos recentes evidenciam que o epCAM não é necessariamente expresso em todos os tipos de cancro como acontece em alguns cancros da mama, e algumas das CTC sofrem um processo de transição epitelial para mesenquimal perdendo a expressão do epCAM. Como tal este método apresenta algumas limitações que têm sido colmatadas através de métodos mais recentes que utilizam RT/PCR para marcadores de ARN pré-selecionados, para um dado tipo de cancro. Um nanobiossensor baseado em nanofios foi criado por James A. Siooss e a sua

equipa para deteção de PCA3, um ARN não codificante que está significativamente aumentado no cancro da próstata, através da ligação com um oligonucleótido antisense. Este é ainda um modelo relativamente recente mas que estima atingir uma deteção de aproximadamente 1 CTC por cada 10 ml de amostra de sangue. Um desenvolvimento mais detalhado pode levar a criação de, por exemplo, um microarrays para pesquisa de vários ARN de diferentes tipos de cancro (71,72).

## **5.2- Monitorização dos níveis de glucose**

A glucose é um monossacarídeo de 6 carbonos e a principal fonte de energia para as células. Os níveis de glucose no sangue, em condições normais, variam entre 70 a 120 mg/dL, no entanto na presença de estados fisiopatológicos estes níveis podem atingir os 30 a 500 mg/dL. A diabetes mellitus, uma doença metabólica, é caracterizada por variações nos níveis sanguíneos de glucose e no qual é de extrema relevância o seu controlo diário. De acordo com a WHO existiam no ano 2000 aproximadamente 171 milhões de pessoas com diabetes no mundo e é expetável que esse número suba para mais do dobro em 2030. A esta doença estão associados, a longo prazo, manifestações a nível da retina, sistema circulatório ou rins que representam complicações para a saúde humana e que podem por em risco a vida do doente. Os níveis de glucose no sangue também podem surgir consideravelmente alterados em indivíduos não diabéticos como consequência de uma cirurgia ou doença aguda (40,73).

De modo a monitorizar os níveis de glucose e evitar complicações associadas a hiper ou hipoglicémia existe um número notável de estudos que descrevem diferentes métodos de deteção e vários instrumentos de diagnóstico disponíveis no mercado. A maioria dos métodos atuais de medição da glucose baseiam-se na utilização da enzima glucose oxidase, que é responsável pela conversão da glucose em gluconolactona e peróxido de hidrogénio. Contudo estes métodos ainda possuem algumas limitações que continuam a ser investigadas a fim de contorná-las, tal como o facto de outras espécies eletroatrativas presentes nas amostras biológicas, como o ácido ascórbico ou o ácido úrico, poderem causar interferência ou de a enzima ser facilmente desnaturada ou solta durante o seu processo de imobilização, o que a torna pouca estável, afetando a medição. Outros métodos mais recentes sem a necessidade da enzima começam a surgir também na literatura (40,74).

Os nanobiossensores apresentam grande potencialidade como sistemas de deteção dos níveis de glucose no sangue. O grande crescimento da nanotecnologia e a exploração das propriedades únicas dos nanomateriais tem providenciado novos meios de imobilização da enzima glucose oxidase e permitido de igual modo a otimização do design e fabrico de sensores não enzimáticos. Apesar de ainda não existir nenhum destes sistemas à venda no mercado, existem vários pedidos de patente no European Patent Office e inúmeros estudos que demonstram a sua eficácia em fornecer dados de alta sensibilidade e especificidade (Tabela 5.2) (40,75).

Os modelos para a deteção da glucose são muito variados, no entanto a maioria centra-se em métodos óticos e eletroquímicos. A utilização da enzima glucose oxidase, tal como foi referido, é das técnicas frequentemente empregues. A deteção pode ser realizada através da avaliação do oxigénio gasto ou do consumo de peróxido de hidrogénio ou ácido na reação da enzima. Este método tem vindo a ser melhorado com novas técnicas de imobilização, como é o caso do estudo de Frank N. Crespilho e a sua equipa que apresentaram um método de imobilização da enzima através de uma reação de reticulação com o glutaraldeído numa nanoestrutura bimembranar contendo nanopartículas de ouro e hexacianoferrato de cobalto, um mediador redox. A imobilização da enzima também foi demonstrada ser possível numa membrana composta por quitosano, através de ligações covalentes com os seus grupos funcionais  $-NH_2$  e  $-OH$ . Neste caso como o quitosano apresenta baixa condutividade, sendo esta necessária para encaminhar o sinal elétrico até o transdutor, foram adicionados ao sistema nanotubos de carbono (30,76,77).

**Tabela 5.2-** Exemplos de alguns nanobiossensores desenvolvidos com o respectivo sistema de transdução, estabilidade e limite de detecção/margem dinâmica (adaptado de 18)

	Nanosistema	Sistema de Transdução	Estabilidade	LD/ Margem Dinâmica
Nanopartículas	Grafeno e nanopartículas de ouro sobre um eletrodo de ouro	Amperométrico	2 semanas	180 $\mu$ M
	Nanogel Híbrido de nanopartículas de prata encoberta num gel copolímero de um derivado de ácido fenilborónico.	Ótico	—	0–30 mM
	Hidrogel de quitosano em nanopartículas de ouro	Eletroquímico	5 semanas	2.7 $\mu$ M; 5.0 $\mu$ M–2.4 mM
Nanotubos	Película de polipirrole eletropolimerizada em CNT	Cronoamperimétrico	3 minutos em uso ou 1 semana conservado	0.2 mM
	Ouro/MWCNT	Amperimétrico	3 meses	0.01mM; 0.05–13mM
	MWCNTs disperses em polihistidina em eletrodos de vidro de carbono)	Amperimétrico	15 dias	2.2 $\mu$ M
Nanofios e nanofibras	Nanofios de prata	Eletroquímico	10 dias	2.83 $\mu$ M
	Nanofios de chumbo modificados com nanopartículas de ouro	Cronoamperimétrico	70 dias	2 $\mu$ M
	Nanofibras de Mn <sub>2</sub> O <sub>3</sub> –Ag	Amperimétrico	—	1.73 $\mu$ M
Nanocompostos	Nanocoloides de ouro em eletrodo de ouro modificado com politiramina	Capacitativo	1 dia	1 $\times$ 10 <sup>-6</sup> M
	Grafeno protegido por polivinilpirrolidona	Voltamétrico	1 semana	0–14 mM
	Quantum dots de CdS incorporados em microgel de derivado de ácido fenilborónico	Fluorescência	—	0–10.8 mM

Nos métodos não enzimáticos são utilizadas moléculas em que se conheça a sua capacidade de reconhecimento específico para a glucose. A integração de derivados do ácido borónico, que se ligam com a glucose a pH fisiológico, com quantum dots ou nanopartículas de prata foi demonstrada ser uma boa opção uma vez que, na presença do analito, permitiu a deteção de alterações no gráfico de fluorescência. Outras moléculas também já foram estudadas e obtiveram resultados positivos como bioreceptor, como é o caso da proteína concanavalina A num nanobiossensor baseado em FRET, ou uma mutação da proteína recetora de glucose e galactose de *E. coli* marcada com cisteína e imobilizada em nanoporos revestidos por nanopartículas de ouro que permitem a deteção da glucose pelo aumento da condutividade eletrolítica (46,73,76,78).

Para além do desenvolvimento de nanobiossensores isoladamente têm existido também tentativas de os incorporar em outros sistemas para uma monitorização mais fácil da glucose. É o caso dos nanorobôs que, embora ainda não exista nenhum projeto com estudos comprovados de eficácia e segurança, já estão a ser dados os primeiros passos para o seu desenvolvimento. A sua criação traria inúmeras vantagens tais como a desnecessidade de indivíduos diabéticos colherem sangue todos os dias, um controlo em tempo-real dos níveis de glucose, permitindo atuar rapidamente em caso de hiper ou hipoglicemia e a deteção em várias zonas do corpo ao mesmo tempo, que forneceria informação sobre anomalias no transporte da glucose a um órgão, tecido ou vaso sanguíneo específico (79).

Apesar de a nanotecnologia fornecer as ferramentas necessárias para a miniaturização de sensores e já terem sido criados modelos computacionais que simulam as condições do corpo humano existem algumas questões que carecem de mais estudos. Entre elas estão a capacidade dos nanorobôs circularem livremente no corpo humano sem serem detetados pelo sistema imunitário como um corpo estranho ou a eliminação fisiológica dos sistemas que estima virem a ter um período de meia-vida para a inativação espontânea de cerca de 3 meses. Vários esforços têm sido realizados para tornar esta tecnologia disponível e espera-se que nos próximos anos se iniciem os primeiros ensaios *in vivo* (79).

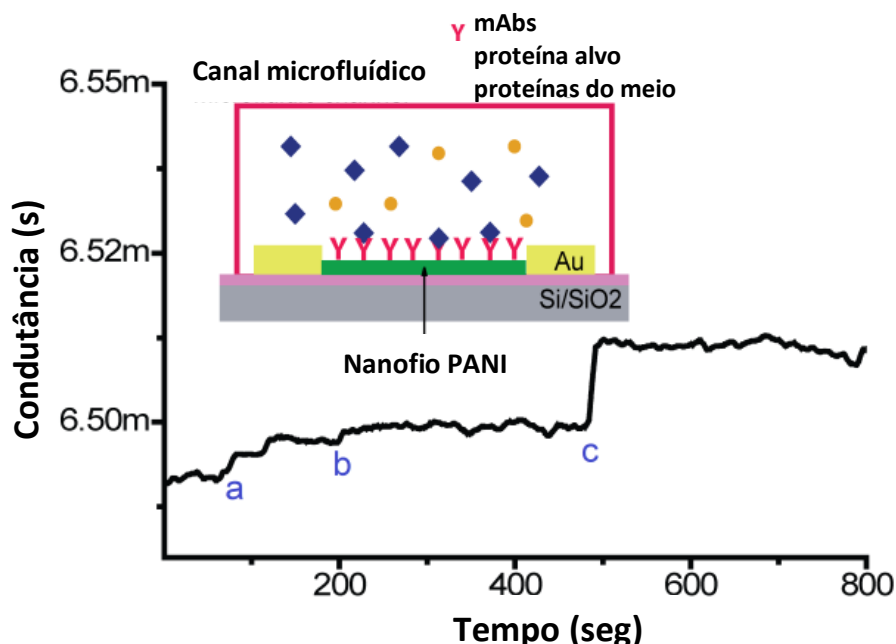
### 5.3- Avaliação de Doenças Cardiovasculares

As aplicações dos nanobiossensores também se estendem à detecção de doenças cardiovasculares. Tal como no cancro existem algumas biomoléculas em baixas concentrações na corrente sanguínea cujo a sua detecção e controlo permite tirar conclusões acerca do diagnóstico do doente. A mioglobina (Myo), troponina cardíaca I (cTNI), isoenzima MB da creatina quinase (CK-MB), peptídeo natriurético tipo B (BNP) ou proteína C reativa são alguns exemplos de marcadores cardíacos utilizados para avaliar a função cardíaca. Para o caso de um enfarte cardíaco é possível observar o aparecimento prévio da mioglobina como resultado de uma lesão miocárdica. A mioglobina apresenta um tamanho reduzido de 17.8 kDa o que permite uma rápida libertação para a circulação. Os seus valores durante o enfarte sobem rapidamente para 12–76 ng/ml nas mulheres e 19–92 ng/ml nos homens e continuam a subir até atingirem o valor máximo 8 a 12h após que pode chegar aos 1500 ng/ml. Apesar da sua variação durante o processo de necrose do miocárdio, não é um marcador cardíaco específico uma vez que também pode ser encontrado nos tecidos do músculo-esquelético. Níveis aumentados de mioglobina podem inclusivamente ser detetados em doentes com insuficiência renal, contusões ou traumas musculares. Como tal é importante que o diagnóstico seja feito de uma forma rápida, com alta sensibilidade e se possível com a informação de mais do que um marcador cardíaco (16,80-82).

Neste momento existem já publicados alguns trabalhos de demonstração de modelos de nanobiossensores funcionais. É o caso de Elena Suprun et al que desenvolveram um nanobiossensor para detecção de mioglobina em plasma não diluído. Este sistema era baseado num método eletroquímico em que na presença da mioglobina cardíaca na amostra existiria uma transferência direta de eletrões entre o grupo heme Fe(III) da mesma e a superfície de um eléctrodo. Para que tal ocorre-se foi necessária a modificação da superfície do eléctrodo, por um lado com nanopartículas de ouro num filme de bromido de didodecildimetilamónio para aumentar a eficácia da transferência de eletrões, e com anti-mioglobina para assegurar uma boa captação do analito através de interações antigénio-anticorpo. O sistema permitia uma rápida detecção, de aproximadamente 30 minutos para obter um resultado e não necessitava de mais do que 1-2 µL de plasma sem pré-tratamentos especiais (16).

Um trabalho desenvolvido na Universidade de Pittsburgh, Estados Unidos da América, demonstrou um modelo diferente capaz de detetar quatro marcadores

cardíacos distintos: Myo, cTnI, CK-MB e BNP. A Myo é uma proteína ideal como marcador cardíaco mas tal como foi referido a sua validade como único indicador para diagnóstico é questionável pelo que o grupo decidiu fortalecer o método do seu nanossensor ao adicionar os outros marcadores. Níveis anormais de CK-MB e BNP estão inclusive associados à recorrência de enfarte do miocárdio e outras doenças cardiovasculares. O modelo era baseado num biossensor composto por nanofios de polianilina, onde estavam imobilizados os diferentes anticorpos monoclonais (mAbs) de cada marcador e por elétrodos de ouro, tudo sobre uma base de Si/SiO<sub>2</sub>. Foi incluído ainda a utilização de um canal microfluídico que vem contribuir para uma melhor deteção dos analitos pelo controlo que garantiu do fluxo das soluções no nanofio, estabilidade do sistema e um melhor manuseamento das amostras. A deteção dos marcadores foi possível devido às alterações na condutância que eram visíveis na presença do analito com conseqüente ligação aos mAbs (81).



**Figura 5.1-** Gráfico da variação da condutância em função do tempo e esquema do nanossensor de nanofios PANI. a) adição de tampão fosfato salino; b) adição de albumina sérica bovina; c) adição de marcador cardíaco específico (adaptado de 80)

Na Figura 5.1 é possível observar uma representação do nanobiossensor produzido e um gráfico genérico dos valores de condutância em função do tempo. O ponto “a” corresponde à injeção de tampão fosfato salino (PBS) no nanossensor enquanto é aplicada uma corrente estática de 50  $\mu$ A que é analisada por um

semiconductor que monitoriza as variações de voltagem entre os dois elétrodos. Este procedimento permite obter o valor base de condutância. O fluxo laminar é atingido no canal microfluídico com uma injeção de 0.03 mL/min prevenindo assim a quebra dos nanofios e variações de condutância originada por fenómenos de turbulência. No ponto “b” é adicionada albumina sérica bovina (BSA) e serve como teste de especificidade do sensor. É de esperar que após a BSA chegar aos nanofios, uma vez que esta não contém o marcador cardíaco específico do teste, o valor de condutância não varie significativamente, como se observa no gráfico. Após verificada a especificidade é adicionado o marcador cardíaco específico (ponto “c”) e notou-se um repentino aumento do valor de condutância como resultado da interação dos mAcS com o biomarcador alvo (81).

De forma a comprovar a viabilidade do nanobiossensor para utilização em diagnóstico prático foi ainda testado a capacidade de deteção do biomarcador cardíaco em presença de BSA ou de outros marcadores cardíacos não direccionados. Os resultados obtidos foram bastante positivos para todos os biomarcadores e é esperado, embora não tivesse sido demonstrado, que os limites de deteção para Myo, cTnI, CK-MB e BNP poderiam chegar a valores tao baixos como 100 pg/mL, 250 fg/mL, 150 fg/mL, and 50 fg/mL, respetivamente (81).

Um outro sistema foi proposto por Shalini Prasad e a sua equipa como alternativa aos métodos tradicionais para a deteção dos marcadores BNP e proteína C reativa, dois marcadores associados a problemas cardíacos adversos quando encontrados em amostras clínicas com concentrações de pg/mL. O nanobiossensor era constituído por uma plataforma de silicone com uma superfície de ouro e uma membrana de nanoporos de alumina. O modo de funcionamento deste biossensor baseava-se na alteração dos valores de impedância quando as proteínas recetores específicas anti-proteína C reativa ou anti-BNP, localizadas na zona mais exposta do sensor, interagem com o seu antígeno específico. O sistema apresentou um limite de deteção de 1 fg/mL para a proteína C reativa e 1 ag/mL BNP perspetivando-o como uma potencial tecnologia para o diagnóstico real de amostras biológicas humanas (82).

O sistema SensiDx<sup>®</sup> é um nanobiossensor comercializado baseado em canais iónicos que já existe em alguns hospitais e é utilizado em situações clínicas graves que requerem um diagnóstico rápido, como é o caso da deteção de marcadores cardíacos para prevenção de ataques cardíacos. O facto de apresentar valores precisos e diminuir o

tempo de análise de horas para alguns minutos facilita as decisões clínicas e diminuem os custos de tratamento (13).

#### **5.4- Controle de fármacos**

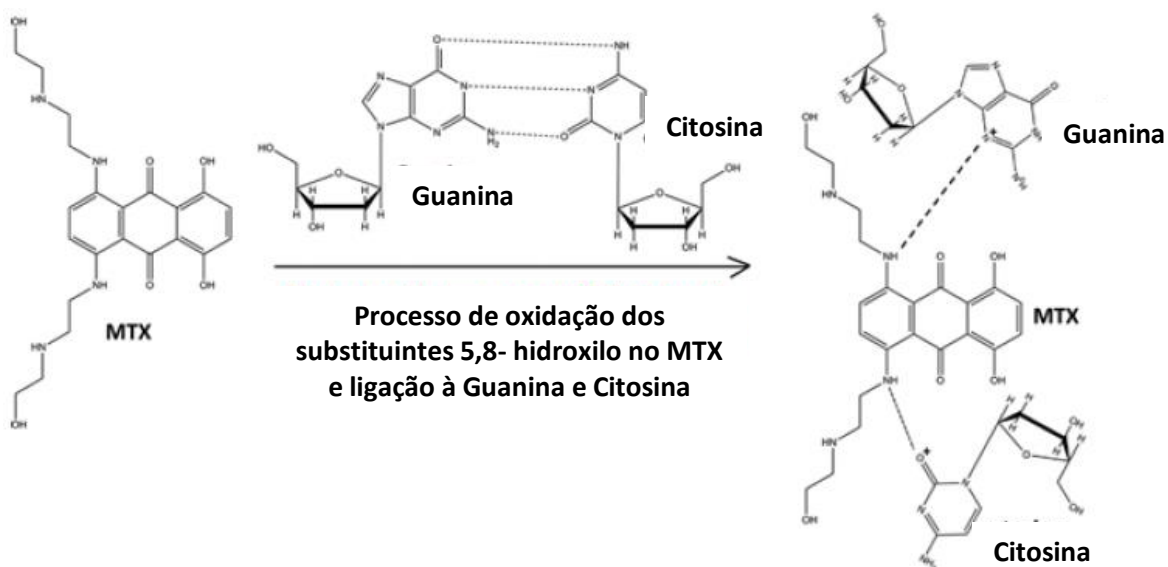
A detecção de analitos produzidos pelo próprio organismo é sem dúvida o objetivo comum à maioria dos nanobiossensores apresentados acima. Porém torna-se também vantajoso a detecção de algumas substâncias de origem exógena ao corpo humano tal como os fármacos. A sua monitorização clínica permitiria não só verificar a sua eficácia mas também ajustar doses terapêuticas quando necessário e precaver possíveis efeitos de toxicidade. Esta é uma vertente relativamente recente, embora já existam modelos de nanobiossensores que demonstraram serem capazes de detetar alguns fármacos ou estudar a sua interação com o ADN humano. Estes biossensores destinam-se numa primeira fase apenas como o meio de apoio na investigação de novos fármacos ou do estudo de efeitos tóxicos (42,83).

Um dos métodos utilizados baseia-se em proteínas P450 para detetar o metabolismo de compostos farmacológicos. O nanobiossensor apresentado por E. Iwuoha e a sua equipa demonstrou ser capaz de detetar a sertralina (comercializado em Portugal como Zoloft<sup>®</sup> pela Pfizer ou medicamento genérico), um fármaco inibidor da recaptção da serotonina utilizado para o tratamento de ansiedade, depressão e transtorno obsessivo-compulsivo, stress pós-traumático entre outras patologias. Contudo a sua toma, especialmente num período prolongado, pode originar alguns efeitos secundários como complicações gastrointestinais, nervosismo e agitação, disfunção sexual ou aumento de peso. Os efeitos são mais notados quando a dose tomada é superior à necessária e origina em alguns casos a desistência por parte do doente em relação ao tratamento farmacológico (84,85).

Foi demonstrado que este fármaco poderia ser determinado em amostras de sangue ou plasma através de um nanobiossensor constituído por nanotubos de ácido poli 8-anilino-1-naftaleno sulfónico e citocromo P450-2D6 (CYP2D6) depositado sobre um eléctrodo de ouro. Partindo da premissa que a sertralina possa ser um inibidor do CYP2D6, o sistema Au/PANSA/CYP2D6 foi testado e tal como esperado ocorreu a redução da sertralina em N-desmetilsertralina acompanhada de uma alteração de corrente que foi monitorizada. O limite de detecção para este método foi de 0.13 mM e apresentou um bom tempo de resposta. Devido à saturação do nanossensor a sua

aplicação não é indicada em amostras de casos de overdose do fármaco ou indivíduos que se tenha conhecimento de serem metabolizadores ultra-rápidos. Além da sertralina um outro modelo com o mesmo princípio foi demonstrado para a detecção de benzafetamina (83,84).

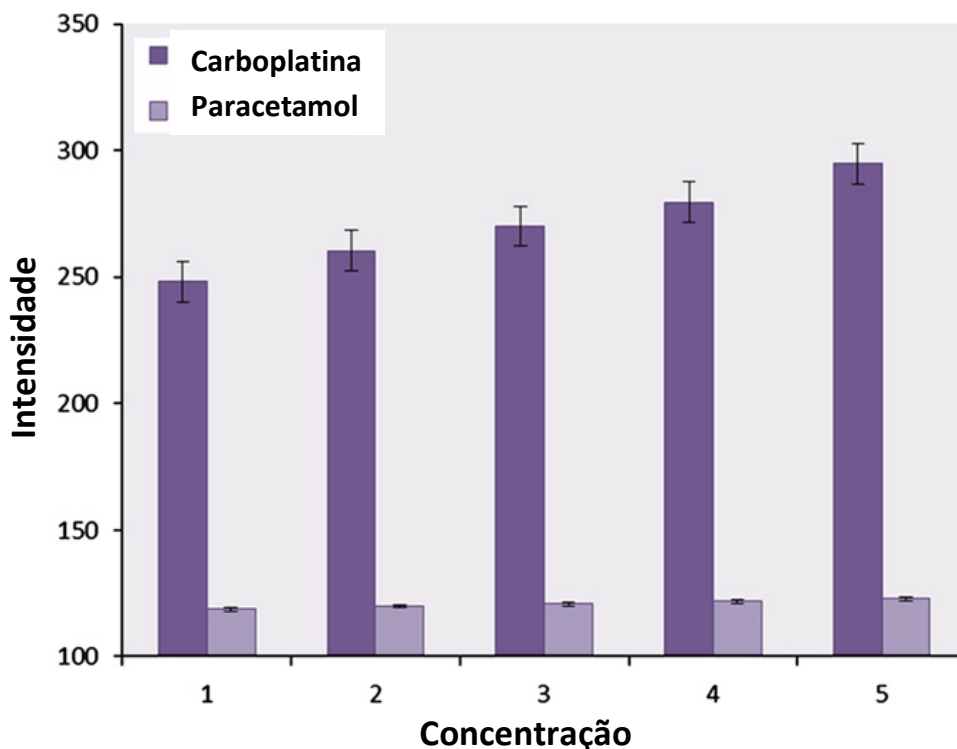
Para estudar a interação de fármacos com o ADN e conseqüentemente a sua toxicidade *in vitro* foram desenvolvidos alguns modelos. Esta monitorização possui grande importância sobretudo em fármacos para o tratamento de tumores que, por serem muito agressivos, requerem uma investigação aprofundada antes da sua aprovação para utilização. Um exemplo destes modelos foi o criado Amitkumar N. Lad e Y. K. Agrawal que permitiam detetar a interação do ADN com a mitoxantrona (MTX), um potente anticancerígeno. O nanobiossensor era constituído por MWCNTs funcionalizados com grupos carboxilo aos quais se encontrava imobilizado o ADN. Ao ser exposto a uma solução de mitoxantrona foi possível observar uma alteração na resistência do nanossensor. Tal como é representado na Figura 5.2, a MTX interatua principalmente entre os pares de bases guanina e citosina da ligação de ADN. A alteração de resistência é resultado do processo de oxidação de dois elétrons da substituição 5,8- hidroxil no MTX aquando da interação com o ADN (42).



**Figura 5.2-** Representação do mecanismo de interação do MTX com as bases nucleotídicas do ADN (adaptado de 42)

A partir do nanossensor foi possível perceber que a interação MTX-ADN se iniciava rapidamente com uma grande alteração da resistência mas que com o tempo ia perdendo velocidade pelo menor número de interações. O sistema permitia assim uma monitorização da interação de ADN com um fármaco, não necessariamente a mitoxantrona, pela variação do potencial da interface do sensor (42).

Ainda o mesmo grupo de cientistas desenvolveu um outro nanobiossensor, desta vez ótico, com a finalidade de estudar as interações do ADN com a carboplatina, um fármaco citotóxico que pode ligar-se e danificar o ADN. O nanossensor possuía partículas de ouro marcadas com ADN e baseava-se no fenómeno FRET. Os valores de intensidade de fluorescência foram medidos para a interação carboplatina-ADN e comparados com um padrão, o paracetamol, um fármaco analgésico não intercalante e que estudos *in vitro* anteriores demonstraram apenas uma interação marginal com o ADN. Os resultados apresentados na Figura 5.3 comprovaram a veracidade do método, com uma intensidade de fluorescência muito superior para a carboplatina como era expetável em comparação com o paracetamol. Este método tal como o anterior é pioneiro para o desenvolvimento no futuro de sistemas de monitorização de interações fármaco-ADN e tecnologia de avaliação toxicológica (86).

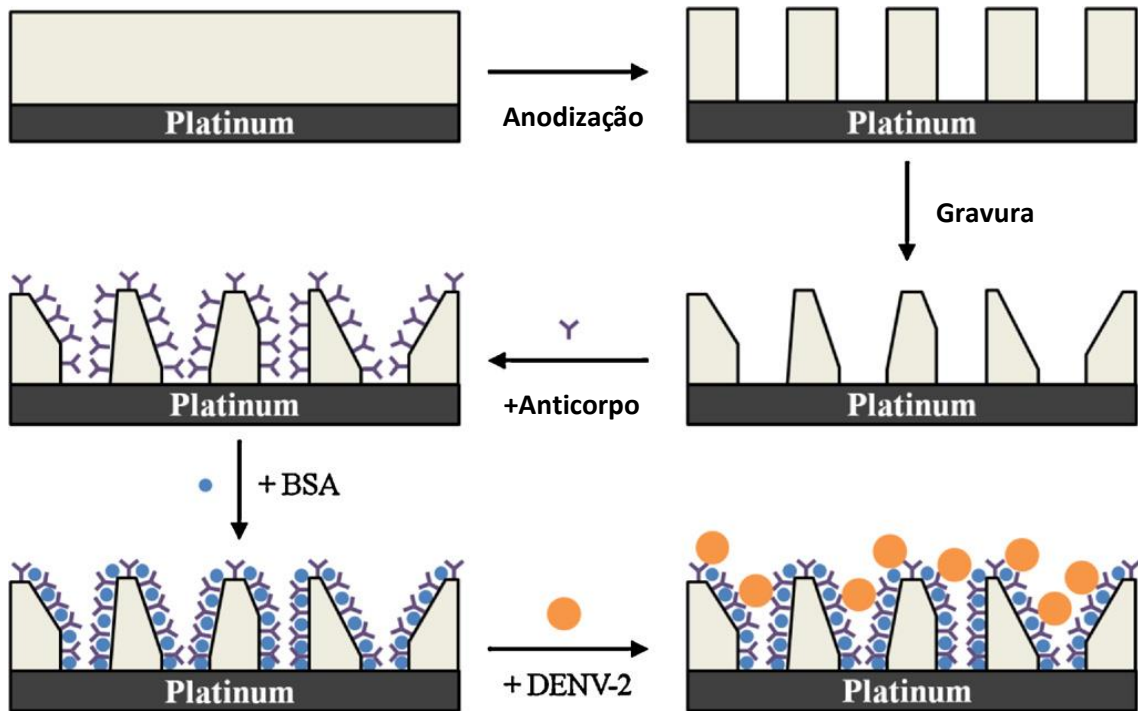


**Figura 5.3-** Gráfico da intensidade de fluorescência em função da concentração das amostras de carboplatina e paracetamol. À medida que se aumenta a concentração das amostras (de 1 para 5) as interações vão aumentando para o caso da carboplatina, no entanto para o paracetamol a intensidade mantém-se praticamente constante. (Adaptado de 86)

## 5.5- Microbiologia e Virologia

A detecção de bactérias e vírus é outra das aplicações dos nanobiossensores, com enorme potencial clínico na detecção rápida de agentes patogénicos. Com a sua utilização é possível ultrapassar algumas limitações que os métodos tradicionais de análise apresentam, como por exemplo a necessidade de em alguns vírus ser realizada uma incubação e verificação do seu crescimento. Este procedimento pode levar dias a semanas tornando-se dispendioso e prejudicando a saúde do doente que aguarda para iniciar uma terapêutica direcionada ao seu problema. A longa espera entre a colheita da amostra e o resultado do diagnóstico é inclusive um fator que leva a que alguns médicos, com intuito de combater a patologia do doente, prescrevam antibióticos para infeções que desconhecem ter afinal uma origem viral. Além do tempo do teste, o baixo custo também é um aspeto relevante especialmente para diagnóstico de doenças infecciosas em países em desenvolvimento (87,88).

O vírus do dengue tipo 2, DENV-2, é um dos principais patógenos que pode ser encontrado na literatura com nanobiossensores desenhados para a avaliação dos seus níveis. De todos os serotipos este é o mais comum e aquele que tem maior propensão a causar a forma mais severa da doença, durante a infeção secundária. Um dos sistemas mais utilizados, embora com pequenas alterações entre os diferentes grupos de investigadores que os desenvolveram, é baseado num nanobiossensor eletroquímico constituído por uma membrana de nanoporos de alumina. Partindo do trabalho de Ming Soon Cheng et al. o biossensor foi construído como surge representado na Figura 5.4. Inicialmente foi preparado a superfície do elétrodo de modo a criar os nanoporos, que de seguida foram preenchidos com anticorpo anti-DENV-2 por adsorção física. Após lavagem para retirar os anticorpos não ligados, o BSA foi adicionado para bloquear locais de ligação não específicos. A presença de DENV-2 numa amostra seria detetada e quantificada através da variação de corrente no elétrodo num período de 50 minutos e com um limite de 1 pfu/mL (17,51,89).



**Figura 5.4-** Design de um nanobiossensor eletroquímico para a detecção de DENV-2. A superfície do biossensor sofre anodização e gravura para formar os nanoporos. São adicionados anticorpos anti-DENV-2 na 3ª etapa e BSA na 4ª etapa. Após adição de DENV-2 este vai interagir com o anticorpo anteriormente adicionado (adaptado de 17).

Outros nanossensores já foram desenvolvidos para a detecção de vírus e bactérias que afetem diretamente a saúde humana tais o vírus do Nilo Ocidental, *Legionella pneumophilla* e enterotoxina B de *Staphylococcus aureus*. Neste momento todos os sensores apresentados destinam-se à detecção de somente um agente viral ou bacteriano, tornando esta tecnologia demasiado focada na confirmação de um diagnóstico que se pressupõe à partida mas com o avanço científico e um maior número de estudos espera-se poder criar um sistema capaz de integrar informação de vários agentes patogênicos (19,49,90).

### 5.6- Estudo da função celular e detecção de ácidos nucleicos

A célula representa nos sistemas vivos a unidade mínima funcional e comunicação integrada. A investigação do funcionamento da célula tem sido uma área amplamente explorada com o estudo da sinalização física e química, a produção de proteínas e substâncias específicas, ou como é regulado o seu ciclo e que implicações

tem para um determinado tecido ou órgão, entre outros. Um melhor conhecimento da célula pode trazer benefícios a nível da criação de fármacos vetorizados para atuar apenas numa região predeterminada ou precaver os seus efeitos de toxicidade e perceber a evolução de algumas doenças associadas a modificações celulares como por exemplo o cancro (91).

Para estudar a presença de alguns analitos na célula com a extrapolação dos resultados em mecanismos macroscópicos, alguns investigadores desenvolveram nanobiossensores para o efeito. Os sistemas encontram-se numa fase ainda inicial mas as características de especificidade e sensibilidade tem dados sinais positivos da sua aplicação. As espécies reativas de oxigénio são um dos alvos de deteção intracelular dos nanobiossensores. Dois modelos foram apresentados por Allan K. Poulsen et al. e Kavitha Thandavan et al para a sua deteção baseados num nanossensor ótico construído a partir da atividade da enzima horseradish peroxidase e num eletroquímico que utilizava a enzima superóxido dismutase, respetivamente (92,93).

A deteção de ATP (Adenosina Trifosfato) em tempo real é outra das aplicações que foi comprovado ser possível realizar com esta tecnologia. Esta molécula tem uma enorme importância para a célula visto ser um intermediário multifuncional de processos como o transporte de iões através da membrana, reações biosintéticas e mobilidade celular. Para a execução deste nanobiossensor foi selecionado como bioreceptor, aptámeros de ADN que se ligavam preferencialmente ao ATP. Um dos inconvenientes do uso de aptámeros foi a presença de nucleases na meio intracelular que poderiam comprometer o nanossensor, no entanto esse detalhe foi ultrapassada pela encapsulação em nanopartículas de poliacrilamida. O biossensor apresentou uma boa capacidade de sensibilidade conseguindo detetar concentrações de ATP entre os 0.5 e 8 mM comprovando a sua utilidade para monitorização da cinética de reações que envolvam consumo de ATP (94).

Tal como referido anteriormente, o estudo dos mecanismos celulares tem auxiliado na compreensão dos diferentes fenómenos que despoletam o cancro. Uma das etapas mais críticas no ciclo da célula é a apoptose. No processo de morte celular programada, resultante de um processo normal ou de um dano irreparável no ADN, são ativadas inicialmente as cisteína aspartato proteases (também denominadas caspases). Algumas caspases, nomeadamente a caspase 3, são responsáveis por clivar proteínas essenciais para a célula, de que são exemplos a fragmentação do ADN e a poli(ADP-

ribose) polimerase. Uma vez que estas biomoléculas encontram-se presentes no princípio do processo, são um dos biomarcadores ideais para estudar a apoptose numa fase inicial. A indução da apoptose tem sido um dos métodos mais utilizados para testar a deteção da atividade destas enzimas por nanobiossensores óticos. Para além da caspase, foi também desenvolvido um nanobiossensor para a deteção do citocromo c, uma proteína com um papel fundamental no processo de geração de energia celular, que se encontra nas mitocôndrias mas quando estas são lesadas a sua libertação para o citoplasma desencadeia uma cascata de eventos celulares que podem levar à apoptose. Os resultados obtidos por ambos os sistemas são promissores e proporcionam um novo método de análise minimamente invasivo para analitos em células vivas individuais (21,95).

A deteção de ácidos nucleicos é igualmente relevante, especialmente em áreas como a genética, que permitiria detetar certas doenças a partir da avaliação de locais específicos do ADN. A deteção de um gene mutante de uma célula cancerígena, o BRAF<sup>V599E</sup>, foi realizada por método de hibridização de ADN imobilizado na superfície de um nanofio de silicone. A ligação por complementaridade de ambas as cadeias simples de ADN produziria uma variação detetável na corrente elétrica que permitiria identificar concentrações do gene mutante na ordem do sub-femtomolar. Além dos nanofios, os nanotubos de carbono e métodos baseados em FRET têm sido investigados para esta aplicação que tem presentes no mercado o Genelyzer<sup>®</sup> e o CombiMatrix Electra-Sense<sup>®</sup>, dois sistemas de análise de genes capazes de analisar milhares de genes diferentes (96,97).

### **5.7- Determinação de outros analitos com significado clínico**

Os nanobiossensores possuem uma grande variedade de biomoléculas já estudadas e comprovadas de que podem ser medidos por estes sistemas. A deteção e quantificação de algumas dessas biomoléculas pode ser essencial para o diagnóstico de uma doença ou avaliação da terapêutica. Um dos analitos que não foi referido nos tópicos anteriores mas igualmente importância é a acetilcolina. A acetilcolina é um neurotransmissor que pode ser encontrado no sistema nervoso central, medula espinal, junções neuromusculares, e neurónios pregangliónicos e motores. A sua principal função é permitir a transmissão do impulso nas sinapses colinérgicas. Estudos demonstraram que a acumulação de acetilcolina nos tecidos nervosos, devido à

incapacidade de metabolização de alguns indivíduos, leva a uma desregulação da sua concentração e pode causar doenças neuronais tais como doença de Parkinson, doença de Alzheimer, miastenia grave, demência progressiva ou esquizofrenia. A utilização de nanobiossensores eletroquímicos tem sido apontada como preferencial comparativamente aos métodos atuais por potenciometria ou cromatografia a gás associada a espectrometria de massa, apresentando boa sensibilidade e uma resposta estável (98-100).

Está também descrita na literatura a produção de outros nanobiossensores capazes de realizar a deteção de outros analitos com significado clínico tais como creatinina, ácido úrico, dopamina e ácido ascórbico, existindo inclusive um dispositivo capaz de detetar simultaneamente os últimos três (101-103).

## **6- Outras aplicações e o seu papel na saúde pública**

Os nanobiossensores, com os seus vários modelos, permitem a identificação de uma vasta gama de analitos em meios que podem não ser necessariamente amostras biológicas. Além das aplicações anteriormente referidas existem ainda outras que, de uma forma indireta, podem auxiliar na proteção da saúde pública. Estas aplicações estão ligadas ao controlo de algumas substâncias nocivas para o Ser Humano que podem estar presentes em alimentos ou água contaminados (104).

Os pesticidas são um exemplo dessas substâncias, vulgarmente utilizadas na agricultura. O seu efeito de erradicação eficiente de insetos e plantas indesejáveis, proporciona uma maior produtividade dos terrenos, mas tem como consequência a possibilidade de contaminação da atmosfera e conservação de resíduos em produtos agrícolas e canais de água. Estas substâncias apresentam toxicidade crónica e estudos demonstram que o seu consumo, num período prolongado de tempo, possa afetar o sistema nervoso central, podendo causar problemas a nível respiratório, miocárdico e neuromuscular que podem inclusive levar à morte. Para tal é necessário que os níveis destes compostos sejam constante e rigorosamente medidos em amostras biológicas e ambientais. A União Europeia definiu como níveis máximos de resíduos, permitidos por lei para um pesticida não específico, o valor de 0.1 µg/L para a água potável e 0.01 mg/Kg para bens alimentares (104-107).

No caso dos pesticidas organofosfatos foi produzido um nanobiossensor de MWCNT na superfície de um eletrodo de carbono em vidro que era capaz de detectar, através da variação na corrente elétrica, a presença do pesticida paratião com um limite de detecção de  $1 \times 10^{-9}$  mol/l. Foi ainda proposto e desenvolvido outro sistema semelhante ao anterior com um menor limite de detecção, em que ao MWCNT estava adsorvida à enzima organofósforo hidrolase responsável por converter compostos organofosfatos em p-nitrofenol, os quais são detetáveis pela observação de uma corrente anódica estável. Também surgem alguns modelos para a detecção de herbicidas como o glifosato, o glufosinato e o 2,4-dinitrofenol (DNP). Este último é o composto ativo de mais de 1500 herbicidas, cujo a detecção e quantificação foi demonstrada por dois métodos diferentes: através de um sistema amperimétrico com o citocromo P450 3A4 imobilizado sobre uma matriz de sepulcrato de Nafion-cobalto(III), NafCo(Sep)<sup>3+</sup>, ou através de um nanobiossensor colorimétrico baseado nas propriedades óticas das nanopartículas de ouro e da interação anticorpo- antigénio, em particular do anticorpo anti-DNP e a toxina modelo DNP-glicina (105,106,108,109).

Além dos pesticidas surge também a necessidade de detectar a presença de espécies patogénicas como bactérias, vírus ou fungos. Muitos destes microrganismos são responsáveis por enormes gastos na indústria alimentar e vários casos de intoxicações alimentares apresentando um grave risco para a saúde, especialmente em grupos mais vulneráveis como crianças, idosos, grávidas ou doentes com um sistema imunitário debilitado. Entre as espécies mais comumente associadas a contaminação de alimentos encontram-se a *Salmonella spp*, a *Escherichia coli*, a *Listeria monocytogene*, o vírus sincicial respiratório e os parasitas protozoários *Cryptosporidium* e *Giardia*. Na Tabela 6.1 surgem agrupados alguns exemplos de nanobiossensores desenvolvidos por investigadores e os pesticidas/agentes patogénicos detetados, assim como os limites de detecção respetivos (104,110,111).

**Tabela 6.1-** Exemplos de nanobiossensores na detecção de agentes patogênicos e pesticidas. (adaptado de 104)

	Nanomaterial usado	Analito	Amostra	Limite De Detecção
Electroquímico	Agentes Patogênicos			
	Nanopartículas de ouro (25 nM)	<i>Salmonella spp</i>	Carne de porco	1.0 X 10 <sup>2</sup> CFU/mL
	Nanopartículas de ouro (13 nM)	<i>Escherichia coli O157:H7</i>	Leite	50 CFU/tira
	Nanopartículas de ouro (15 nM)	<i>Salmonella typhi</i>	PBS	98.9 CFU/mL
	Pesticidas			
	Nanopartículas de ZrO <sub>2</sub> (22 nM)	Paratião	Solução Padrão (pH 2.0-7.0)	3 ng/mL
MWCNT	Paraoxon	Padrão fosfato (pH 7.4)	150 nM	
Óticos	Agentes Patogênicos			
	Nanorods de ouro (68 nm x 18 nm)	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Cloreto de sódio	—
	Ouro/MWCNT	<i>Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis</i>	Leite	10 <sup>3</sup> células/mL
	Pesticidas			
	Quantum dots CdTe	2,4 D (herbicida)	PBS (pH 7.4)	250 pg/mL
Nanopartículas de ouro (25 nM)	Paraoxon	Padrão de glicina (pH 9.0)	—	

Por fim existe também a capacidade de os nanobiossensores detetarem a presença de alimentos transgênicos. É o caso do trabalho desenvolvido por Chen Jiang e a sua equipa que produziram um método de deteção dos genes que codificam a fosfinotricina acetiltransferase (gene PAT) e a óxido nítrico sintase (gene NOS) numa amostra de feijão transgenicamente modificado. O nanobiossensor eletroquímico com uma sonda de ADN específica apresentou boa estabilidade, adequada seletividade e alta sensibilidade. A aptidão em detetar alimentos transgênicos é muito vantajosa para garantir que as políticas de alguns países são respeitadas, no que concerne à limitação do cultivo deste produto, mas mais importante ainda é a capacidade de aviso prévio de substâncias alergénicas ao consumidor. Num estudo realizado em soja transgénica em que foi inserida um gene da noz brasileira *Bertholletia excelsa* que codificava a albumina 2S, um conhecido alérgeno, foi demonstrado que através de engenharia genética era possível passar um alérgeno para um produto transgénico. Desta forma com a deteção de um produto transgénico pode ser possível realizar uma distinção desses produtos e assim precaver muitas das reações adversas inesperadas (112,113).

## 7- Conclusão

A Nanotecnologia tem contribuído nos últimos 20 anos para grandes avanços da ciência em diversas áreas, nomeadamente na saúde. Esta tem sido um apoio na investigação e criação de novos meios terapêuticos e novos métodos de diagnóstico. Entre estes últimos destacam-se os nanobiossensores, sistemas nanométricos destinados à deteção de biomoléculas alvo. Os nanobiossensores ideais apresentam alta sensibilidade e especificidade, baixo custo, robustez, portabilidade, facilidade de manuseamento, fornecimento dos dados em tempo real e a capacidade de detetar mais do que um analito.

Os tipos de nanobiossensores são muito variados com apresentações de bioreceptores ou transdutores diferentes entre si que proporcionam também uma enorme adaptabilidade. Apesar de serem uma tecnologia ainda recente, a sua expansão tem sido notória na literatura e estima-se que na próxima década substituirão, para algumas análises, métodos tradicionais como ELISA e PCR em hospitais e laboratórios.

Dado possuírem uma capacidade de deteção precisa num curto espaço de tempo, a sua aplicação no diagnóstico de patologias que necessitam de uma resposta imediata

como o enfarte do miocárdio é muito relevante. O seu baixo custo e portabilidade irão permitir também o diagnóstico em regiões desfavorecidas onde não existam recursos para material de análises. O apoio que trará na investigação permitirá entre outras vantagens, o estudo das propriedades de novos fármacos e a sua toxicologia com ADN, detecção de diversos analitos a baixas concentrações e estudo de vários fenómenos celulares, especialmente ligados ao aparecimento de tumores. Não só à saúde se restringem as aplicações mas também a agricultura, indústria, ambiente e controlo alimentar.

Embora seja espectável que haja uma evolução gradual dos nanobiossensores de um modo geral, muitos autores indicam os sistemas baseados em nanotubos de carbono e nanofios como aqueles que mais se destacarão no futuro. Contudo são necessários alguns melhoramentos nos sistemas atuais e existe ainda muito por explorar nesta área mas perspectivas-se que esta tecnologia vingue num futuro próximo.

## 8- Bibliografia

- [1] World Health Organization. The top 10 causes of death. 2014. [Acedido a 23 de Agosto de 2014] Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs310/en/>
- [2] Abegunde DO, Mathers CD, Adam T, Ortegon M, Strong K.. The burden and costs of chronic diseases in low-income and middle-income countries. *Lancet*. 2007;370(9603):1929-1938.
- [3] Alharbi KK, Al-sheikh YA. Role and implications of nanodiagnostics in the changing trends of clinical diagnosis. *Saudi J Biol Sci*. 2014;21(2):109-117.
- [4] Bawa R, Bawa SR, Maebius SB, Flynn T, Wei C. Protecting new ideas and inventions in nanomedicine with patents. *Nanomed-Nanotechnol*. 2005;1(2):150-158.
- [5] Sahoo SK, Parveen S, Panda JJ. The present and future of nanotechnology in human health care. *Nanomed-Nanotechnol*. 2007;3(1):20-31.
- [6] Choi, Jeong-Woo, Byung-Keun O, Kim Y, Min J. Nanotechnology in Biodevices. *J Microbiol Biotechn*. 2007;17(1):5-14.
- [7] Mangematin V, Walsh S. The future of nanotechnologies. *Technovation*. 2012;32(3-4):157-160.
- [8] Drexler KE. Engines of Creation: The Coming Era of Nanotechnology. New York: Anchor Press; 1986;pp:198–203.
- [9] Pal'tsev MA, Kiselev VI, Sveshnikov PG. Nanotechnology in Medicine. *Her Russ Acad Sci+*. 2009;79(4):369-377.
- [10] Bhushan B. Springer Handbook of Nanotechnology. 2ª Edição, Berlim: Springer Science & Business Media; 2007;pp: 467-471.
- [11] Horton MA, Khan A. Medical nanotechnology in the UK: a perspective from the London Centre for Nanotechnology. *Nanomed-Nanotechnol*. 2006;2(1):42-48.
- [12] Boisseau P, Loubaton B. Nanomedicine, nanotechnology in medicine. *C R Phys*. 2011; 12(7):620-636.
- [13] Jain KK. The Handbook of Nanomedicine. Basel: Humana Press; 2008; pp:1-4,9-12,91-109.
- [14] Balasubramanian K, Kern K. Label-Free Electrical Biodetection Using Carbon Nanostructures. *Adv Mater*. 2014;26(8):1154-75.
- [15] Bellan LM, Diana WD, Langer RS. Current trends in nanobiosensor technology. *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol*. 2011;3(3):229-246.
- [16] Suprun E, Bulko T, Lisitsa A, Gnedenko O, Ivanov A, Schumyantseva V, et al. Electrochemical nanobiosensor for express diagnosis of acute myocardial infarction in undiluted plasma. *Biosens Bioelectron*. 2010;25(7):1694-1698.
- [17] Cheng MS, Ho JS, Tan CH, Wong JP, Ng LC, Toh C. Development of an electrochemical membrane-based nanobiosensor for ultrasensitive detection of dengue virus. *Anal Chim Acta*. 2012;725:74- 80.

- [18] Shirale DJ, Bangar MA, Park M, Yates MV, Chen W, Myung NV, et al. Label-Free Chemiresistive Immunosensors for Viruses. *Environ. Sci. Technol.* 2010;44(23):9030-9035.
- [19] Rai V, Deng J, Toh C. Electrochemical nanoporous alumina membrane-based label-free DNA biosensor for the detection of *Legionella sp.* *Talanta.* 2012;98:112-117.
- [20] Lee SH, Sung JH, Park TH. Nanomaterial-Based Biosensor as an Emerging Tool for Biomedical Applications. *Ann Biomed Eng.* 2011;40(6):1384-1397.
- [21] Vo-Dinh T, Kasili P, Wabuyele M. Nanoprobes and nanobiosensors for monitoring and imaging individual living cells. *Nanomed-Nanotechnol.* 2006;2(1):22-30.
- [22] Newman JD, Setford SJ. Enzymatic Biosensors. *Mol Biotechnol.* 2006;32(3):250-268
- [23] Huang L, Guo Y, Peng Z, Porter AL. Characterising a technology development at the stage of early emerging applications: nanomaterial enhanced biosensors. *Technol Anal Strateg.* 2011;23(5):527-544.
- [24] Rai V, Acharya S, Dey N. Implications of Nanobiosensors in Agriculture. *J Biomater Nanobiotechnol.* 2012;3(2):315-324.
- [25] Carrascosa LG, Moreno M, Álvarez M., Lechuga LM. Nanomechanical biosensors: a new sensing tool. *Trends Anal. Chem.* 2006;25(3):196-206.
- [26] Pathak P, Katiyar VK, Giri S. Cancer Research - Nanoparticles, Nanobiosensors and Their Use in Cancer Research. *AZojono J Nanotech Online.* 2007;3:1-14.
- [27] Tothill IE. Biosensors for cancer markers diagnosis. *Semin Cell Dev Biol.* 2009;20(1):55-62.
- [28] Vo-Dinh T, Cullum BM, Stokes DL. Nanosensors and biochips: frontiers in biomolecular diagnostics. *Sensor Actuat B-Chem.* 2001;74(1-3):2-11.
- [29] Vo-Dinh T. Nanobiosensors. *Encyclopedia of Nanoscience and Nanotechnology.* 2004;6:53-60.
- [30] Susanto H, Samsudin AM, Rokhati N, Widiasta IN. Immobilization of glucose oxidase on chitosan-based porous composite membranes and their potential use in biosensors. *Enzyme Microb Tech.* 2013;52(6-7):386-392.
- [31] Ciminelli C, Campanella CM, Dell'Olio F, Campanella CE, Armenise MN. Label-free optical resonant sensors for biochemical applications. *Prog Quant Electron.* 2013;37(2):51-107.
- [32] Sakai-Kato K, Ishikura K. Integration of biomolecules into analytical systems by means of silica sol-gel technology. *Anal Sci.* 2009;25(8):969-978.
- [33] Monošík R, Stred'anský M, Šturdík E. Biosensors - classification, characterization and new trends. *Acta Chim Slov.* 2012;5(1):109-120.
- [34] Fracchiolla NS, Artuso S, Cortelezzi A. Biosensors in Clinical Practice: Focus on Oncohematology. *Sensors.* 2013;13(5):6423-6447.
- [35] Choi C. Integrated nanobiosensor technology for biomedical application. *Nanobiosensors in Disease Diagnosis.* 2012;1:1-4.

- [36] Erickson D, Mandal S, Yang AJ, Cordovez B. Nanobiosensors: optofluidic, electrical and mechanical approaches to biomolecular detection at the nanoscale. *Microfluid Nanofluid.* 2008;4(1):33-52.
- [37] Alvarez M, Lechuga LM. Microcantilever-based platforms as biosensing tools. *Analyst.* 2010;135(5):827-836.
- [38] Burg TP, Manalis SR. Suspended microchannel resonators for biomolecular detection. *Appl Phys Lett.* 2003;83(13):2698-2700.
- [39] Riu J, Maroto A, Rius FX. Nanosensors in environmental analysis. *Talanta.* 2006;69(2):288-301.
- [40] Scognamiglio V. Nanotechnology in glucose monitoring: Advances and challenges in the last 10 years. *Biosens Bioelectron.* 2013;47:12-25.
- [41] Shamsipur M, Asgari M, Maragheh MG, Moosavi-Movahedi AA. A novel impedimetric nanobiosensor for low level determination of hydrogen peroxide based on biocatalysis of catalase. *Bioelectrochemistry.* 2012;83:31-37.
- [42] Lad AN, Agrawal YK. Multi-wall carbon nanotube-based DNA nanosensor for determining Mitoxantrone-DNA interaction *in-vitro*. *Instrum Sci Technol.* 2013;41(3):325-334.
- [43] Aoki K, Komatsu N, Hirata E, Kamioka Y, Matsuda M. Stable expression of FRET biosensors: A new light in cancer research. *Cancer Sci.* 2012;103(4):614-619.
- [44] Day RN, Davidson MW. Fluorescent proteins for FRET microscopy: Monitoring protein interactions in living cells. *Bioessays.* 2012;34(5):341-350.
- [45] Shanehsaz M, Mohsenifar A, Hasannia S, Pirooznia N, Samaei Y, Shamsipur M. Detection of *Helicobacter pylori* with a nanobiosensor based on fluorescence resonance energy transfer using CdTe quantum dots. *Microchim Acta.* 2013;180(3-4):195-202.
- [46] Tang B, Cao L, Xu K, Zhuo L, Ge J, Li Q, et al. A New Nanobiosensor for Glucose with High Sensitivity and Selectivity in Serum Based on Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET) between CdTe Quantum Dots and Au Nanoparticles. *Chem. Eur. J.* 2008;14(12):3637-3644.
- [47] Maruccio G, Primiceri E, Marzo P, Arima V. A nanobiosensor to detect single hybridization events. *Analyst.* 2009;134(12):2458-2461.
- [48] Ah CS, Yun YJ, Park HJ, Jung SK, Kim W, Ha DH, et al. Electric detection of DNA hybridization by nanoparticle nanoswitch. *Curr Appl Phys.* 2006;6S1:e157-e160.
- [49] Nguyen BT, Koh G, Lim HS, Chua AJ, Ng MM, Toh C, et al. Membrane-Based Electrochemical Nanobiosensor for the Detection of Virus. *Anal. Chem.* 2009;81(17):7226-7234.
- [50] Sadik OA, Aluoch AO, Zhou A. Status of biomolecular recognition using electrochemical techniques. *Biosens Bioelectron.* 2009;24(9):2749-2765.
- [51] Nguyen BT, Peh AE, Chee CY, Fink K, Chow VT, Ng MM, et al. Electrochemical impedance spectroscopy characterization of nanoporous alumina dengue virus biosensor. *Bioelectrochemistry.* 2012;88:15-21.

- [52] Choudhary MK, Agrawal R, Kumar R, Singh P, Gupta BR, Singh KP. Detection of cadmium-resistant rhizobacteria using piezoelectric nanobiosensor. *Int J Nanosci Ser.* 2010;9(5):461-469.
- [53] Cho N, Cheong KH, Lee C, Frank CW, Glenn JS. Binding Dynamics of Hepatitis C Virus' NS5A Amphipathic Peptide to Cell and Model Membranes. *J Virol.* 2007;81(12): 6682–6689.
- [54] Abdolreza Mirmohseni A, Rostamizadeh K. Quartz Crystal Nanobalance in Conjunction with Principal Component Analysis for Identification of Volatile Organic Compounds. *Sensors.* 2006;6(4):324-334
- [55] Perez JM, Simeone FJ, Saeki Y, Josephson L, Weissleder R. Viral-Induced Self-Assembly of Magnetic Nanoparticles Allows the Detection of Viral Particles in Biological Media. *J Am Chem Soc.* 2003;125(34):10192-10193.
- [56] Baù L, Tecilla P, Mancin F. Sensing with fluorescent nanoparticles. *Nanoscale.* 2011;3(1):121-133.
- [57] Borisov SM, Klimant I. Optical nanosensors—smart tools in bioanalytics. *Analyst.* 2008;133(10):1302-1307.
- [58] Zhu S, Li F, Du C, Fu Y. A localized surface plasmon resonance nanosensor based on rhombic Ag nanoparticle array. *Sensor Actuat B-Chem.* 2008;134(1):193-198.
- [59] Zhou W, Ma Y, Yang H, Luo X. A label-free biosensor based on silver nanoparticles array for clinical detection of serum p53 in head and neck squamous cell carcinoma. *Int J Nanomed.* 2011;6:381-386.
- [60] Riboh JC, Haes AJ, McFarland AD, Yonzon CR, Duyne RP. A Nanoscale Optical Biosensor: Real-Time Immunoassay in Physiological Buffer Enabled by Improved Nanoparticle Adhesion. *J Phys Chem B.* 2003;107(8):1772-1780.
- [61] Sepúlveda B, Angelomé PC, Lechuga LM, Liz-Marzán LM. LSPR-based nanobiosensors. *Nano Today.* 2009;4:244-251.
- [62] Chopra N, Gavalas VG, Bachas LG, Hinds BJ. Functional One-Dimensional Nanomaterials: Applications in Nanoscale Biosensors, *Anal Lett.* 2007;40(11):2067-2096.
- [63] Jain KK. Applications of Nanobiotechnology in Clinical Diagnostics. *Clin Chem.* 2007;53(11):2002-2009.
- [64] Rasooly A., Jacobson J. Development of biosensors for cancer clinical testing. *Biosens Bioelectron.* 2006;21(10):1851-1858.
- [65] Adhikari R, Thapa S. Infectious Diseases and Nanomedicine I. First International Conference on Infectious Diseases and Nanomedicine. 15-18 de dezembro de 2012; Kathmandu, Nepal. Springer;2014.33-35.
- [66] Truong PL, Cao C, Park S, Kim M, Sim SJ. A new method for non-labeling attomolar detection of diseases based on an individual gold nanorod immunosensor. *Lab Chip.* 2011;11(15):2591-2597.
- [67] Yuan J, Duan R, Yang H, Luo X, Xi M. Detection of serum human epididymis secretory protein 4 in patients with ovarian cancer using a label-free biosensor based on localized surface plasmon resonance. *Int J Nanomed.* 2012;7:2921-2928.

- [68] Prabhulkar S, Li C. Electrical Immuno Nanosensor for Breast Cancer Biomarker Assay. 3rd International Conference on. 11-13 de junho de 2009; Beijing. Bioinformatics and Biomedical Engineering; 2009.1-4.
- [69] Martínez-Rivas A, Chinestra P, Favre G, Pinaud S, Séverac C, Faye J, et al. Detection of label-free cancer biomarkers using nickel nanoislands and quartz crystal microbalance. *Int J Nanomed*. 2010;5:661-668.
- [70] Zheng XT, Li CM. Single living cell detection of telomerase over-expression for cancer detection by an optical fiber nanobiosensor. *Biosens Bioelectron*. 2010;25(6):1548-1552.
- [71] Costa MM, Escosura-Muñiz A, Nogués C, Barrios L, Ibáñez E, Merkoçi A. Simple Monitoring of Cancer Cells Using Nanoparticles. *Nano Lett*. 2012;12(8):4164-4171.
- [72] Sioss JA, Bhiladvala RB, Pan W, Li M, Patrick S, Xin P, et al. Nanoresonator chip-based RNA sensor strategy for detection of circulating tumor cells: response using PCA3 as a prostate cancer marker. *Nanomed-Nanotechnol*. 2012;8(6):1017-1025.
- [73] Wu W, Zhou T, Aiello M, Zhuo S. Construction of optical glucose nanobiosensor with high sensitivity and selectivity at physiological pH on the basis of organic-inorganic hybrid microgels. *Biosens Bioelectron*. 2010;25(12):2603-2610.
- [74] Huang J, Zhang L, Liang R, Qiu J. “On-off” switchable electrochemical affinity nanobiosensor based on graphene oxide for ultrasensitive glucose sensing. *Biosens Bioelectron*. 2013;41:430-435.
- [75] Espacenet. Patent search. [accedido em 8 de setembro de 2014]. Disponível em: [http://worldwide.espacenet.com/searchResults?compact=false&AB=glucose+nano&ST=advanced&TI=sensor&locale=en\\_EP&DB=EPODOC](http://worldwide.espacenet.com/searchResults?compact=false&AB=glucose+nano&ST=advanced&TI=sensor&locale=en_EP&DB=EPODOC)
- [76] Cao K, Jiang X, Yan S, Zhan L, Wu W. Phenylboronic acid modified silver nanoparticles for colorimetric dynamic analysis of glucose. *Biosens Bioelectron*. 2014;52:188-195.
- [77] Crespilho FN, Ghica ME, Caridade C, Oliveira ON, Brett CM. Enzyme immobilisation on electroactive nanostructured membranes (ENM): Optimised architectures for biosensing. *Talanta*. 2008;76(4):922-928.
- [78] Tripathi A, Wang J, Luck LA, Suni II. Nanobiosensor Design Utilizing a Periplasmic E. coli Receptor Protein Immobilized within Au/Polycarbonate Nanopores. *Anal Chem*. 2007;79(3):1266-1270.
- [79] Cavalcanti A., Shirinzadeh B., Kretly L.C. Medical nanorobotics for diabetes control. *Nanomed-Nanotechnol*. 2008;4(2):127-138.
- [80] Shumyantseva VV, Suprun EV, Bulko TV, Dobrynina OV, Archakov AI. Sensor Systems for Medical Application Based on Hemoproteins and Nanocomposite Materials. *Biochemistry (Moscow) Supplement Series B*. 2010;4(1):25-36.
- [81] Lee I, Luo X, Huang J, Cui XT, Yun M. Detection of Cardiac Biomarkers Using Single Polyaniline Nanowire-Based Conductometric Biosensors. *Biosensors*. 2012;2(2):205-220.
- [82] Prasad S, Selvam AP, Reddy RK, Love A. Silicon Nanosensor for Diagnosis of Cardiovascular Proteomic Markers. *J Lab Autom*. 2013;18(2):143-151.

- [83] S. Carrara, A. Cavallini, G. De Micheli, J. Olivo, L. Benini, V. V. Shumyantseva, and A. I. Archakov, "Circuits Design and Nano-Structured Electrodes for Drugs Monitoring in Personalized Therapy", 20-22 de Novembro de 2008 Baltimore, MD Conference Proceedings of IEEE BioCAS; 2008.325-328.
- [84] Iwuoha E, Ngece R, Klink M, Baker P. Amperometric responses of CYP2D6 drug metabolism nanobiosensor for sertraline: a selective serotonin reuptake inhibitor. *IET Nanobiotechnol.* 2007;1(4):62-67.
- [85] Infarmed; Medicamentos que em 05 de Setembro de 2014 estavam abrangidos pelo SPR. [acedido a 29 de Agosto de 2014]. Disponível em: [http://www.infarmed.pt/genericos/genericos\\_II/lista\\_genericos.php?tabela=spr&fonte=dc&escolha\\_dci=U2VydHJhbGluYQ==](http://www.infarmed.pt/genericos/genericos_II/lista_genericos.php?tabela=spr&fonte=dc&escolha_dci=U2VydHJhbGluYQ==)
- [86] Lad AN, Agrawal YK Optical nanobiosensor: A new analytical tool for monitoring carboplatin-DNA interaction *in vitro*. *Talanta.* 2012;97:218-221.
- [87] Hauck TS, Giri S, Gao Y, Chan WC. Nanotechnology diagnostics for infectious diseases prevalent in developing countries. *Adv Drug Deliver Rev.* 2010;62(4-5):438-448.
- [88] Lautenbach E, Lee E, Shiley KT. Treating Viral Respiratory Tract Infections with Antibiotics in Hospitals: No Longer a Case of Mistaken Identity. *LDI Issue Brief.* 2010;16(3):1-4.
- [89] Rai V, Hapuarachchi HC, Ching L, Soh SH, Leo YS, Toh C. Ultrasensitive c DNA Detection of Dengue Virus RNA Using Electrochemical Nanoporous Membrane-Based Biosensor. *PLoS One.* 2012;7(8):e42346.
- [90] Zhu S, Du C, Fu Y. Localized surface plasmon resonance-based hybrid Au-Ag nanoparticles for detection of *Staphylococcus aureus* enterotoxin B. *Opt Mater.* 2009;31(11):1608-1613.
- [91] Haruyama T. Micro- and nanobiotechnology for biosensing cellular responses. *Adv Drug Deliver Rev.* 2003;55(3):393-401.
- [92] Poulsen A.K., Scharff-Poulsen A.M., Olsen L.F. Horseradish peroxidase embedded in polyacrylamide nanoparticles enables optical detection of reactive oxygen species. *Anal Chem.* 2007;366(1):29-36.
- [93] Thandavan K, Gandhi S, Sethuraman S, Rayappan JB, Krishnan UM. A novel nano-interfaced superoxide biosensor. *Sensor Actuat B-Chem.* 2013;176:884-892.
- [94] Özalp V, Nielsen LJ, Olsen LF. An Aptamer-Based Nanobiosensor for Real-Time Measurements of ATP Dynamics. *ChemBioChem.* 2010;11(18):2538-2541.
- [95] Song JM, Kasili PM, Griffin GD, Vo-Dinh T. Detection of Cytochrome c in a Single Cell Using an Optical Nanobiosensor. *Anal Chem.* 2004;76(9):2591-2594.
- [96] Wu C, Ko F, Yang Y, Hsia D, Lee B, Su T. Label-free biosensing of a gene mutation using a silicon nanowire field-effect transistor. *Biosens Bioelectron.* 2009;25(4):820-825.
- [97] Dolatabadi JE, Mashinchian O, Ayoubi B, Jamali AA, Mobed A, Losic D, et al. Optical and electrochemical DNA nanobiosensors. *Trends Anal Chem.* 2011;30(3):459-472.

- [98] Heli H, Hajjizadeh M, Jabbari A, Moosavi-Movahedi AA. Copper nanoparticles-modified carbon paste transducer as a biosensor for determination of acetylcholine. *Biosens Bioelectron.* 2009;24(8):2328-2333.
- [99] Sattarahmady N, Heli H, Vais RD. An electrochemical acetylcholine sensor based on lichen-like nickel oxide nanostructure. *Biosens Bioelectron.* 2013;48:197-202.
- [100] Sattarahmady N, Heli H, Moosavi-Movahedi AA. An electrochemical acetylcholine biosensor based on nanoshells of hollow nickel microspheres-carbon microparticles-Nafion nanocomposite. *Biosens Bioelectron.* 2010;25(10):2329-2335.
- [101] Pundir CS, Yadav S, Kumar A. Creatinine sensors. *Trends Anal Chem.* 2013;50:42-52.
- [102] Lin K, Tsai T, Chen S. Performing enzyme-free H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> biosensor and simultaneous determination for AA, DA, and UA by MWCNT-PEDOT film. *Biosens Bioelectron.* 2010;26(2):608-614.
- [103] Alwarappan S, Liu G, Li C. Simultaneous detection of dopamine, ascorbic acid, and uric acid at electrochemically pretreated carbon nanotube biosensors. *Nanomed-Nanotechnol.* 2010;6(1):52-57.
- [104] Pérez-López B, Merkoçi A. Nanomaterials based biosensors for food analysis applications. *Trends Food Sci Tech.* 2011;22(11):625-639.
- [105] Liu S, Yuan L, Yue X, Zheng Z, Tang Z. Recent Advances in Nanosensors for Organophosphate Pesticide Detection. *Adv Powder Technol.* 2008;19(5):419-441
- [106] Songa EA, Somersat VS, Waryo T, Baker PG, Iwuoha EI. Amperometric nanobiosensor for quantitative determination of glyphosate and glufosinate residues in corn samples. *Pure Appl. Chem.* 2009;81(1):123-139.
- [107] Comissão Europeia. Health and Consumers. [accedido a 9 de setembro de 2014] Disponível em: [http://ec.europa.eu/food/plant/pesticides/max\\_residue\\_levels/eu\\_rules\\_en.htm](http://ec.europa.eu/food/plant/pesticides/max_residue_levels/eu_rules_en.htm)
- [108] Hendricks NR, Waryo TT, Arotiba O, Jahed N, Baker PG, Iwuoha EI. Microsomal cytochrome P450-3A4 (CYP3A4) nanobiosensor for the determination of 2,4-dichlorophenol-An endocrine disruptor compound. *Electrochim Acta.* 2009;54(7):1925-1931.
- [109] Ko S., Gunasekaran S., Yu J. Self-indicating nanobiosensor for detection of 2,4-dinitrophenol. *Food Control.* 2010;21(2):155-161.
- [110] Zekavati R, Safi S, Hashemi SJ, Rahmani-Cherati T, Tabatabaei M, Mohsenifar A, et al. Highly sensitive FRET-based fluorescence immunoassay for aflatoxin B1 using cadmium telluride quantum dots. *Microchim Acta.* 2013;180(13-14):1217-1223.
- [111] Vinayaka AC, Thakur MS. Focus on quantum dots as potential fluorescent probes for monitoring food toxicants and foodborne pathogens. *Anal Bioanal Chem.* 2010;397(4):1445-1455.
- [112] Jiang C, Yang T, Jiao K, Gao H. A DNA electrochemical sensor with poly-L-lysine/single-walled carbon nanotubes films and its application for the highly sensitive EIS detection of PAT gene fragment and PCR amplification of NOS gene. *Electrochim Acta.* 2008;53(6):2917-2924.
- [113] Nordlee JA, Taylor SL, Townsend JA, Thomas LA, Bush RK. Identification of a brazil-nut allergen in transgenic soybeans. *N Engl J Med.* 1996;334(11):688-692.