

## BIOSSENSORES ELETROQUÍMICOS ENZIMÁTICOS E IMUNOSSENSORES

 <https://doi.org/10.56238/sevened2025.021-001>

**Henrique Antônio Mendonça Faria**

Doutor em Ciências

Universidade Estadual Paulista (Unesp) - Instituto de Química

E-mail: [henrique.faria@unesp.br](mailto:henrique.faria@unesp.br)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6976-6897>

### RESUMO

Os biossensores eletroquímicos têm se destacado como dispositivos analíticos para aplicações em saúde, meio ambiente, indústria alimentícia e segurança pública, devido à sua sensibilidade, seletividade e rapidez na detecção de analitos específicos. Esses dispositivos representam uma alternativa viável e eficiente aos métodos tradicionais de análise laboratorial, sendo capazes de fornecer respostas em tempo real, com menor custo e maior portabilidade. Nesse cenário, investir em pesquisa e desenvolvimento de biossensores é essencial para atender às crescentes demandas tecnológicas de diagnóstico precoce, monitoramento ambiental e controle de qualidade industrial. Além disso, a integração desses dispositivos com plataformas digitais e sistemas miniaturizados amplia seu potencial de aplicação em ambientes remotos. O objetivo do capítulo é apresentar os fundamentos, as características e as aplicações dos biossensores eletroquímicos, com ênfase em duas classes principais: os biossensores enzimáticos e os imunossensores. Os biossensores enzimáticos baseiam-se na imobilização de enzimas sobre eletrodos, permitindo a conversão de sinais biológicos em sinais elétricos mensuráveis. A especificidade das enzimas por seus substratos garante alta seletividade na detecção, sendo amplamente utilizados para a quantificação de glicose, lactose, ureia e outros compostos relevantes em saúde e alimentos. A imobilização enzimática pode ocorrer por diferentes métodos, como adsorção, encapsulamento, ligação covalente e aprisionamento em matrizes poliméricas. Avanços na engenharia de materiais têm permitido melhorar a estabilidade e a eficiência desses dispositivos, tornando-os cada vez mais eficazes. Já os imunossensores utilizam a interação altamente específica entre antígenos e anticorpos para reconhecer e quantificar substâncias de interesse, sendo especialmente úteis na detecção de agentes patogênicos, biomarcadores tumorais e resíduos de pesticidas. Eles podem operar em diferentes formatos, como imunoensaio direto ou competitivo, com detecção eletroquímica baseada na variação de corrente, potencial ou impedância gerada pela ligação antígeno-anticorpo. A escolha adequada dos elementos de reconhecimento e dos transdutores influencia diretamente na sensibilidade, limite de detecção e reprodutibilidade dos imunossensores. Com o avanço da nanotecnologia, esses dispositivos têm se tornado cada vez mais precisos, sendo capazes de operar em concentrações de analitos extremamente baixas. Assim, os biossensores eletroquímicos representam dispositivos de detecção estratégicos e inovadores para diagnósticos clínicos rápidos, vigilância ambiental precisa e garantia da qualidade em processos industriais e produtos alimentícios. Seu desenvolvimento contínuo é fundamental para impulsionar soluções tecnológicas acessíveis e sustentáveis, alinhadas às necessidades emergentes da sociedade contemporânea.

**Palavras-chave:** Biossensor. Eletroquímico. Enzimático. Imunossensor.

## 1 INTRODUÇÃO

Segundo a *International Union of Pure and Applied Chemistry* (IUPAC), um biossensor é um dispositivo composto por um elemento de reconhecimento biológico associado a um transdutor físico-químico capaz de fornecer informação analítica quantitativa de um analito<sup>1</sup>. O transdutor é o elemento que converte uma resposta bioquímica em um sinal elétrico mensurável, podendo ser: amperométrico, potenciométrico, impedimétrico ou condutimétrico. A sensibilidade, a seletividade, o limite de detecção, a reprodutibilidade, o tempo de resposta e o tempo de vida útil são os parâmetros relevantes para as aplicações dos biossensores.

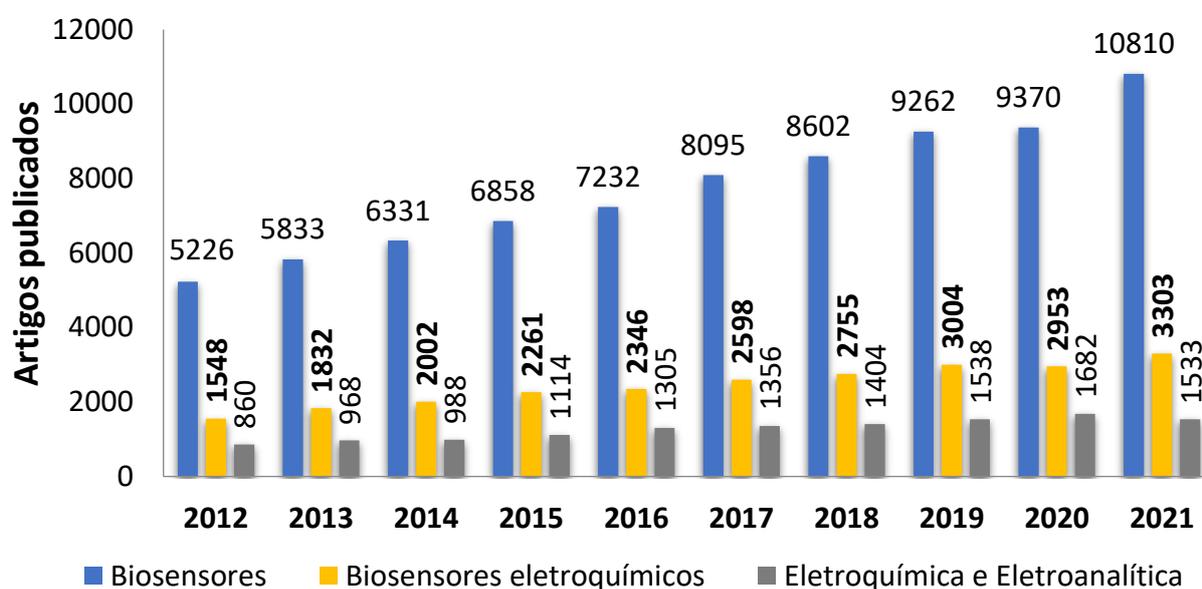
Um biossensor eletroquímico é uma classe dos biossensores na qual o transdutor é modificado quimicamente com um filme bioquímico, podendo ser composto por um eletrodo condutor eletrônico, semiconductor ou condutor iônico. O biossensor eletroquímico mais conhecido é o medidor de glicose, que a partir do conceito inicial proposto por Clark e Lions<sup>2</sup> em 1962, recebeu inúmeras contribuições, por mais de cinco décadas, até chegar aos modelos comerciais<sup>3</sup>. No entanto, as aplicações dos biossensores eletroquímicos vão muito além dos glicosímetros, sendo utilizados na detecção de vírus<sup>4</sup>, na identificação de biomarcadores do câncer<sup>5</sup>, na avaliação de poluentes<sup>6</sup> e na análise de pesticidas<sup>7</sup>, possibilitando amplo campo de atividades para pesquisas fundamentais e para inovações tecnológicas.

O mercado global de biossensores foi avaliado em 2021 em 24,9 bilhões de dólares<sup>8</sup>. A demanda por dispositivos descartáveis de baixo custo, de uso facilitado e com breve tempo de resposta tem crescido significativamente neste mercado segmentado nas áreas biomédicas, de alimentos, da agricultura, do meio ambiente e de biotecnologia. O segmento biomédico dominou os negócios dos biossensores em 2021 com 66,5% das aplicações comerciais. Nesse segmento, os biossensores são usados na análise de metabólitos do sangue como: glicose, lactose, creatinina, ureia, colesterol e, ainda, teste de gravidez, teste de drogas e diagnóstico de algumas doenças infecciosas. O uso desses dispositivos no meio ambiente tem crescido, sendo o segundo maior em volume de aplicações, especialmente, na análise de fungos, pesticidas, herbicidas, metais pesados e poluentes. O segmento em biotecnologia é o terceiro em valor de mercado.

Os biossensores eletroquímicos apresentam vantagens sobre os biossensores piezoelétricos e ópticos, porque apresentam baixos limites de detecção, alta reprodutibilidade e ótima estabilidade. Além dessas vantagens, a sua compatibilidade com novas tecnologias de micro e nanoeletrônica torna esses dispositivos operacional e economicamente viáveis em diversos segmentos. As principais indústrias de biossensores são: Bio-Rad Laboratories; Abbott Laboratories; Bayer AG; DuPont Biosensor Materials; Johnson and Johnson, Philips; LifeScan, Inc.; Nova Biomedical; Siemens Healthcare e Roche Diagnostics, que produzem e comercializam diversos tipos de biossensores para uso biomédico, ambiental e biotecnológico.

Na última década, a pesquisa acadêmica na linha de biossensores superou, em média, três vezes e meia a produção nas áreas de eletroquímica e eletroanalítica, em número de publicações, conforme avaliação dos indicadores de produção na base de dados da *Web of Science* (Thonson Reuters), mostrada na **Figura 1**. O levantamento revela ainda, que a produção na classe de biossensores eletroquímicos é maior do que à soma das produções em eletroquímica e em eletroanalítica, mostrando a relevância desta linha de pesquisa para grande área.

Figura 1 Distribuição de publicações nas áreas de biossensores, eletroquímica/eletroanalítica e biossensores eletroquímicos. Pesquisa realizada na base de dados da Web of Science (Thonson Reuters), palavras-chave: biosensor\*; electrochemic\* AND electroanal\* e electrochemical\* AND biosensor\*, respectivamente a cada área ou linha de pesquisa.



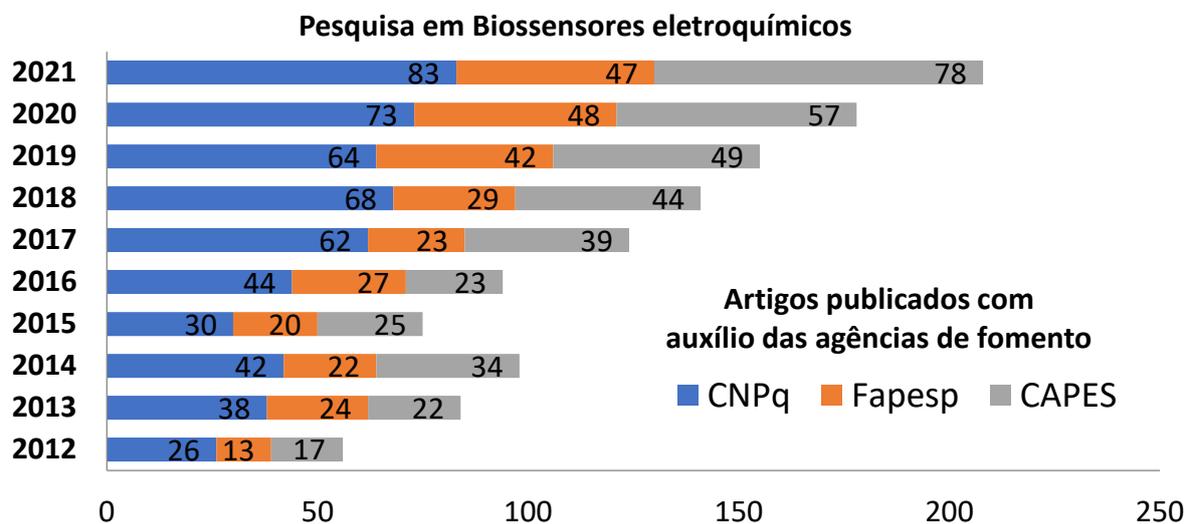
Fonte: elaborada pelo autor.

A produção científica em biossensores eletroquímicos da última década representa 30% de toda pesquisa em biossensores das diversas classes. A participação brasileira na pesquisa em biossensores eletroquímicos, nos últimos dez anos, ocupou 5% do total, resultado obtido pela contagem das publicações que contém no campo “agência financiadora” a citação de pelo menos uma das três agências de fomento à pesquisa: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

Nos últimos anos, têm-se noticiado e constatado em muitas áreas de pesquisa a redução drástica do investimento pelas agências de fomento nacionais e estaduais. Os cortes do orçamento em ciência e tecnologia causaram a diminuição de bolsas e dos recursos para insumos e equipamentos. Contudo, a linha de pesquisa em biossensores eletroquímicos não sofreu impacto significativo, sinalizando sua relevância para as agências de fomento. A produção científica apoiada pelas três

principais agências de fomento que subsidiam a pesquisa no Estado de São Paulo, com artigos publicados em periódicos indexados, apresentou crescimento na concessão de benefícios na última década, como mostra a **Figura 2**.

Figura 2 Fomento à pesquisa na área de biossensores eletroquímicos, na última década, pelas três agências que subsidiam a pesquisa no estado de São Paulo. Pesquisa realizada na base de dados da Web of Science (Thonson Reuters), palavras-chave: electrochemical\* AND biosensor\*; campo “agência financiadora”: CNPq, FAPESP ou CAPES.



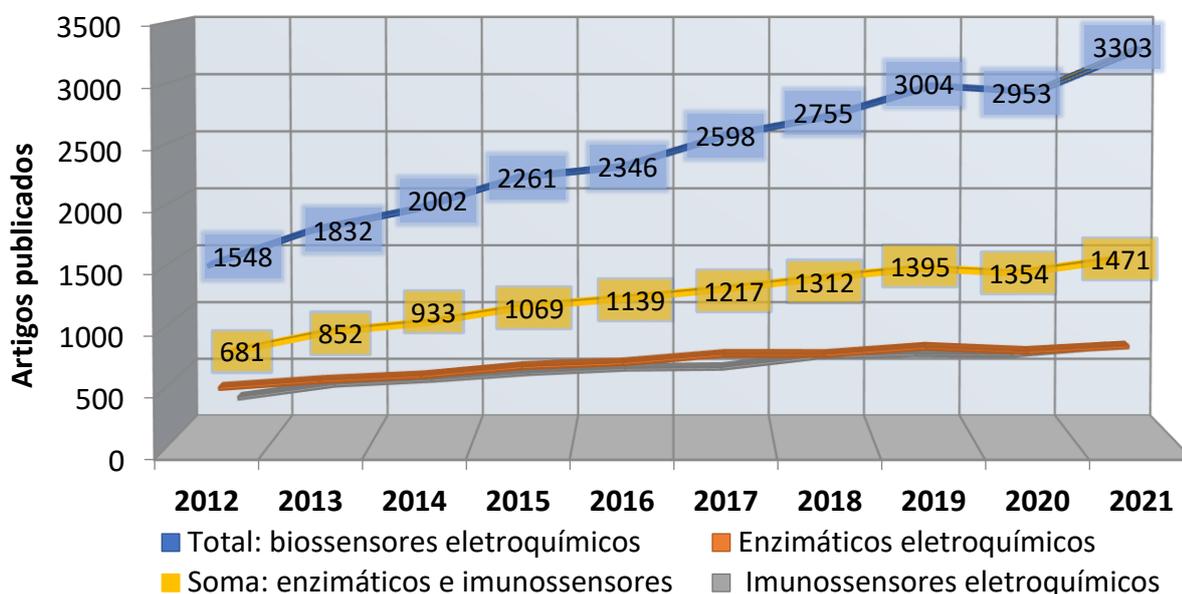
Fonte: elaborada pelo autor.

O investimento na linha de pesquisa em biossensores eletroquímicos, que inclui os segmentos biomédico, ambiental e biotecnológico, tanto no mercado comercial quando na pesquisa acadêmica, cresceu na última década, o que mostra a ampla relevância desse tema dentro da grande área de eletroquímica e eletroanalítica.

Quanto ao elemento biológico imobilizado no transdutor, os biossensores eletroquímicos podem ser classificados como: biossensores enzimáticos, imunossensores, biossensores celulares, genossensores, entre outros. As classes que fornecem maiores níveis de sinal detectável são os biossensores enzimáticos e os imunossensores, utilizados na maioria das aplicações. A **Figura 3** mostra que, no ano de 2012, a soma da produção científica na linha de biossensores enzimáticos e imunossensores representavam 44% das publicações em biossensores eletroquímicos, mantendo esse patamar no final de uma década.

Figura 3 Produção científica sobre biossensores eletroquímicos enzimáticos e imunossensores no conjunto total das publicações em biossensores eletroquímicos. Pesquisa realizada na base de dados da Web of Science (Thonson Reuters), palavras-chave: electrochemical\* AND biosensor\*; enzym\*; immun\*.

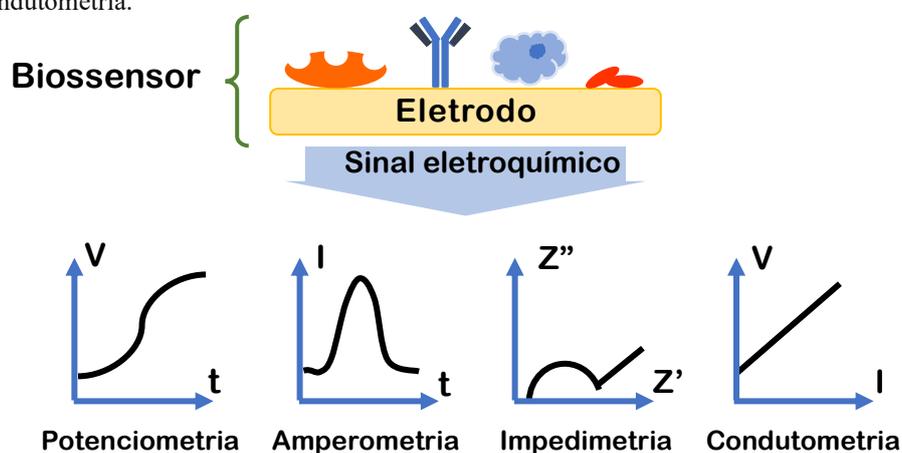
### Produção científica das classes de biossensores eletroquímicos



Fonte: elaborada pelo autor.

A reação monitorada eletroquimicamente pode gerar um sinal no sistema de eletrodos que indique surgimento de corrente, acúmulo de carga ou potencial, mudança na impedância ou alteração na condutância do meio. Esse sinal pode ser interpretado pelos métodos eletroanalíticos de amperometria/voltametria, potenciometria, impedimetria e condutometria, respectivamente<sup>9</sup>. Os métodos de detecção podem ser organizados de acordo com a categoria do sinal: corrente, potencial, impedância ou condutância e desdobram-se nas técnicas de eletroanálise, como ilustrados na **Figura 4**.

Figura 4 Biossensor e os tipos de sinais eletroquímicos medidos pelos métodos de potenciometria, amperometria, impedimetria e condutometria.



Fonte: elaborada pelo autor.

A facilidade operacional, a portabilidade e a simplicidade de construção dos eletrodos são as qualidades que justificam a proeminência da detecção eletroquímica nos biossensores, em especial, a identificação de um sinal mensurável da reação bioquímica não depende fortemente do volume da amostra. Recentemente, Mello, Bueno e Mulato<sup>10</sup> compararam a resposta eletroquímica de biossensores enzimáticos estruturados em filmes finos de polianilina com a resposta óptica. O estudo mostra, por exemplo, para detecção de glicose, um limite de detecção de 0,16  $\mu\text{mol L}^{-1}$  para o biossensor impedimétrico e de 2,33  $\mu\text{mol L}^{-1}$  para o biossensor óptico.

A detecção eletroquímica de complexos como anticorpo-antígeno é pouco afetada pelos componentes da amostra, como cromóforos, fluoróforos e partículas que interferem na detecção espectrofotométrica. Portanto, os ensaios eletroquímicos podem ser feitos em amostras turvas, como sangue total, sem que haja interferência significativa de glóbulos de gordura, glóbulos vermelhos, hemoglobina e bilirrubina<sup>11</sup>.

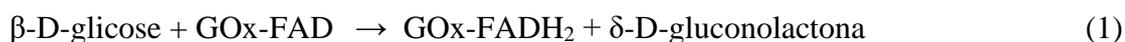
O número significativo de publicações na linha de biossensores enzimáticos e imunossensores espelham o grande sucesso científico e comercial dos primeiros representantes desta classe, os medidores de glicose. A robustez e a precisão dos glicosímetros continuam inspirando a pesquisa e a aplicação na busca de soluções para detecção de inúmeros analitos emergentes das áreas biomédica, ambiental e biotecnológica. O objetivo deste capítulo é o de apresentar uma revisão dos conceitos dessas duas classes mais relevantes de biossensores eletroquímicos. O texto está estruturado em quatro partes: introdução; biossensores enzimáticos; imunossensores e conclusão.

## 2 BIOSSENSORES ENZIMÁTICOS

O biossensor enzimático é um dispositivo bioanalítico, no qual uma enzima catalítica imobilizada no eletrodo reage quimicamente com o analito-alvo gerando um sinal mensurável<sup>12</sup>. Os glicosímetros, ou medidores de glicose, são os biossensores enzimáticos mais utilizados e produzidos comercialmente. Parâmetros como origem, estabilidade operacional e armazenamento da enzima, bem como procedimento de imobilização são fundamentais ao preparar um biossensor enzimático<sup>13</sup>.

Os biossensores enzimáticos podem ser classificados como sondas eletroquímicas com filme fino de enzima imobilizado na superfície do eletrodo de trabalho. O produto eletroativo pode ser monitorado diretamente usando amperometria, na qual uma corrente é produzida em resposta a um potencial constante aplicado, sendo a catálise enzimática a responsável pela significativa amplificação no sinal no biossensor<sup>14</sup>. O uso de enzimas nos biossensores continua crescendo, pois devido à complexidade dessas estruturas moleculares e sua especificidade singular com a molécula-alvo, podem detectar com muita seletividade analitos individuais em uma mistura complexa, como urina ou sangue<sup>15</sup>.

O desenvolvimento de biossensores enzimáticos nas aplicações biomédicas, na década de 1960, foi iniciado com o monitoramento da glicose no sangue principalmente pelas intensas pesquisas na área. Eletrodos funcionalizados com a enzima glicose oxidase (GOx) têm sido largamente utilizados na detecção de glicose desde o trabalho pioneiro de Clark e Lyons<sup>2</sup> entre 1950 e 1960. Este biossensor amperométrico ficou conhecido como a primeira geração de biossensores enzimáticos. Nesta **primeira geração**, a enzima oxidase é imobilizada entre uma membrana semipermeável e a superfície de um eletrodo de platina. A GOx é uma enzima estável, barata, facilmente obtida do *Aspergillus niger*, um fungo comum de muitas frutas e legumes. A GOx é altamente específica para β-D-glicose a qual pode ser detectada pela seguinte reação expressa nas equações (1), (2) e (3):



No entanto, a primeira geração de biossensores precisava continuamente de oxigênio como substrato para efetivar a reação enzimática. Como o oxigênio é pouco solúvel em soluções aquosas, havia uma limitação da corrente produzida na presença do analito, pois as reações redox diretas entre enzimas e os eletrodos são muito raras devido à tendência da desnaturação dessas proteínas quando em contato com a superfície do eletrodo. Uma vez que, um número limitado de enzimas, tais como a peroxidase do nabo silvestre, mostram-se capazes de transferir elétrons diretamente do sítio ativo da enzima para o eletrodo<sup>16</sup> a ideia inicial recebeu modificações.

Os elétrons produzidos na reação de uma enzima catalítica nem sempre podem ser transferidos rapidamente e facilmente para a superfície do eletrodo. A Teoria de Marcus, largamente aceita, mostra que a transferência de elétrons cai exponencialmente com a distância<sup>17</sup>. Por isso, as enzimas frequentemente requerem um auxiliar que transfere elétrons para superfície do transdutor. Os mediadores redox artificiais atuam como auxiliares dessa transferência e são pequenas moléculas solúveis capazes de fornecer oxigênio para a reação enzimática nos biossensores de glicose. Embora muitos compostos orgânicos sejam capazes de atuar como mediadores, os compostos redox orgânico-metálicos são os mais comuns. Nessa classe estão incluídos: quinonas, sais condutores orgânicos, corantes, complexos de Rutênio, ferroceno e derivados de ferricianeto<sup>9</sup>. A reação da enzima GOx na presença de mediadores pode ser expressa pelas equações (4) e (5):



Os biossensores enzimáticos com mediadores, chamados de **segunda geração**, apresentam um desempenho muito melhor do que os biossensores da primeira geração, principalmente devido à

eliminação da dependência de oxigênio em solução. A incorporação de mediadores redox também permitiu a utilização de outras enzimas oxidorreduzidas, tais como peroxidases e dehydrogenases, que ampliaram a lista de possíveis analitos-alvo.

A **terceira geração de biossensores enzimáticos** possui o componente de biorreconhecimento acoplado através da coimobilização da enzima com o mediador na superfície do eletrodo. Isso pode ser alcançado pelo contato elétrico direto entre a enzima e o eletrodo, imobilizando a enzima e o mediador em um polímero condutor ou em um eletrodo metálico. Essa nova geração foi inicialmente descrita por Heller<sup>18</sup> e são biossensores ideais para medições repetidas, pois nem o mediador nem a enzima precisam ser adicionados. Estudos recentes de Bueno<sup>19</sup> mostram que em sistemas como esses a transferência de elétrons e a condutância quântica estão correlacionadas. Esses estudos ganharam relevância nos aspectos fundamentais, conjugando a teoria de Rudolf Marcus e de Landauer o que ampliou o entendimento dos processos de armazenamento e transferência de carga. As evidências desta correlação foram confirmadas pelo estudo de simulação computacional de Feliciano e Bueno<sup>20</sup>. Esses estudos vêm contribuindo para compreensão dos aspectos fundamentais e permitindo a melhora da eficiência dos biossensores enzimáticos e o desenvolvimento de novas aplicações.

## 2.1 MÉTODOS DE IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMAS

O objetivo da imobilização é o de proporcionar a ligação estável entre a enzima e a superfície de detecção do transdutor sem bloquear o sítio ativo da proteína ou alterar drasticamente sua geometria. São basicamente quatro métodos de imobilização: aprisionamento físico, ligação covalente, adsorção e ligação eletrostática<sup>14</sup>. O período de estabilidade das enzimas imobilizadas depende da temperatura, do pH e do método utilizado, variando de horas a meses, dependendo da preparação, desenho e das condições de armazenamento do biossensor.

A abordagem mais simples é a de aprisionar fisicamente as enzimas entre membranas pré-formadas na superfície do eletrodo. Nesse método de imobilização física, a composição nativa da enzima é preservada uma vez que não envolve a formação de ligação covalente<sup>26</sup>. Os procedimentos mais comuns de aprisionamento enzimático são: encapsulamento, inclusão em um gel, conjugação em filme eletropolimerizado e incorporação em pasta de carbono.

A ligação covalente da enzima ao transdutor é a imobilização mais estável, porque liga diretamente ao eletrodo os grupos funcionais da proteína como NH<sub>2</sub>, COOH, OH e SH que não atuam diretamente na atividade catalítica<sup>9</sup>. Por outro lado, a adsorção é o método menos estável de imobilização cujas forças que ligam o elemento de biorreconhecimento ao transdutor são principalmente forças van der Waals, com ocasionais pontes de hidrogênio. Portanto, a vida útil de um sensor preparado por adsorção é bastante limitada. No entanto, o método de adsorção, é de mais fácil

execução, requer limpeza mínima e não prejudica a conformação da enzima imobilizada, sendo ideal para os estudos iniciais de construção do biossensor enzimático. Nos biossensores deste projeto serão utilizadas as técnicas de imobilização mais adequadas para cada etapa de desenvolvimento.

## 2.2 APLICAÇÕES DOS BIOSSENSORES ENZIMÁTICOS

As tiras de teste descartáveis de monitoramento doméstico de glicose, acopladas a medidores eletrônicos manuais vendidos nas farmácias, são baseados na reação catalítica da enzima glicose oxidase (GOx) ou glicose desidrogenase. Nesses biossensores uma única gota de sangue total, sem preparação ou purificação, é colocada em uma tira de teste estruturada em substrato polimérico que contém trilhas condutivas e membranas nas quais os reagentes secos foram depositados. O sistema de dois eletrodos é o mais usado sendo que no eletrodo de trabalho a enzima e o mediador são imobilizados e o outro atua como eletrodo de referência.

Atualmente, as tiras de teste de glicose vendidas comercialmente são de segunda ou terceira geração e o ferricianeto é um dos mediadores comumente usados. A detecção nesses biossensores enzimáticos é amperométrica, sob um potencial constante aplicado. A reação catalisada pela enzima produz corrente que é intensificada pelo mediador e então quantificada por um circuito eletrônico, ou micropotenciostato. Os medidores de glicose vendidos comercialmente apresentam uma faixa de sensibilidade entre 1,1 e 33,3 mmol L<sup>-1</sup> de glicose, precisão de 3% a 8% e tempo de teste de cerca de 30 segundos<sup>9</sup>.

Além dos glicosímetros, existem comercialmente biossensores enzimáticos utilizados para detectar o lactato, um éster do ácido láctico produzido durante o processo de respiração celular quando a molécula de glicose é quebrada. Sua concentração no sangue aumenta do valor normal de 0,9 mmol L<sup>-1</sup> para cerca de 12 mmol L<sup>-1</sup> com a intensa atividade do metabolismo anaeróbico provocada por exercícios extenuantes como maratona ou triatlo<sup>27</sup>. Os primeiros medidores de lactato eletroquímicos portáteis para uso em medicina esportiva foram fabricados pela Senslab e Arkray<sup>35</sup>. Esses biossensores requerem amostras de sangue com apenas 0,5 µL e 5 µL, respectivamente. Os níveis de lactato sanguíneo são usados como indicadores de condições como acidose ou meningite bacteriana.

Quatro enzimas podem ser usadas como componentes de biorreconhecimento em biossensores de lactato: lactato desidrogenase, lactato oxidase, lactato monooxidase e citocromo b<sub>2</sub>. Alguns biossensores eletroquímicos de lactato incluem mediadores como ferricianeto e o dinucleótido de nicotinamida e adenina (NAD), que é uma coenzima que apresenta dois estados de oxidação: NAD<sup>+</sup> (oxidado) e NADH (reduzido). O NAD é um composto orgânico encontrado nas células dos seres vivos e usado como transportador de elétrons em reações metabólicas de oxi-redução e tem uma função preponderante na produção de energia para a célula<sup>36</sup>. Essas enzimas, conjugadas aos mediadores, ao

se ligarem com o lactato, produzem corrente no eletrodo de trabalho que é medida amperometricamente.

Outro arranjo possível no biossensor enzimático, chamado de biossensor de interferência detecta as mudanças da taxa de catalisação das reações quando efetores se ligam às enzimas, atuando como inibidores ou ativadores. Esses biossensores também são chamados de sensores de inibição enzimática foram desenvolvidos para detecção de pesticidas, como organofosfato e carbamato, toxinas da respiração como cianeto ( $\text{CN}^-$ ) e azida ( $\text{N}_3^-$ ) e metais pesados tóxicos como As, Pb, Cd, Cr e Hg<sup>37</sup>. As enzimas usadas nos biossensores enzimáticos incluem tirosinase, peroxidase de nabo silvestre e acetilcolinesterase. Embora existam aplicações relevantes disponíveis comercialmente, um grande número de analitos ainda carece de dispositivos para sua detecção, podendo os biossensores enzimáticos ser desenvolvidos para esses alvos.

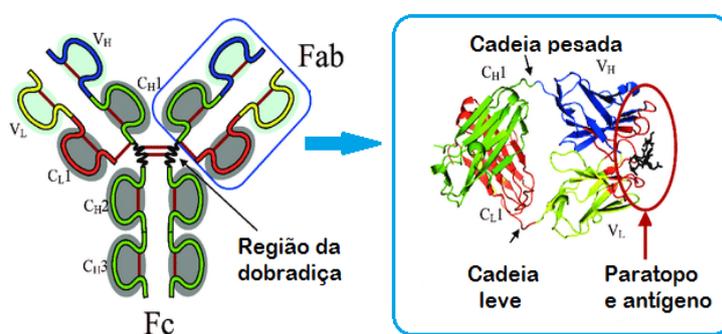
### 3 IMUNOSSENSORES

Os imunossensores são biossensores de afinidade baseados na forte ligação seletiva entre anticorpos (Ab) e antígenos (Ag). A detecção de um analito, nesse caso um antígeno, é realizada através da sua ligação com um anticorpo específico imobilizado no eletrodo ou vice-versa<sup>21</sup>. A ligação Ab-Ag gera um sinal elétrico no transdutor que pode ser quantificado por algum dos métodos eletroanalíticos, dependendo do desenho do imunossensor. Por exemplo, nos imunossensores usados nos testes de gravidez e fertilidade, os anticorpos imobilizados no eletrodo possuem afinidade de ligação com o hormônio hCG (gonadotrofina coriônica humana), que é produzido quando o óvulo é fecundado. Os tipos comerciais mais comuns desses testes são os colorimétricos e os que detectam a reação de ligação eletroquimicamente.

Os imunossensores se destacam dentre outros tipos de biossensores, pois detectam traços da ordem de partes por bilhão (ppb), possuem alta especificidade na ligação anticorpo-antígeno (Ab-Ag) e ainda possibilitam a detecção de diversos analitos como bactérias, vírus, drogas, toxinas, hormônios, poluentes ambientais, pesticidas, herbicidas e outros compostos. Além dessas vantagens, esses biossensores requerem pouca preparação da amostra, uso reduzido de reagentes e compatibilidade com automação<sup>9</sup>, tornando esses dispositivos uma alternativa atraente frente aos métodos analíticos quantitativos convencionais como cromatografia e espectrometria de massa. O desenho multiplex dos imunossensores também permite a análise simultânea de várias analitos, o que melhora a eficiência e torna os ensaios relativamente rápidos e econômicos. Os imunossensores são mais fáceis de construir do que os enzimáticos e apresentam quatro fatores envolvidos no seu projeto: configuração do eletrodo, imobilização do anticorpo, minimização das interações inespecíficas e escolha do método de detecção<sup>22</sup>.

A imunoglobulina IgG, um dos principais anticorpos (Abs) utilizados no imunossensores, é uma glicoproteína em forma de “Y” com peso molecular da ordem de MW~150 kDa produzida por um hospedeiro em resposta à presença de uma molécula estranha chamada antígeno (Ag)<sup>23</sup>. Antígeno é qualquer elemento que o corpo reconhece por estranho tais como: substâncias químicas, proteínas ou material particulado (poeira, pólen etc.). As IgGs têm quatro cadeias polipeptídicas, duas idênticas com peso molecular igual ou superior a 50 kDa e outras duas cadeias mais leves com cerca de 25 kDa, conforme ilustra a **Figura 5**. As cadeias dos Abs são unidas por ligações de dissulfeto e interações de pontes de hidrogênio,

Figura 5 (a) Estrutura de uma imunoglobulina IgG: Fc – fragmento efetor, Fab – fragmento de ligação do antígeno, V – domínio variável, C – domínio constante. (b) Ligação de um antígeno com o fragmento Fab.



Fonte: adaptado da referência [23].

A região de ligação do anticorpo é chamada paratopo e se liga com alta afinidade na região do antígeno chamada epítipo. As interações Ab-Ag podem ser do tipo: pontes de hidrogênio, iônica, interações hidrofóbicas e forças de van der Waals. Quando o analito a ser detectado é biomédico, os anticorpos podem ser encontrados no soro do sangue, nos fluidos como saliva e urina, e nas membranas celulares, facilitando a coleta e análise das amostras. Os imunossensores eletroquímicos podem ser classificados em três grupos quanto à transdução elétrica<sup>24</sup>. Na abordagem potenciométrica o complexo Ab-Ag construído na superfície do eletrodo altera o potencial proporcionalmente a concentração dos analitos. No método amperométrico um potencial constante é aplicado no eletrodo e a corrente associada com a redução ou oxidação de espécies eletroativas criadas pela interação é medida. No entanto, como a maioria dos anticorpos não são capazes de induzir reações eletroquímicas por eles mesmos, agentes mediadores ou enzimas devem ser funcionalizadas na biomolécula. Por sua vez, as técnicas impedimétricas medem a transferência de elétrons em resposta a um pequeno potencial de excitação, possibilitando a detecção direta de analitos sem o uso de marcadores ou pares redox. Os imunossensores impedimétricos podem ser configurados para medidas de impedância ou capacitância e mostram vantagens sobre a detecção potenciométrica e amperométrica.

### 3.1 PRODUÇÃO DE ANTICORPOS

Existem dois tipos de anticorpos os policlonais (Abs) e os monoclonais (MAbs). Os Abs são heterogêneos em relação ao seu domínio de ligação e nem sempre permitem a seletividade de detecção requerida, ao passo que os MAbs melhoram os limites de detecção devido a maior especificidade de ligação MAb-Ag sendo preferíveis para a construção de imunossensores eletroquímicos<sup>25</sup>. Enquanto os Abs são uma mistura heterogênea de moléculas de imunoglobulinas secretadas contra um antígeno no início da resposta imune do organismo, os MAbs têm afinidade de ligação para um único epítopo, permitindo a detecção de pequenas quantidades do Ag o que aumenta consideravelmente a especificidade da ligação MAb-Ag.

Os MAbs podem ser desenvolvidos para uma ampla gama de substâncias e, teoricamente, se um MAb pode ser produzido para um analito específico, um imunossensor pode ser desenvolvido para detectar essa substância. O custo dos reagentes para ensaios de imunologia continua diminuindo em razão do desenvolvimento das técnicas de biologia molecular. Atualmente, existe significativa variedade de anticorpos sendo vendida por grandes fabricantes de reagentes como a Sigma Aldrich. Para detecção de analitos emergentes é possível encomendar anticorpos específicos com a funcionalização adequada, de empresas nacionais especializadas.

### 3.2 IMOBILIZAÇÃO DE ANTICORPOS NO ELETRODO

Como as enzimas e outras moléculas de biorreconhecimento, os anticorpos são muito sensíveis às condições ambientais. Normalmente os MAbs são imobilizados em uma superfície sólida para aplicação em biossensores, mas conforme a orientação das biomoléculas nessa imobilização poderá haver perda na capacidade de ligação com o antígeno<sup>21</sup>. Os braços do anticorpo, o paratopo, devem ficar expostos à amostra, sendo necessário escolher métodos de imobilização que favoreçam que o fragmento efetor se ligue à superfície do transdutor. Os MAbs podem ser imobilizados na superfície do eletrodo por métodos que incluem ligações biotina-estreptavidina, adsorção a uma matriz polimérica condutora como polipirrol e ainda ligações covalentes. As interações de anticorpos desorientados na superfície podem levar a mudanças na estrutura de ligação do paratopo<sup>21</sup> contribuindo para o decréscimo do limite de detecção do imunossensor. Além da orientação de imobilização, a densidade dos MAbs imobilizados na superfície deve ser adequada para minimizar os efeitos das interações estéricas, associadas à sobreposição das nuvens eletrônicas e que podem afetar a afinidade de ligação.

Outro fator determinante para a construção de um imunossensor eficiente é a redução de ligações inespecíficas. A ligação não específica em um biossensor envolve a adsorção dos MAbs com espécies diferentes daquelas do analito alvo. Também pode haver adsorções dessas outras espécies nos espaços vazios do eletrodo, fenômeno que aumenta o sinal de fundo, e é o principal limitante de

detecção nos biossensores eletroquímicos<sup>7</sup>. Portanto, para reduzir ou eliminar essas ligações não específicas, devem ser incluídos procedimentos tais como o uso de surfactantes não iônicos, Tween 20, albumina sérica bovina (BSA), polietileno glicol, gelatina ou caseína. As camadas automontadas (*self-assembled monolayers*) de oligo (etileno glicol) e as camadas de dextran também são usadas com sucesso para evitar ligações não específicas em superfícies de eletrodos. As técnicas de imobilização descritas serão utilizadas no desenvolvimento dos imunossensores nos eletrodos de baixa rugosidade propostos.

### 3.3 APLICAÇÕES DOS IMUNOSSENSORES

Há um vasto campo para pesquisa e para aplicação dos imunossensores que abrange os segmentos das áreas biomédica, ambiental e biotecnológica. Contudo, é a área biomédica que possui o maior número de publicações e apresenta maior demanda para pesquisa, dispondo de biossensores comerciais para alguns marcadores. Neste segmento, atualmente, a grande necessidade está sendo a detecção de doenças infecciosas. Nos últimos anos, doenças virais transmissíveis emergiram com grande intensidade, causando enormes prejuízos em diversos países. As principais doenças com epidemias no século XXI foram: SARS, gripe aviária, H1N1, ebola, dengue, chikungunya, zika e o novo coronavírus (SARS-COV-2).

A principal necessidade nos casos das epidemias é a triagem rápida dos pacientes, em postos de atendimento e hospitais, para que os indivíduos recebam o tratamento adequado. No que se refere ao diagnóstico há dois extremos: os testes rápidos colorimétricos baseados na interação anticorpo-antígeno, e o teste molecular conhecido como método da polimerase da cadeia reversa (do inglês, *Polymerase chain reaction* – PCR). O primeiro, também chamado teste sorológico, fornece o resultado em poucos minutos, mas é eficaz somente quando o sistema imunológico já está produzindo anticorpos o que acontece alguns dias após a infecção. No outro extremo o PCR, padrão ouro de diagnóstico, analisa o genoma do vírus e é capaz de fornecer resultado preciso mesmo no início da doença, antes da manifestação dos sintomas. Contudo, por se tratar de uma análise especializada e de maior custo ela está disponível em maior escala somente nos casos de extrema necessidade, como foi na pandemia do novo coronavírus.

Para preencher o espaço entre os dois extremos de diagnóstico, colorimétrico e PCR, têm surgido novas propostas como a utilização do imunossensor para detecção de proteínas estruturais de vírus, tais como as proteínas do envelope e do capsídeo. Na literatura este arranjo é chamado de biossensor de afinidade. Esta opção permite estender a janela de diagnóstico para os períodos iniciais da doença utilizando a interação Ab-Ag<sup>28</sup>. Proposta semelhante pode ser aplicada para outros vírus possibilitando aumento da janela de detecção, maior sensibilidade do que os testes colorimétricos e menor custo do que os ensaios moleculares.

Atualmente, existem biossensores incorporados em instrumentos portáteis comerciais como o *i-STAT*, desenvolvido desde a década de 1990 pela Abbot e capaz de analisar pequenos volumes (20  $\mu\text{L}$ ) de sangue total<sup>29</sup>. Trata-se de um instrumento manual, de uso simples, com cartuchos descartáveis contendo biossensores associados com microfluídica. O instrumento mede simultaneamente vários parâmetros bioquímicos como: hematologia, gases no sangue, parâmetros de coagulação, endocrinologia, marcadores cardíacos, no entanto, não há imunoenaios disponíveis para esse equipamento, espaço a ser preenchido pelos imunossensores.

O instrumento portátil biossensor promissor mais moderno é o *Osler Origin*, desenvolvido pela *Osler Diagnostics*, uma *startup* criada na Universidade de Oxford. Em fase final das etapas regulatórias o instrumento promete alta eficiência, incluindo as mais avançadas técnicas de detecção e engloba todos os benefícios dos biossensores: medição em amostra de sangue total, sensibilidade ao alvo em baixas concentrações, ensaio multiplex, baixo custo, fácil operação e fornecimento de resultados em alguns minutos<sup>30</sup>. A filosofia de cartuchos inseríveis permite a continuidade da pesquisa no desenvolvimento de biossensores para inúmeros marcadores ainda não suportados pelo *Osler Origin* e pelo *i-STAT*, tanto da área biomédica quanto nas áreas ambiental e biotecnológica. Os biossensores desenvolvidos para uso *point-of-care* ganham relevância uma vez que os hospitais, os postos de saúde e as clínicas médicas dos grandes centros urbanos necessitam da detecção rápida para um grande número de analitos.

#### 4 CONCLUSÃO

Os biossensores eletroquímicos envolvem um amplo campo de pesquisa científica em todo o mundo e representam uma das áreas mais dinâmicas e promissoras da tecnologia aplicada à detecção de substâncias químicas e biológicas. Sua importância crescente se justifica pela combinação de alta sensibilidade, seletividade, rapidez de resposta e potencial de miniaturização, características fundamentais para o avanço de dispositivos de detecção nas áreas da saúde, meio ambiente, segurança alimentar e controle industrial. Ao longo deste capítulo, foram abordadas duas classes fundamentais de biossensores eletroquímicos, os biossensores enzimáticos e os imunossensores. A ênfase recaiu em seus princípios de funcionamento, formas de imobilização dos biocomponentes e aplicações.

Os biossensores enzimáticos destacam-se pela utilização de enzimas como elementos de reconhecimento biológico, cuja especificidade em relação ao substrato permite medições altamente seletivas. Essa característica os tornam ferramentas essenciais, por exemplo, na determinação de glicose em fluidos biológicos, contribuindo diretamente para o monitoramento de doenças como o diabetes mellitus. Os métodos de imobilização enzimática, como adsorção física, ligação covalente, aprisionamento em matrizes ou encapsulamento, exercem influência direta sobre a estabilidade, reusabilidade e sensibilidade dos dispositivos. Avanços recentes no desenvolvimento de materiais

condutores, como os nanomateriais e os polímeros condutores, têm proporcionado melhorias significativas no desempenho desses sensores, tornando-os mais robustos e confiáveis. Além disso, o uso de enzimas modificadas geneticamente ou estabilizadas por técnicas físico-químicas tem ampliado o tempo de vida útil e a eficiência dos biossensores enzimáticos em diferentes condições operacionais.

Os imunossensores, por sua vez, exploram a interação específica entre antígenos e anticorpos, sendo particularmente úteis na detecção de agentes patogênicos, toxinas, biomarcadores tumorais, hormônios e outros compostos com relevância clínica, ambiental ou alimentar. A sensibilidade desses dispositivos pode ser aprimorada por meio da escolha criteriosa dos pares antígeno-anticorpo, da otimização das superfícies de imobilização e da aplicação de técnicas eletroquímicas adequadas, como voltametria de pulso, amperometria ou impedância eletroquímica. Com o advento da nanotecnologia, tornou-se possível aumentar ainda mais a área de superfície dos eletrodos e incorporar nanomateriais funcionais capazes de melhorar a condução eletrônica e a eficiência da imobilização. Como resultado, os imunossensores modernos têm alcançado limites de detecção extremamente baixos, permitindo análises em amostras complexas com alta confiabilidade.

A análise comparativa entre biossensores enzimáticos e imunossensores revela que ambos possuem vantagens e desafios específicos, sendo que a escolha da plataforma mais adequada depende do tipo de analito, da matriz da amostra e dos requisitos da aplicação final. Enquanto os biossensores enzimáticos são amplamente aplicáveis em análises contínuas e de rotina, os imunossensores são particularmente eficazes para diagnósticos pontuais e detecção de substâncias com relevância biomédica ou toxicológica. Ambos os tipos de biossensores, no entanto, compartilham o desafio comum da estabilidade dos biocomponentes e da necessidade de calibração frequente, aspectos que continuam sendo alvo de intensa pesquisa.

O futuro dos biossensores eletroquímicos aponta para a integração com tecnologias digitais e dispositivos portáteis, como smartphones, microcontroladores e sistemas de Internet das Coisas (IoT), ampliando suas aplicações em ambientes remotos, em tempo real e em contextos de medicina personalizada. Além disso, o desenvolvimento de plataformas multifuncionais e multiplexadas, capazes de detectar simultaneamente diversos analitos, representa uma tendência crescente nessa área de pesquisa e desenvolvimento. A interdisciplinaridade entre a química, a biotecnologia, a engenharia de materiais e a ciência de dados tem potencial para impulsionar inovações significativas nesse cenário.

Em um contexto global de crescente demanda por diagnósticos rápidos, monitoramento ambiental e rastreabilidade de produtos, os biossensores eletroquímicos têm papel estratégico como dispositivos acessíveis, sustentáveis e adaptáveis. O desenvolvimento de inovações com base em princípios bioeletroquímicos pode contribuir não apenas para o avanço científico e tecnológico, mas também para o enfrentamento de desafios sociais urgentes, como o controle de epidemias, a vigilância da qualidade da água e a segurança alimentar em larga escala.



Portanto, investir em pesquisa, desenvolvimento e formação de recursos humanos na área de biossensores é fundamental para consolidar essa tecnologia como parte integrante de soluções inovadoras e eficientes. A consolidação de parcerias entre universidades, centros de pesquisa e setor produtivo será essencial para a transferência de conhecimento e para a produção em escala de dispositivos para aplicação. Diante disso, os biossensores eletroquímicos, especialmente os enzimáticos e os imunossensores, consolidam-se como protagonistas na construção de um futuro onde a ciência se alia à inovação para promover qualidade de vida, sustentabilidade e bem-estar social.



## REFERÊNCIAS

THÉVENOT, J. TOTH, K.; DURST, R.A.; WILSON, G.S. Electrochemical biosensors: recommended definitions and classification (IUPAC technical report). *Pure and Applied Chemistry*, v. 71, n. 12, p. 2333-2348, 1999.

CLARK, L. C.; LYONS, C. Electrode systems for continuous monitoring in cardiovascular surgery. *Annals of The New York Academy of Sciences*, v. 102, ed. 1, p. 29, 1962.

LISI, F; PETERSON, J. R.; GOODING, J. J. The application of personal glucose meters as universal point-of-care diagnostic tools. *Biosensors and Bioelectronics*, v. 148, p. 111835, 2020.

ZHU, H.; FOHLEROVÁ, Z.; PEKÁREK, J.; BASOVA, E.; NEUŽIL, P. Recent advances in lab-on-a-chip technologies for viral diagnosis. *Biosensors and Bioelectronics*, v. 153, p. 112041, 2020.

CUI, F.; ZHOU, Z.; ZHOU, H. S. Review measurement and analysis of cancer biomarkers based on electrochemical biosensors. *Journal of The Electrochemical Society*, v. 167, p. 037525, 2020.

HERNANDEZ-VARGAS, G.; SOSA, J.E.-H.; HERNANDEZ, S.S.; RODRÍGUEZ, A.M.V.; SALDIVAR, R.P.; IQBAL, H.M.N. Electrochemical biosensors: a solution to pollution detection with reference to environmental contaminants. *Biosensors*, v. 8, n. 29, 2018.

REYNOSO, E. C. TORRES, E.; BETTAZZI, F.; PALCHETTI, I.; Trends and Perspectives in immunosensors for determination of currently-used pesticides: the case of glyphosate, organophosphates, and neonicotinoids. *Biosensors*, v. 9, n. 20, p. 237-258, 2019.

GRAND VIEW RESEARCH. Biosensors Market Size, Share & Trends Analysis Report By Technology, By Application (Medical, Agriculture), By End User (POC Testing, Food Industry), By Region, And Segment Forecasts, 2022 - 2030. California: GVR, 2022.

09 ENSAFI, A. A. (Ed.). *Electrochemical Biosensors*. Amsterdam: Elsevier, 2019.

MELLO, H. J. P. D.; BUENO, P. R.; MULATO, M. Comparing enzymatic biosensors: impedimetric/capacitive electrochemical response versus Optical Response. *Analytical Methods*, v. 12, p. 4199-4210, 2020.

HASANZADEH, M.; SHADJOU, N. Electrochemical nanobiosensing in whole blood: recent advances. *Trac-Trends In Analytical Chemistry*, v. 80, p. 167-176, 2016.

WANG, J. From DNA Biosensors to Gene Chips. *Nucleic Acids Research*, v. 28, n. 16, p. 3011-3016, 2000.

BARTLETT, P. N. *Bioelectrochemistry fundamentals, experimental techniques and applications*. West Sussex, England: John Wiley & Sons, 2008.

COPELAND, R. A. *A practical introduction to structure, mechanism, and data analysis: Enzymes*. 2nd ed. New York: John Wiley & Sons, 2000.

KURBANOGLU, S.; ERKMEN, C.; USLU, B. Frontiers in electrochemical enzyme based biosensors for food and drug analysis. *Trac-Trends in Analytical Chemistry*, v. 124, p. 115809, 2020.

BOLLELLA, P.; GORTON, L.; ANTIOCHIA, R. Direct Electron Transfer of Dehydrogenases for Development of 3rd Generation Biosensors and Enzymatic Fuel Cells. *Sensors*, v. 18, p. 1319, 2018.



BARD, A. J.; FAULKNER, J. R. *Electrochemical methods fundamentals and applications*. New Jersey: John Wiley & Sons, 2001.

GREGG, B. A.; HELLER, A. Cross-linked redox gels containing glucose-oxidase for amperometric biosensor applications. *Analytical Chemistry*, v. 62, n. 3, p. 258-263, 1990.

BUENO, P.R. Electron Transfer and Conductance Quantum. *Physical Chemistry Chemical Physics*, v. 22, p. 26109-26112, 2020.

FELICIANO, G.T.; BUENO, P.R. The Two-Dimensional Nature and the Meaning of the Density-of-States in Redox Monolayers. *Journal of Physical Chemistry C*, v. 124, p. 14918-14927, 2020.

JONES, A.; DHANAPALA, L.; KANKANAMAGE, R.N.T.; KUMAR, C.V.; RUSLING, J.F.; Multiplexed Immunosensors and Immunoarrays. *Analytical Chemistry*, v. 92, n. 1, p. 345-362, 2020.

VAN EMON, J. M. *Immunoassay and other bioanalytical techniques*. Boca Ronton: Taylor & Francis, 2007.

ALTSHULER, E. P.; SEREBRYANAYA, D. V.; KATRUKHA, A. G. Generation of recombinant antibodies and means for increasing their affinity. *Biochemistry (Moscow)*, v. 75, n. 13, p. 1584-1605, 2010.

ZHANG H.; MILLER B.L.; Immunosensor-based label-free and multiplex detection of influenza viruses: State of the art. *Biosensors and Bioelectronics*, v. 141, p. 111476, 2019.

OSSIPOW, V.; FISCHER, N. (Ed.) *Monoclonal antibodies: methods and protocols*. [s.l.]: Springer, 2014.

ASAL, M. ÖZEN, Ö.; ŞAHINLER, M.; TAHSIN, H.B.; POLATOĞLU, İ. An overview of biomolecules, immobilization methods and support materials of biosensors. *Sensor Review*, v. 39, ed. 3, p. 377-386, 2019.

KUCHERENKO, I. S.; TOPOLNIKOVA, Y. V.; SOLDATKIN, O. O. Advances in the biosensors for lactate and pyruvate detection for medical applications: a review. *Trac-Trends in Analytical Chemistry*, v. 110, p. 160-172, 2019.

FIGUEIREDO, A.; VIEIRA, N.C.S.; SANTOS, J.F. dos; JANEGITZ, B.C.; AOKI, S.M.; JUNIOR, P.P.; LOVATO, R.L.; NOGUEIRA, M.L.; ZUCOLOTTO, V.; GUIMARÃES, F.E.G. Electrical detection of dengue biomarker using egg yolk immunoglobulin as the biological recognition element. *Scientific Reports*, n. 5, 2015.

SCHULLY, K. YOUNG, C.C.; MAYO, M.; CONNOLLY, A.L.; RIGAS, V.; SPALL, A.; CHAN, A.A.; SALVADOR, M.G.; LAWLER, J.V.; OPDYKE, J.A.; CLARK, D.V.; CURRIE, B.J. Next-generation diagnostics for melioidosis: evaluation of a prototype i-stat cartridge to detect burkholderia pseudomallei biomarkers. *Clinical Infectious Diseases*, v. 69, p. 421-427, 2019.

OSLER DIAGNOSTICS. *The Osler Origin, 2022*. A one-stop solution, consolidating multiple existing systems onto a single instrument. Disponível em: <https://www.oslerdiagnostics.com>. Acesso em 10 de junho de 2022.