

Biosensores Electroquímicos

M.J.F. REBELO*

Os biosensores electroquímicos resultam da combinação da especificidade de enzimas com métodos electroquímicos e têm sido alvo de intensa investigação nos últimos anos dadas as vantagens que apresentam em relação a outros métodos. No entanto, a “comunicação” entre o centro activo do enzima e o eléctrodo não se faz de modo imediato e as várias possibilidades de o fazer são ilustradas para um dos sistemas mais estudados - o eléctrodo de glucose amperométrico. Eléctrodos potenciométricos e uma descrição muito sumária de ENFETS são também apresentados.

A definição de biosensores é um pouco variável entre os diferentes grupos de investigação que se dedicam aos vários aspectos que envolvem. Dum modo geral pode dizer-se que biosensores usam espécies biológicas (tais como enzimas, anticorpos, etc) que dão lugar a reacções com a espécie a determinar numa dada amostra, mensuráveis por um “transdutor” apropriado (i.e. um instrumento que traduz uma reacção química num sinal eléctrico, tal como um eléctrodo ou um foto-detector) [1], tal como se ilustra esquematicamente na fig. 1.

IMPACTO DOS BIOSENSORES

As vantagens que os biosensores oferecem em relação aos outros métodos são muito atraentes numa larga diversidade de campos de aplicação desde o laboratório clínico aos processos de controle industrial.

Assim, a selectividade de enzimas, a rapidez de resposta e o facto de que os biosensores electroquímicos permitem a análise de meios opticamente densos, obviando a necessidade de preparar soro, plasma, meios de fermentação, são alguns exemplos que ilustram essas vantagens.

As desvantagens e a razão pela qual ainda há tão poucos instrumentos comerciais que utilizam biosensores estão relacionados com a dificuldade de manufacturar eléctrodos de enzima e

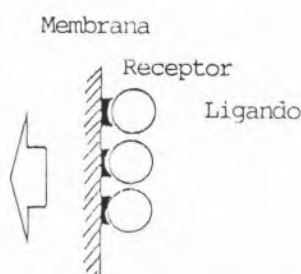


Fig. 1. Representação de um biosensor

imunossensores. Em parte, essa dificuldade resulta da instabilidade dos enzimas. Por outro lado, o funcionamento do biosensor depende criticamente da cuidadosa justaposição do transdutor e do componente biológico. Esta comunicação da espécie biológica com o sistema electroquímico fez-se, inicialmente, por simples colocação do enzima à superfície do eléctrodo fixando-o por uma membrana de diálise. Posteriormente imobilizou-se o enzima por “crosslinking” com um reagente bifuncional, fixando-o numa matriz gelatinosa ou então, por ligações covalentes.

BIOSENSORES ELECTROQUÍMICOS

As duas técnicas electroquímicas mais usadas em biosensores são a potencimetria e a amperometria.

BIOSENSORES POTENCIOMÉTRICOS

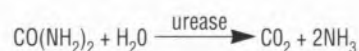
Os biosensores potenciométricos baseiam-se na variação da actividade dum ião produzido pela reacção enzimática e que é detectada pelo eléctrodo sensível a esse ião. Apesar de haver muitos materiais que têm sido apresentados como sensores do pH, o eléctrodo de vidro, medidor de pH, foi o pioneiro e continua a ser o que tem melhor comportamento.

Dum modo geral os sensores potenciométricos baseiam-se numa variação de potencial dum eléctrodo selectivo de iões com a actividade do ião ao qual ele é sensível de acordo com a equação de Nernst

$$E = E' \pm \frac{RT}{nF} \ln a_i$$

onde o sinal é positivo ou negativo consoante a carga do ião. O potencial é medido em relação a um eléctrodo de referência num circuito potenciométrico.

Assim, desde que não haja interferências, por cada potência de 10 de variação da actividade do ião, o potencial variará de 59/n mV a 25°C. Imobiliza-se o enzima à superfície do eléctrodo e, quando reage com o substrato produz uma espécie iónica que difunde através do enzima imobilizado em direcção ao eléctrodo selectivo de iões. Um exemplo muito usado é o eléctrodo de ureia em que a urease cataliza a reacção



que pode ser seguida ou por um eléctrodo de amónio ou por um eléctrodo de vidro medidor de pH por alteração provocada pelo NH_3 num filme de electrólito contendo amónia que cobre o eléctrodo de vidro e que está separado do enzima por uma membrana permeável ao gás.

ENFETS (Enzyme Field Effect Transistors)

Uma variante muito recente dos sensores potenciométricos é produzida pela combinação de transistores de efeito de campo (FET) com membranas contendo enzimas. O potencial da porta pode ser variado por interacção entre a membrana aplicada sobre a porta e o reagente em solução. Esta alteração do potencial produz uma modulação do fluxo de corrente entre o dreno e a fonte que pode ser amplificado, e relacionado com a concentração do reagente.

ENFETS de penicilina [2], glucose [3], ureia e acetilcolina [4] são alguns exemplos desta aplicação.

BIOSENSORES AMPEROMÉTRICOS

Nestes mede-se a corrente que passa entre dois eléctrodos que são mantidos a um determinado potencial. A corrente varia com a concentração do substrato na amostra e resulta da oxidação ou redução duma espécie (substrato, produto, cofactor, etc) num eléctrodo.

As reacções redox de sistemas

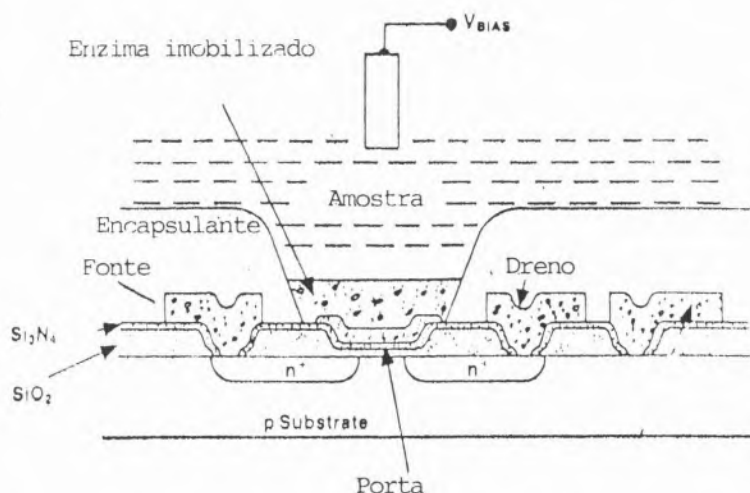


Fig. 2. Esquema dum ENFET

biológicos são geralmente lentas. A combinação de um substrato com um enzima e um mediador de transferência electrónica ultrapassa esse inconveniente. Os mediadores são espécies orgânicas e organometálicas tais como o ferroceno, benzoquinona, 2,6-diclorofenol, indofenol, etc., que transportam os electrões dos centros activos do enzima para a superfície do eléctrodo.

Um mediador ideal deve aceitar electrões rapidamente do biocatalisador reduzido e transferi-los para o eléctrodo. Deve ser estável nas formas oxidada e reduzida (devendo a forma reduzida não reagir com o oxigénio), deve poder ser imobilizado e ter um potencial redox suficientemente baixo para obviar as interferências devidas à oxidação de espécies estranhas à superfície do eléctrodo. Finalmente, se a reacção redox do mediador não envolve protões, torna o eléctrodo de enzima relativamente insensível ao pH.

Os enzimas que se podem usar são oxidoreductases contendo flavoproteínas (e.g. glucose oxidase, coline oxi-

dase, xantinoxidase, aminoacidoxidase ou piruvatoxidase) ou então enzimas dehidrogenase com um coenzima redox tal como a NAD(P)⁺. O progresso na aplicação de oxidoreductases em bioelectroquímica requer uma boa informação da estrutura da proteína e conformação do centro activo assim como das superfícies dos eléctrodos e da sua modificação.

O ELÉCTRODO DE GLUCOSE

Um dos primeiros aparelhos que se designou por eléctrodo de enzimas (Updike e Hicks 1967)[5] relacionava a corrente devida à redução do O₂ que é consumido na reacção



com a concentração da glucose.

O eléctrodo de glucose tem sido dos mais estudados por haver um elevado número de pessoas que sofrem de Diabetes mellitus (~5% da população) as quais têm uma necessidade permanente de conhecer, de modo rápido, preciso e económico os níveis de glucose no sangue.

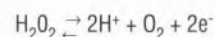
A glucose oxidase foi imobilizada num gel de poliácridamida (de espessura 25-50µm) sobre uma membrana permeável a gás aplicada sobre um eléctrodo de O₂ (geralmente constituído por um cátodo de Pt ou Au rodeado por um ânodo em anel de prata/cloreto de prata) fig. 3.

Para concentrações de glucose inferior a K_M aparente para a glucoseoxidase imobilizada e com O₂ em excesso, há uma relação linear entre a diminuição da corrente devida ao oxigénio e a concentração da glucose.

A glucose oxidase é um enzima que contém FAD. Durante o ciclo catalítico o

grupo prostético flavina é primeiro reduzido pela glucose e depois reoxidado pelo O₂.

No entanto, o comportamento destes eléctrodos depende não só da concentração de glucose mas também da pressão parcial de O₂ na solução que podendo ser variável em amostras de sangue origina flutuações na resposta. Além disso o potencial necessário para reduzir O₂ é bastante elevado o que permite interferências. Por estes motivos passou-se a detectar a H₂O₂ através da reacção de oxidação desta

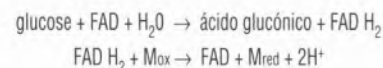


a um potencial de 0,65V vs AgCl/Ag. Contudo, os ácidos ascórbico, úrico, a glutatona, etc., normalmente presentes em amostras biológicas são também oxidados a este potencial. Para evitar a interferência destes têm-se usado membranas tais como a de acetato de celulose assimétrica[6,7] ou sistemas que envolvem outros eléctrodos compensadores.

MEDIADORES E ELÉCTRODOS QUIMICAMENTE MODIFICADOS

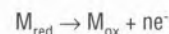
Ultimamente têm-se desenvolvido eléctrodos para a detecção da glucose em que a oxidação da glucose oxidase [8] é feita por um mediador - substância geralmente organometálica de baixo peso molecular - em vez do O₂.

Assim, dar-se-ão as reacções:



na zona que contém o enzima e o mediador (M_{ox} | M_{red}).

Este último é depois oxidado no eléctrodo



Cass et al (1984) estudaram o efeito do ferroceno como mediador. Observaram comportamento electroquímico quase reversível (ΔE_p = 60 mV, i_p/√v = const) para o ferroceno na presença de D-glucose. Ao adicionarem o enzima GOD apareceu uma grande corrente catalítica a potenciais oxidantes (particularmente evidente para velocidades de varrimento lentas (<10 mV s⁻¹).

Apesar de outros mediadores terem sido propostos para a glucose oxidase o ferroceno e seus derivados têm

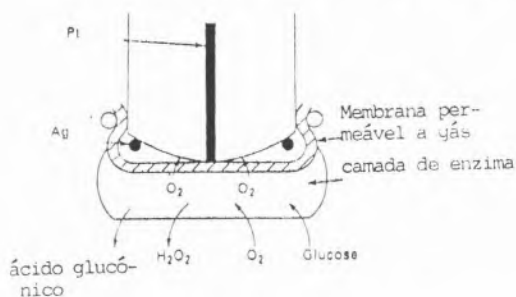
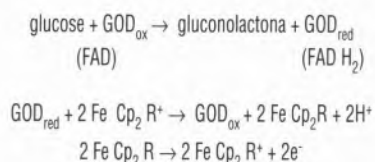


Fig. 3. Eléctrodo de Oxigénio

sido os melhores. O seu potencial de redução (165 mV vs SCE) pode ser variado por derivatização obtendo-se espécies redox mais anódicas ou mais catódicas e com variadas solubilidades.

A sequência reaccional é:



A resposta deste eléctrodo apresenta uma relação linear entre a corrente e a concentração da glucose numa gama que envolve as concentrações usualmente observadas em amostras de sangue de diabéticos 1-30 mM (nível normal de glucose \approx 5 mM). Além disso é insensível a espécies electroactivas. Este eléctrodo foi comercializado inicialmente na forma de uma caneta com eléctrodos descartáveis [9], hoje alterado para a forma de cartão de crédito. O doente aplica uma gota de sangue fresco no sensor, carrega num botão e espera pelo resultado que aparece 30 s depois. Embora não seja tão rigoroso como os aparelhos de laboratório, este sensor permite que os diabéticos controlem a sua própria dieta, injeção de insulina e a tomada de remédios antidiabéticos.

ELÉCTRODOS MODIFICADOS

Um eléctrodo de carbono contendo grânulos de negro de carbono platinizado foi usado para determinar a glucose na presença de GOD sem mediadores [10]. Também foi usado um eléctrodo de carbono vítreo com um filme de platina dispersa em Nafion[11]. Nafion é um Teflon fluorosulfonatado altamente permeável a catiões e espécies neutras rejeitando as espécies aniónicas tais como ácido ascórbico e paracetamol. O Nafion também foi usado como membrana de diálise sobre um eléctrodo de Pt [12]. Eléctrodos de pasta de carbono têm sido também referidos em variadas preparações [13-15].

POLÍMEROS CONDUTORES

Polipirrolo e polianilina polimerizados electroliticamente na presença de glucose oxidase têm sido testados como sensores para a glucose. No caso do polipirrolo no entanto não se dá uma

transferência electrolítica directa entre os centros redox do enzima e o polímero e é necessária a introdução de outras espécies redox[16], usando derivados do polipirrolo [17,18] ou introduzindo micropartículas de platina no polímero [19].

A polianilina foi usada por Shinohara et al.[20]

MODIFICAÇÃO DE ENZIMA

A inserção de moléculas redox no interior do próprio enzima de modo a transportar os electrões do centro activo FAD/FADH₂ do enzima para o eléctrodo também tem sido uma técnica estudada. Destas moléculas chamadas “relays” electrónicos, as melhor sucedidas foram ácido ferrocenocarboxílico e pentamina ruténio (Ru(NH₃)₅Cl₂)[21].

OUTROS ELÉCTRODOS BIOESPECÍFICOS

O eléctrodo de glucose foi extensivamente descrito a título ilustrativo e dada a sua importância.

Muitos outros eléctrodos bioespecíficos têm sido já construídos. Na tabela indicam-se alguns exemplos mais.

*CECUL, Fac. de Ciências, U. de Lisboa

BIBLIOGRAFIA

1. A.P.F. Turner, I. Karube e G. Wilson, *Bio-sensors Fundamentals and Applications*, Oxford, 1987.
2. S. Caras e J. Janata, *Anal. Chem.* **52** (1980) 1935.
3. Y. Hanazato e S. Shiono, *Proc. Int. Meet. Chem. Sensors*, p. 53, Amsterdam, Elsevier, 1983.
4. Y. Miyahara, F. Matsu e T. Moriizumi, *ibid*, p. 233.
5. S.J. Updike, G.P. Hicks, *Nature* **214** (3) (1967) 986.
6. G.G. Guibault, *Analytical uses of Immobilized Enzymes*, Marcel Dekker, New York, 1984.
7. P. Vadvaga, P.W. Crump, *Analyst*, **117** (1992)1657.
8. J.E. Frew, H.A.O. Hill, *Biosensors Proceedings of a Royal Society Discussion Meeting London*, The Royal Society, 1987.
9. Mc Cann J., *World Biotech. Ref.*, 1987, Part 2, 41.
10. H.P. Bennetto, D.R. De Keyzer, G.R. Delaney, A. Koshy, J.R. Mason, L.A. Razack, J.L. Stirling and C.F. Thurston, *Int. Analyst.* **8** (1987) 22.
11. H. Gurasingham e C.B. Tan, *Analyst* **114** (1989) 695.
12. D.J. Harrison, R.F.B. Turner, H.P. Baltes, *Anal. Chem.* **60** (1988) 2002.
13. A. Amine, J.M. Kauffmann, G.J. Patriarche, *Talanta* **38** (1991)107.
14. S. Sakura, R.P. Buck, *Bioelect. Bioenerg.* **28** (1992) 387.
15. T. Ikeda, T. Shibata, S. Todoroki and M. Senda, *Anal. Chim. Acta* **230** (1990) 75
16. M. Umana and J. Waller, *Anal. Chem.* **58** (1986) 2979.
17. N.C. Foulds, C.R. Lowe, *Anal. Chem.* **60** (1988) 2474.
18. P.N. Bartlett, R.G. Whitaker, *J. Elec-troanal. Chem.* **224** (1987) 37.
19. D. Bélanger, E. Brassard, G. Fortier, *Anal. Chim. Acta* **28** (1990) 311.
20. H. Shinohara, T. Chiba, M. Aizawa, *Sensors and Actuators* **13** (1988) 79.
21. Y. Degani and A. Heller, *J. Phys. Chem.* **91**(1987) 1285.

Tabela 1 - Alguns Biosensores

	Enzima*	Gama mmol l ⁻¹
Lactato	LMO	1-40
Piruvato + lactato	LDH.LMO	0-7
Glucose	GOD	0,4-44
Colesterol	ChO+ChE	
Lactose	GOD.β -gal.	1-150
Maltose	GOD.GA	1-50
Sacarose	GOD.MR.IN	1-44
Glutamato	GLOD	0,04-40
Ácido úrico	Uricase	0,1-1,2
Úreia	Urease	0,8-50
Fosfato	GOD.AcP	2-24
Lactato de hidrogenase	LMO	-
Piruvatokinase	LDH.LMO	-
Creatinakinase	PK.LDH.LMO	-

* LMO = Lactato mono-oxygenase; LDH = Lactato de hidrogenase; ChO=Colesterol oxidase; ChE= Colesterol esterase, PK=Piruvato Kinase, GOD= Glucose oxidase; GLOD= Glutamato oxidase; b.gal= b.galactosidade; GA= Glucoamilase; MR= Mutarotase; IN= Invertase; AcP=Acidofosfatase.

CIÊNCIAS FÍSICO-QUÍMICAS

Manuais para o ano lectivo 94/95



LUCINDA MENDONÇA
MARTA RAMALHO

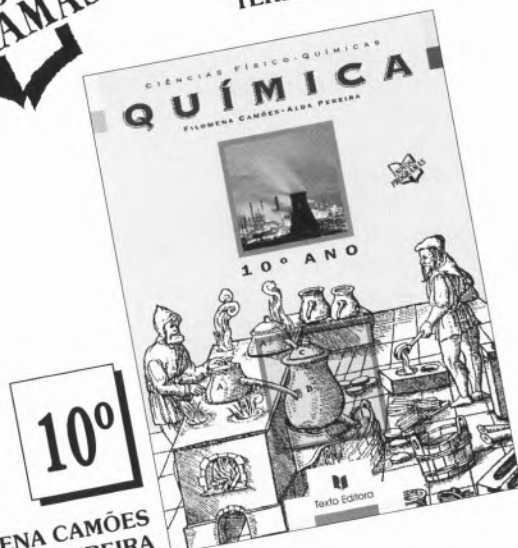
**INOVOS
PROGRAMAS**



TERESA SÁ



ALDA PEREIRA
CONCEIÇÃO GONÇALVES



FILOMENA CAMÕES
ALDA PEREIRA

**TODOS EM
FORMATO GRANDE!**
**TODAS A CORES
E PROFUSAMENTE
ILUSTRADOS!**



Texto Editora

