

Orlando Fatibello Filho e Milton D. Capelato

Departamento de Química da Universidade Federal de São Carlos, Via Washington Luiz, km 235, Caixa Postal 676, CEP 13560 - São Carlos - SP

Recebido em 20/3/91; cópia revisada em 15/10/91

This paper describes the current status of several biosensors (potentiometric, amperometric, piezoelectric, conductimetric, optical, calorimetric and ENFET (Enzymatic Field Effect Transistor) and as well as its future possibilities in several areas. Also, the characteristics of some kinds of sensors that are available in the market are discussed.

Keyword: biosensors

## 1 - INTRODUÇÃO

Clark & Lyons<sup>1</sup> desenvolveram o primeiro biossensor amperométrico à glicose usando *glicose oxidase* fisicamente imobilizada em uma membrana de cuprofane (celulose recuperada) acoplada a um eletrodo de oxigênio, o qual foi sensivelmente melhorado por Updike & Hicks<sup>2</sup> pela imobilização daquela enzima em gelatina. Já Guilbault & Montalvo<sup>3</sup> construíram o primeiro biossensor potenciométrico para uréia pela imobilização de urease em uma matriz de poliacrilamida sobre um eletrodo de vidro seletivo a íons amônio. Desde então, algumas dezenas de novos sensores foram projetados e empregados em análise química de várias substâncias nas áreas biológica, clínica e industrial, como também no monitoramento e controle de alguns poluentes ambientais<sup>4</sup>. Existem relatadas na literatura<sup>5-23</sup> várias excelentes monografias sobre o uso desses biossensores, no entanto, apenas uma foi recentemente publicada no Brasil<sup>14</sup>. Mas Oliveira Neto & Yamana-ka<sup>14</sup> descreveram apenas os biossensores potenciométricos e amperométricos não divulgando os demais tipos de sensores.

No presente trabalho, apresentar-se-ão os vários tipos de biossensores utilizados em análises, o estágio atual e as perspectivas futuras destes, bem como os diversos métodos de imobilização de material biológico.

Um biossensor pode ser definido como um sensor que utiliza um material biológico (enzimas, anticorpos, antígenos, organismos, tecidos animal e vegetal, células, organelas, etc.) conectado a um transdutor (qualquer dispositivo capaz de transformar um tipo de sinal em outro) o qual converte um sinal biológico em sinal elétrico. Imobiliza-se o material biológico em uma membrana adequada, que é acoplada junto à superfície do transdutor, o qual monitorará o desaparecimento de algum reagente ou o aparecimento de algum produto da reação do material biológico com o substrato de interesse (Figura 1).

Quando o biossensor é imerso em solução, o substrato difunde-se para o interior da membrana, onde se encontra o material biológico (e.g. enzimas) imobilizado, o qual catalisa a reação, formando-se assim os produtos ou consumindo co-substratos eletroativos tais como H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, NH<sub>3</sub>, CO<sub>2</sub>, O<sub>2</sub>, ácidos, etc (equação 1):



Enzimas são proteínas que catalisam com grande eficiência as reações biológicas. O uso crescente destes catalisadores em análises químicas deve-se ao fato da alta sensibilidade e es-

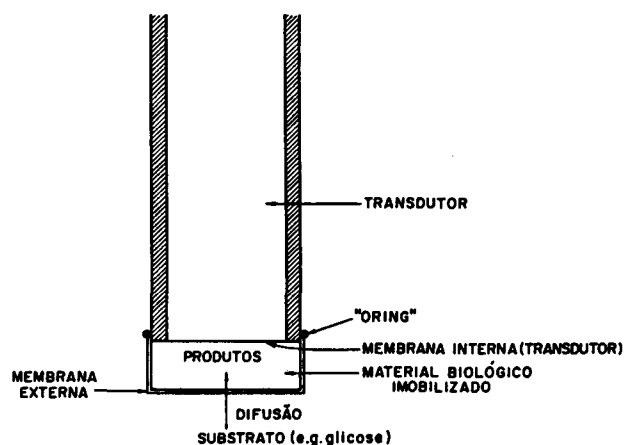
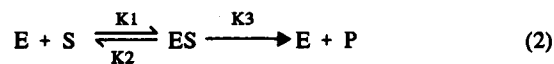


Figura 1 - Esquema de um Biossensor Típico.

pecificidade das suas reações químicas. A especificidade pode variar em função de uma particular enzima.

Reações enzimáticas envolvendo um único substrato podem ser representadas pela expressão geral (equação 2):



onde E representa a enzima, S o substrato, ES o complexo intermediário enzima-substrato e P o produto formado. Para uma concentração fixa de enzima, a velocidade da reação catalítica enzimática é dada pela equação de Michaelis-Menten (eq.3):

$$V = \frac{V_m [S]}{K_m + [S]} \quad (3)$$

onde V representa a velocidade da reação, V<sub>m</sub> a velocidade máxima, que é igual a K<sub>3</sub>[E], [S] a concentração inicial do substrato e, K<sub>m</sub> = (K<sub>2</sub> + K<sub>3</sub> / K<sub>1</sub>) a constante de Michaelis-Menten derivada das constantes de velocidades apresentadas na equação 2.

A Figura 2 mostra como varia a velocidade de reação (em unidades de V<sub>m</sub>) em função da concentração do substrato, [S].

A velocidade de reação aumenta com o aumento da concentração do substrato até atingir um valor máximo onde o

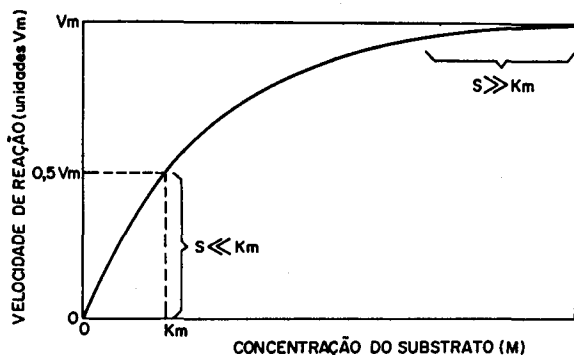


Figura 2 - Dependência da Velocidade de Reação (em Unidades de  $V_m$ ) com a Concentração do Substrato,  $[S]$ .

aumento da concentração do substrato não mais varia a velocidade de reação ( $V_m$ ). Frequentemente nos métodos enzimáticos de análise, a enzima é utilizada para converter uma substância a ser determinada (substrato), a qual não é diretamente medida, em outra a qual pode ser medida ou monitorada por alguma técnica analítica, a saber: manometria, espectrofotometria, fluorescência, eletroquímica e outras. Alternativamente, a diminuição da concentração de um outro reagente poderá ser diretamente monitorada. Para a determinação analítica de um substrato, a reação enzimática deve ser de primeira ou pseudo-primeira ordem com respeito ao substrato de interesse, ou seja,  $[S] \ll K_m$  (região linear do gráfico apresentada na Figura 2). A região do gráfico onde  $[S] \gg K_m$  é utilizada para se determinar a atividade da enzimas, cuja reação é de primeira ou pseudo-primeira ordem em relação a enzima e de ordem zero com relação ao substrato.

## 2 - BIOSENSORES TÍPICOS

A Figura 3 mostra um esquema de biossensores mais utilizados. Este esquema mostra que para um mesmo analito (substrato) a ser analisado, pode-se imobilizar alguns materiais biológicos, separadamente, em vários transdutores. A escolha do material biológico e do transdutor mais adequado depende das propriedades de cada amostra de interesse e do tipo de grandeza física a ser medida pelo transdutor.

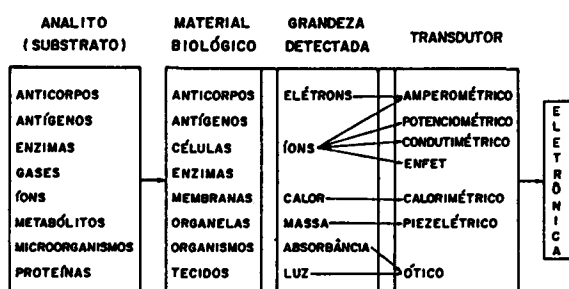


Figura 3 - Esquema de Biossensores mais Utilizados

### 2.1 - Escolha do Material Biológico

Esta é a primeira etapa; o material biológico (e.g. enzima) deverá reagir seletivamente com o analito a ser determinado. O ideal seria envolver o uso da função primária da enzima, i.e., reação principal enzima-substrato. Algumas enzimas como a *urease* e a *glicose-oxidase* possuem alta seletividade para a uréia e a glicose (isômero óptico  $\beta$ -D-glicose), respectivamente. No entanto, outras como a *L-aminoácido oxidase*

catalisa a oxidação de uma classe de substâncias: L-cisteína, L-triptofano, L-fenilalanina e L-metionina em velocidades variadas. Outra enzima, por exemplo a *álcool oxidase* catalisa a oxidação de metanol, etanol e álcool alílico aos respectivos aldeídos com velocidades decrescentes.

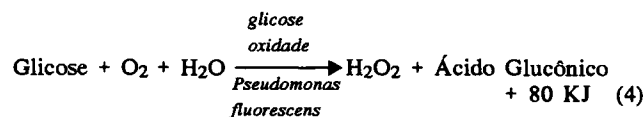
Na análise enzimática de substratos podem ser utilizados basicamente dois métodos: o de equilíbrio e o cinético. No método do equilíbrio, espera-se a reação enzimática atingir o equilíbrio antes de realizar o monitoramento de reagentes e/ou produtos, ao passo que no método cinético não há necessidade de se esperar o término da reação. As medidas de velocidade poderão ser realizadas por vários métodos: da inclinação, do tempo fixo e do tempo variável<sup>20</sup>. O método cinético oferece vantagens de rapidez sobre os de equilíbrio. Em contra-partida, os de equilíbrio são mais precisos do que os cinéticos e não necessitam de um rigoroso controle de temperatura.

O uso de bactérias, tecidos animal e/ou vegetal em muitos casos pode levar a grandes interferências, devido a grande variedade de enzimas presentes nestes materiais biológicos, mas possuem geralmente a grande vantagem de serem regenerados em meios nutrientes apropriados quando armazenados (fora de uso). Apesar disso, em virtude do grande número de materiais biológicos disponíveis no Brasil, seu emprego na construção de vários biossensores é recomendado devido a sua grande viabilidade econômica.

### 2.2 - Escolha do Transdutor mais Adequado

Idealmente, o transdutor a ser utilizado juntamente com o material biológico deverá detectar apenas um reagente ou produto específico, não respondendo a outras substâncias (espécies) presentes na amostra a ser analisada. Dependendo da espécie que é monitorada durante a catálise enzimática pode-se desenvolver diversos biossensores para detecção de um mesmo substrato. Por exemplo, no biossensor à glicose pode-se utilizar pelo menos nove diferentes sensores.

A reação de oxidação da glicose a ácido glucônico por material biológico (e.g. *glicose oxidase* ou *Pseudomonas fluorescens*) envolve o consumo de oxigênio e a liberação de peróxido de hidrogênio com um  $\Delta H$  de 80 KJ por mol de glicose consumida (eq.4):

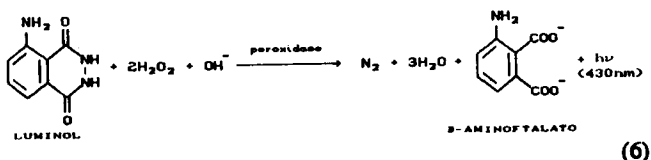


A glicose pode ser detectada por medidas amperométricas usando um eletrodo de oxigênio<sup>24-25</sup> que monitora a diminuição da concentração de oxigênio nos reagentes ou por monitoramento de peróxido de hidrogênio<sup>26,27</sup> em eletrodo de Pt, grafite e/ou outro material pela oxidação de  $\text{H}_2\text{O}_2$  a  $\text{H}_2\text{O}$  e  $\text{O}_2$  em um potencial de +0,60 V aplicado no ânodo (Pt, grafite, etc.). Neste potencial, ácido ascórbico, ácido úrico, acetaminofem, glutatona, cisteína, etc., podem oxidar-se se presentes na amostra, juntamente com o peróxido de hidrogênio, interferindo dessa forma na determinação de glicose. A utilização de mediadores na superfície deste eletrodo, resulta em um eletrodo de glicose onde a interferência daquelas substâncias supracitadas são diminuídas drasticamente, em virtude da diminuição do potencial aplicado neste eletrodo. Por exemplo, Cass et alii<sup>28</sup> imobilizaram juntamente com a enzima *glicose oxidase* um derivado do Ferroceno ( $\text{FeCp}_2\text{R}^+$ ) sobre um eletrodo de grafite, substituindo assim a necessidade de oxigênio (ver eq. 5).



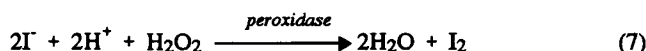
À medida que  $\text{FeCp}_2\text{R}$  é formado na reação enzimática, este é imediatamente reoxidado a  $\text{FeCp}_2\text{R}^+$  na superfície do eletrodo. A construção de biossensores amperométricos usando vários mediadores é descrita por Aston<sup>29</sup>. Outra forma de impedir a interferência dessas substâncias consiste no uso de uma membrana externa de acetato de celulose ou de policarbonato (Nucleopore). Essas membranas por possuírem pequenos poros impedem a difusão destes interferentes até a camada enzimática, deixando difundir apenas o substrato (glicose).

O eletrodo de grafite oferece várias vantagens sobre o eletrodo de platina devido às baixas correntes de fundo (*baixos background*), ao maior intervalo de potencial que pode ser aplicado e à facilidade de modificação de sua superfície, tornando-o mais seletivo para determinadas espécies de interesse (eletrodos modificados)<sup>30</sup>. Outra maneira engenhosa de se detectar o peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) é aquela que utiliza a oxidação do luminol pelo peróxido de hidrogênio que por quimiluminescência<sup>31</sup> fornece luz em um comprimento de onda definido ( $\lambda = 430\text{nm}$ ). O luminol poderá ser convenientemente imobilizado na ponta de uma fibra ótica juntamente com as enzimas *glicose oxidase* e *peroxidase* e a luz produzida pela reação (eq. 6) apropriadamente detectada.



Este tipo de biossensor fibra ótica para glicose está sendo intensivamente desenvolvido por vários pesquisadores<sup>13,31,32</sup>, pois oferece algumas vantagens sobre os biossensores eletroquímicos na implantação subcutânea em pacientes que necessitam de um monitoramento contínuo dessa substância.

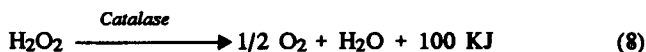
Uma quarta possibilidade para se determinar a glicose seria pela imobilização de *glicose Oxidase* e *peroxidase* sobre um eletrodo Ion-Seletivo à iodeto<sup>33</sup>, como mostra a equação 7, abaixo:



Se a amostra a ser analisada é um fluido biológico, sangue por exemplo, deve-se submetê-la a um pré-tratamento para remoção de espécies como ácido ascórbico, tirosina e ácido úrico, uma vez que estas substâncias reduzem  $\text{I}_2$  a  $\text{I}^-$ . Em seguida, adiciona-se a amostra algumas gotas de solução de iodeto. A água oxigenada gerada pela oxidação do substrato de interesse (glicose) oxida o iodeto adicionado a  $\text{I}_2$  (equação 7). O decréscimo na atividade dos íons iodeto em solução altera o potencial do eletrodo íon seletivo e é inversamente proporcional à concentração de glicose presente na amostra. Aqui também poderia ser utilizada uma membrana protetora de acetato de celulose, eliminando assim a necessidade de um tratamento prévio da amostra.

Um biossensor à glicose baseado na detecção potenciométrica do ácido glucônico formado na hidrólise (eq.4) foi proposto na literatura<sup>34</sup>, e outro foi construído pela imobilização de *glicose oxidase* e *peroxidase* sobre um eletrodo Ion-Seletivo a fluoreto<sup>35</sup>.

Muehlabauer *et alii*<sup>36</sup> propuseram um biossensor termoelétrico aproveitando-se os calores de reações liberados pelas reações enzimáticas mostradas nas eqs. 4 e 8.



O grupo do Dr. Guilbault (Departamento de Química da Universidade de New Orleans, EUA) vem desenvolvendo vários biossensores de fibra ótica pela imobilização da enzima *peroxidase* e de um corante apropriado sobre a ponta de fibras de sílica. A oxidação do corante (incolor) para sua forma oxidada (colorida) pelo peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) (eq.9) é utilizada para determinação de glicose na região do visível (Figura 4).

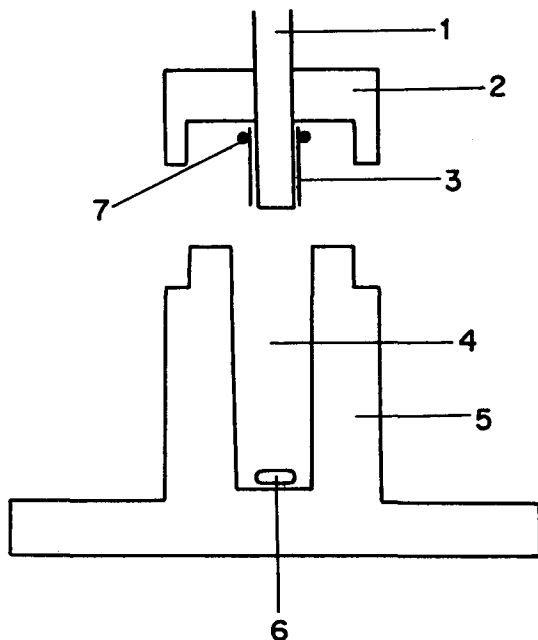
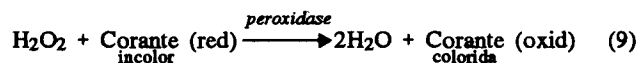


Figura 4 - Célula Usada para Detecção de Glicose com um Sensor Fibra-óptica: 1) Ponta de um Pacote de Fibras Ópticas, 2) Tampa de Célula, 3) Membrana Enzimática, 4) Reagentes, 5) Corpo da Célula, 6) Barra de Agitação e 7) "O-Ring".



Um dos corantes mais usados é o ácido sulfônico do 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolina).

O fenômeno da piezeletricidade foi primeiramente investigado pelos irmãos Pierre e Jacques Curie, em 1880<sup>37</sup>. Esses pesquisadores mostraram que quando alguns cristais, incluindo os de quartzo natural, eram comprimidos em algumas direções, uma diferença de potencial elétrico era produzida entre as superfícies deformadas, sendo a mesma proporcional à pressão aplicada. Também verificaram o efeito oposto, isto é, que a aplicação de uma diferença de potencial sobre um cristal de quartzo provocava distorções físicas no mesmo.

Em 1959, Suerbrey<sup>38,39</sup> trabalhando com filmes metálicos depositados sobre cristais de quartzo derivou uma relação entre a variação de frequência e a massa depositada sobre esses cristais (eq. 10):

$$\Delta F = -2,3 \times 10^6 F^2 \cdot \Delta m/A \quad (10)$$

onde  $\Delta F$  é a variação de frequência devido ao recobrimento (Hz),  $F$  a frequência básica do cristal (MHz),  $\Delta m$  a massa do material depositado (g) e  $A$  a área ( $\text{cm}^2$ ) do cristal de quartzo. Assim uma variação de massa sobre esses cristais causam uma variação de sua frequência. A Figura 5 mostra um cristal piezolétrico de quartzo típico. Os cristais disponíveis comercialmente são geralmente de 9 ou 10 MHz. Estes são construídos pela deposição de finíssimos filmes metálicos (ouro,

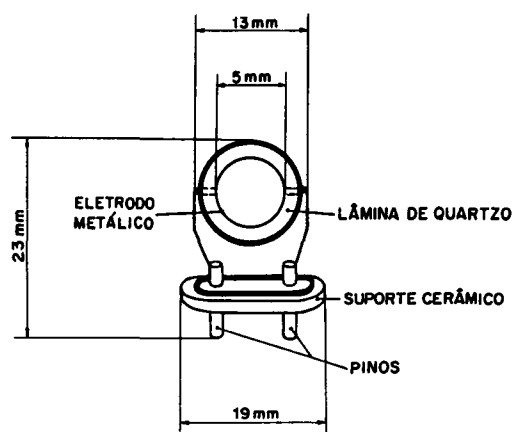


Figura 5 - Cristal Piezelétrico de Quartzo Típico

prata, níquel, etc) sobre ambos os lados de uma lâmina circular de quartzo. Os eletrodos (depósito metálico) são conectados diretamente a dois pinos presos a um suporte de cerâmica.

Um biossensor piezelétrico (ou microgravimétrico) sensível à glicose<sup>40</sup> foi construído pela imobilização de *glicose oxidase* diretamente sobre os dois eletrodos metálicos do cristal.

Finalmente, um biossensor seletivo à glicose baseado em um transistor de efeito de campo (ENFET: ENZYME-BASED-FIELD-EFFECT TRANSISTOR)<sup>41</sup> pode ser visto na figura 6.

Este biossensor foi construído pela imobilização de *glicose oxidase* em uma camada de gel sobre uma membrana sólida seletiva a íons  $H^+$  ( $Si_3N_4$ )(2), a qual está diretamente em contato com a superfície de um desbloqueio isolado de  $SiO_2$  (insulated gate)(1).

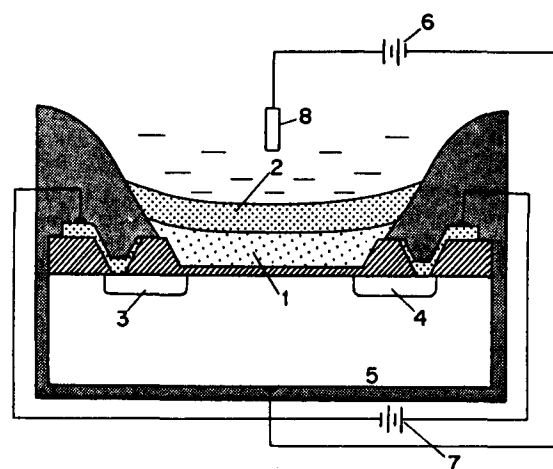


Figura 6 - Transistor de Efeito de Campo Enzimático (ENFET) Seletivo à Glicose: 1) Desbloqueio Isolado de  $SiO_2$  (insulated gate); 2) Membrana Seletiva a Íons  $H^+$  de  $Si_3N_4$ ; 3) Fonte de Silicene do tipo n; 4) Dreno de Silicene do Tipo n; 5) Semicondutor de Silicene do Tipo p; 6) Potencial Aplicado no Desbloqueio Isolado; 7) Potencial de Desbloqueio Medido e 8) Eletrodo de Referência.

Os íons  $H^+$  produzidos pela dissociação do ácido glucônico produzido pela reação enzimática (eq. 4) é transportado até a superfície do desbloqueio isolado após passar seletivamente pela membrana seletiva, produzindo assim um pequeno fluxo de corrente através do canal entre o dreno(4) e a fonte (3),

gerando desta maneira uma diferença de potencial que é medida (potencial de desbloqueio) (7). Esta diferença de potencial é proporcional ao logaritmo da atividade íons  $H^+$  (ou de glicose). O ENFET esquematicamente representado na Figura 6 foi construído com uma pastilha de semicondutor de silicene do tipo p (5), um dreno semicondutor do tipo n (4) e uma fonte semicondutora do tipo n (3). O semicondutor do tipo p foi dopado com alumínio (eletrodeficiente) e os do tipo n com arsênio (eletroabundante). Este biossensor possui tamanho reduzido (poucos milímetros cúbicos) pode ser montado na ponta de um tubo de vidro e selado com resina epoxi. Desta forma é possível utilizá-lo em medidas analíticas em conjunção com um eletrodo de referência externo ( $Ag/AgCl$  ou  $Hg/Hg_2Cl_2$ )(8) ou mesmo com outro ENFET sem a enzima imobilizada.

### 2.3 - Imobilização do Material Biológico

A imobilização ou insolubilização de um material biológico (e.g. enzimas) é muito interessante pois substitui a utilização destes materiais na forma solúvel, evitando a necessidade de removê-los do meio de reação para posterior aplicação. Assim, a utilização de materiais imobilizados além de diminuir o custo por análise, aumenta a rapidez e exatidão do processo. Existem muitos métodos de imobilização enzimática relatados na literatura<sup>5-10,16-23,44-45</sup>, porém a imobilização não deve desnaturar o centro ativo das enzimas utilizadas nos biossensores, devendo ser realizada através dos vários grupos que não possuem atividades catalíticas. Imobilizações por ligação covalente entre um suporte qualquer com  $\gamma$  e  $\epsilon$  amino grupos de aminoácidos, grupos fenólicos da tirosina, hidroxila da serina, hidrogenossulfato da cisteína e imidazol da histidina não diminuem a atividade enzimática e são normalmente usados com grande sucesso.

Os métodos de imobilização de enzimas podem ser divididos nas categorias seguintes: (a) oclusão em gel, (b) microencapsulação, (c) adsorção física e/ou química, (d) ligação química covalente e (e) ligação química covalente cruzada.

A Figura 7 ilustra essas categorias de imobilização.

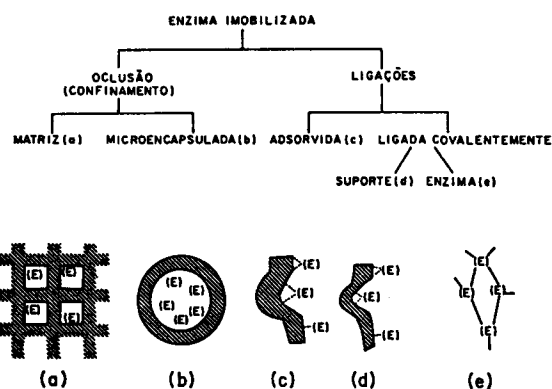


Figura 7 - Métodos de Imobilização de material Biológico: a) Oclusão em Gel; b) Microencapsulação; c) Adsorção Física; d) Ligação Química Covalente e e) Ligação Química Covalente Cruzada.

#### 2.3a - Método da Oclusão em Matriz de Polímero

Este método envolve o confinamento (aprisionamento) da enzima dentro dos espaços intersticiais das ligações covalentes cruzadas de um polímero insolúvel (agar-agar, álcool polivinílico, poliácridamida, amido, borracha de silicene, carragenatos e outros.). Neste processo de imobilização, o monômero, o catalisador de polimerização e a enzima a ser ocluída são misturados em uma solução tampão juntamente com um catalisador adequado. A estrutura do polímero formada por ter

espaços intersticiais pequenos não permite a difusão das moléculas grandes da enzima, mas as moléculas menores do substrato conseguem difundir-se livremente.

A grande vantagem deste método é que a reação entre o substrato e a enzima não sofre nenhuma modificação, pois a imobilização da enzima praticamente não altera a sua estrutura, no entanto, possui a desvantagem da diminuição do tempo de vida útil do sensor, devido a perda de parte da enzima imobilizada causada pela variação do tamanho dos poros intersticiais do polímero.

### 2.3b - Microencapsulação

O método da microencapsulação de enzimas envolve seu confinamento em pequenas esferas (microcápsulas) de membranas semipermeáveis com poros variando de 5 a 300  $\mu\text{m}$ , que permitem somente a livre movimentação de substratos e produtos da reação enzimática. Este tipo de imobilização difere da anterior pois permite o aprisionamento de um volume ou número de moléculas maior do que o anterior, que é geralmente de uma molécula, permitindo uma interação enzimática intermolecular.

Este método possui a vantagem de manter alto grau de recobrimento da atividade da enzima, e permitir a imobilização simultânea de várias enzimas em apenas uma etapa. No entanto, a necessidade de alta concentração de proteína para a microencapsulação, a restrição de passagem de substratos de baixo peso molecular através dos poros da membrana e dificuldades em se fixar essas microcápsulas na base dos sensores, tem dificultado a aplicação desta técnica na construção de biossensores.

### 2.3c - Adsorção Física

A adsorção de enzimas em suportes insolúveis resulta geralmente em interações do tipo iônico, polar, pontes de hidrogênio, ou hidrofóbicas. Esses suportes geralmente possuem superfície ativa e funcionam como excelentes adsorventes e incluem a alumina, resinas de troca-iônica, bentonita, grafite, vidro, nitrato de celulose, agar-agar, sefadex, sílica-gel e outros. A grande vantagem deste método é sua simplicidade, e a grande variedade de suportes que poderão ser utilizados. Possui, por outro lado a grande desvantagem da enzima adsorvida ser extremamente dependente de fatores, tais como pH, solvente, substrato e temperatura.

### 2.3d - Ligação Covalente em Suporte

Este tipo de imobilização em suporte insolúvel é realizada através da ligação covalente de grupos funcionais não ativos da enzima (não essencial para sua atividade catalítica) a grupos reativos (hidroxila, carbonila, amino, fenólico, imidazólico, tiol) ligados na superfície sólida do suporte insolúvel.

A Figura 8 mostra os tipos mais comuns de reações (equações 10-15) envolvidas nas imobilizações de enzimas na ligação covalente em suporte.

Os suportes insolúveis mais utilizados incluem polímeros sintéticos (e.g. celulose, agar-agar, sefarose, colágeno, amido, dextrana, etc.) e materiais inorgânicos (óxidos metálicos e pérolas de vidro com porosidade controlada).

Existem no mercado várias membranas a base de polímeros sintéticos com diversos grupos funcionais ativos capazes de imobilizar enzimas e outros compostos com grande eficiência e praticidade. Um simples contato de uma solução de enzima com essas membranas pré-ativadas é suficiente para imobilizar o material biológico por vários meses sem perda significativa de sua atividade catalítica. A Tabela 1 relaciona as principais membranas comercializadas que vem sendo utilizadas na construção de biossensores com bons resultados práticos.

Recentemente foi lançado pela Hercules INC. (Wilmington,

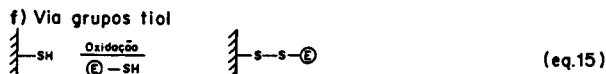
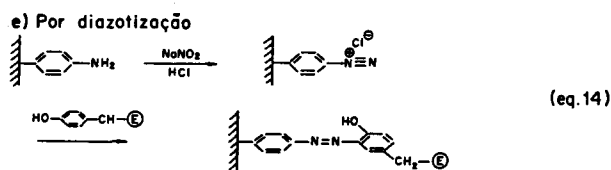
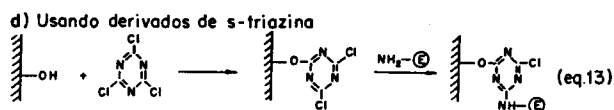
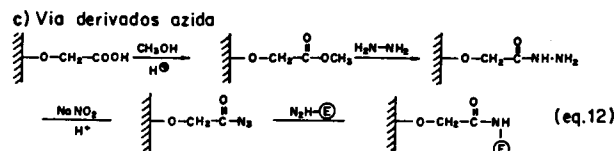
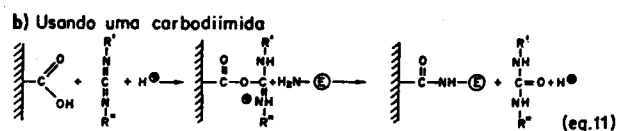
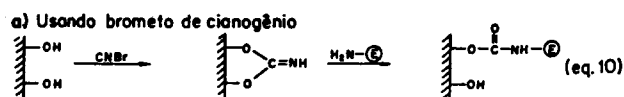


Figura 8- Tipos Mais Comuns de Reações Envolvidas no Método de Imobilização de Enzimas por Ligação Covalente em Suporte.

Delaware, EUA) uma resina (POLYCUP) que reage em condições brandas com vários grupos orgânicos (carbonila, hidroxila, amino e mercaptana). Esta resina tem sido utilizada com grande sucesso em muitas imobilizações de enzimas e na construção de biossensores. A solução de enzima em tampão adequado é misturada com solução da resina Polycup acima da superfície do sensor ou acima de uma membrana de diálise e deixado em repouso durante 12 horas a 4°C. A resina reage com a enzima formando um filme fino sem perda significativa da atividade catalítica. A única desvantagem dessa resina em relação àquelas membranas listadas na Tabela 1 é o tempo relativamente longo, necessário para promover essas imobilizações, mas por outro lado possui a grande vantagem de se poder controlar a espessura do filme sobre o sensor.

### 2.3e - Ligação Covalente Cruzada Intermolecular

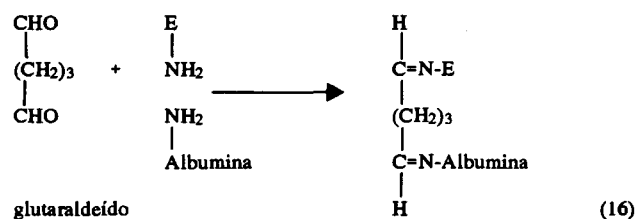
Reagentes bifuncionais (homofuncionais ou heterofuncionais) tem sido utilizados com grande frequência na imobilização de enzimas e/ou outras proteínas. O método baseia-se na formação de partículas macroscópicas em decorrência da formação de ligações covalentes cruzadas entre as moléculas de enzimas e/ou moléculas de suporte inerte com reagentes funcionais. Alguns dos reagentes homofuncionais utilizados incluem: glutaraldeído, ácido bisdiazobenzidina - 2,2'-dissulfônico 4,4'-difluor-3,3'-dinitrodifenil sulfona; enquanto que os heterofuncionais incluem o tricloro-o-triazina, 3-metoxidifenilmetano-4,4'-diisocianato e outros.

O método de imobilização com o glutaraldeído (eq. 16) é um dos métodos mais empregados, pois a enzima geralmente é mantida num ambiente semelhante ao encontrado na natureza, conferindo-lhe boa estabilidade frente as variações de

**TABELA 1 - Principais membranas pré-ativadas comerciais utilizadas na construção de biossensores**

NOME DA MEMBRANA	FABRICANTE	NOME DO POLÍMERO	GRUPO FUNCIONAL
IMMOBILON	MILLIPORE	Polivinideno	imino
BODYDYNE	PALL FILTRACTIVE COMPANY	Nylon não modificado	--
POSIDYNE	PALL FILTRACTIVE COMPANY	Nylon	sal de amônio quatemário
CARBOXYDYNE	PALL FILTRACTIVE COMPANY	Nylon	carbonila
ULTIPOR 66	PALL FILTRACTIVE COMPANY	Nylon	50% de grupos imino e 50% de grupos carboxílicos

pH, força iônica, solventes e temperatura. A estabilidade alcançada por esse método e o tempo gasto na imobilização de enzimas são semelhantes àqueles obtidos pelas membranas encontradas comercialmente mas com a grande vantagem do baixo custo do método.



#### 2.4. Desempenho Analítico dos Biossensores

Um biossensor para ser empregado em análises químicas, deverá necessariamente possuir algumas propriedades, a saber: excelente estabilidade, bom tempo de resposta, baixo limite de detecção, boa seletividade e exatidão. Sendo assim, diversos parâmetros do sensor devem ser investigados: pH de operação, composição do tampão, concentração do material biológico imobilizado, espessura e tipo de imobilização da camada biológica, temperatura, efeito de ativadores, inibidores e interferentes.

##### 2.4a. Estabilidade

A estabilidade de um biossensor está diretamente relacionada com o tipo de imobilização da camada do material biológico. Assim, biossensores com enzimas "imobilizadas" na forma solúvel (pasta de enzima presa com uma membrana de celofane) possuem em média um tempo de vida de uma semana (25-50 determinações), as imobilizadas pelo método da oclusão (2.3a.), microencapsulação (2.3b) ou adsorção física (2.3c) são úteis para 50-100 determinações e dependem crucialmente do grau de cuidado dispendido na preparação do polímero ou do material empregado na adsorção. Os sensores preparados por imobilização por ligação covalente (2.3d) e ligação covalente cruzada (2.3e), geralmente são os que possuem o maior tempo de vida (200-1000 determinações) com o uso de apenas uma membrana com o material biocatalítico.

Outro fator que afeta a estabilidade de alguns biossensores é a perda do cofator dos sítios ativos das enzimas que dele necessitam para a sua atividade.

##### 2.4b. Tempo de Resposta

O tempo de resposta de um biossensor pode ser afetado por vários fatores. Geralmente esse é controlado pela espessura da camada do material biológico imobilizado. Para se obter uma resposta, o substrato deve: a) se difundir do seio da solução até a superfície do biossensor, b) difundir através da membrana externa e reagir com o sítio ativo do material biológico e c) os produtos formados devem difundir-se até a base do sensor para serem detectados. Modelos matemáticos descrevendo esses efeitos são encontrados na literatura<sup>46-48</sup>.

Os diversos fatores que afetam o tempo de resposta estão listados na Tabela 2.

**TABELA 2 - Fatores que afetam o tempo de resposta de um biossensor<sup>49</sup>**

##### 2.1 - Fatores Químicos

- 2.1.1 - Concentração do biocatalisador
- 2.1.2 - Concentração do substrato
- 2.1.3 - pH da solução
- 2.1.4 - Disponibilidade de cofatores
- 2.1.5 - Ativadores enzimáticos
- 2.1.6 - Inibidores enzimáticos

##### 2.2 - Fatores Físicos

- 2.2.1 - Temperatura
- 2.2.2 - Espessura da camada do biocatalisador
- 2.2.3 - Velocidade de agitação
- 2.2.4 - Espessura e permeabilização da membrana externa

##### 2.3 - Fator Instrumental

- 2.3.1 - Tempo de resposta do transdutor

##### 2.4c - Limite de Detecção

A maioria dos biossensores (potenciométricos, condutimétricos, calorimétricos, fibras ópticas) apresentam resposta linear no intervalo de concentração do substrato entre  $10^{-5}$  a  $10^{-2}$ M, enquanto outros [amperométricos e piezométricos (microgravimétricos)] entre  $10^{-8}$  e  $10^{-4}$ M, estando o limite de detecção ligeiramente inferior aos menores valores supracitados.

##### 2.4d - Seletividade

A seletividade de um biossensor será tanto maior quanto for o efeito dos interferentes. Basicamente, as interferências são devidas a duas categorias: 1) interferência na reação do biocatalisador e 2) interferência no transdutor.

##### 2.4d.1) Interferência na Reação do Biocatalisador com o Substrato

A seletividade de um biossensor depende muito do grau de pureza e da especificidade do material biológico usado para construir o biossensor. Geralmente o sensor enzimático é muito mais seletivo que aquele que utiliza células microbianas (tecido animal ou vegetal), visto que neste último podem estar presentes várias enzimas.

Como discutido no item 2.1, enquanto algumas enzimas (glicose oxidase, urease, etc.) são específicas para determinados substratos, outras (L-aminoácido oxidase, penicilinase, álcool oxidase, etc.) possuem baixa especificidade, levando a uma diminuição da seletividade dos biossensores que as contêm.

##### 2.4d.2) Interferência no Transdutor

Idealmente, o transdutor deve responder a um dos reagentes consumidos ou produtos formados na reação biocatalisada.

Na prática, alguns tipos de transdutores responde a determinadas espécies presentes na amostra, prejudicando a seletividade do biossensor. Alguns exemplos já foram discutidos anteriormente (ver 2.2). Sendo assim, é de extrema importância fazer uma remoção prévia desses interferentes ou utilizar outro transdutor mais adequado, conforme sugeridos na figura 3.

### 3. BIOSSENSORES DESCRITOS NA LITERATURA

A Tabela 3.1 apresenta alguns dos biossensores mais importantes descritos na literatura. Nesta tabela, a coluna 1 indica o substrato analisado, as colunas 2 e 3 o nome do material biológico e o tipo de transdutor usado na construção desses biossensores e, a última coluna as referências bibliográficas, onde poder-se-ão obter informações adicionais dos respectivos sensores.

TABELA 3.1 Alguns biossensores descritos na literatura

Substrato	Material Biológico (Tipo)	Tipo de Transdutor (espécie detectada)	Ref.
<b>acetilcolina</b>	<i>colinesterase</i> (E)	potenciométrico(H <sup>+</sup> )	50
<b>ácido acético</b>	<i>alcohol oxidase</i> (E)	amperométrico(O <sub>2</sub> )	51
	<i>Trichosporon brassical</i> (O)	amperométrico(O <sub>2</sub> )	52
<b>ác. ascórbico</b>	<i>ascorbato oxidase</i> (E)	amperométrico(O <sub>2</sub> )	53
		calorimétrico	56
	<i>Cucumis sativus</i> (T)	amperométrico(O <sub>2</sub> )	53
	<i>Cucurbita pepo</i> (T)	amperométrico(O <sub>2</sub> )	54
<b>ácido fórmico</b>	<i>Enterobacter agglomeratus</i> (O)	amperométrico(O <sub>2</sub> )	55
	<i>Pseudomonas oxalaticus</i> (C)	amperométrico(O <sub>2</sub> )	57
<b>ác. láctico</b>	<i>Citrobacter freundii</i> (C)	amperométrico(H <sub>2</sub> )	58
	<i>lactato oxidase</i> (E)	amperométrico(O <sub>2</sub> )	59-61
<b>ác. málico</b>	<i>Escherichia Coli</i> (O)	amperométrico(H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	62,63
		amperométrico(O <sub>2</sub> )	64
<b>ác. málico</b>	<i>malato desidrogenase</i>	amperométrico(NADH)	65
	<i>oxalato oxidase</i> (E)	amperométrico(O <sub>2</sub> )	66
<b>ác. oxálico</b>		amperométrico(H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	67
	<i>oxalato decarboxilase</i> (E)	potenciométrico(CO <sub>2</sub> )	68
<b>ác. oxaloacético</b>	PEIQ-NH <sub>2</sub> (E-artificial)	potenciométrico(CO <sub>2</sub> )	69
<b>ác. pirúvico</b>	<i>piruvato oxidase</i> (E)	amperométrico(O <sub>2</sub> )	70
<b>ác. salicílico</b>	<i>salicilato hidrogenase</i> (E)	amperométrico(O <sub>2</sub> )	71
		potenciométrico(CO <sub>2</sub> )	72
<b>ác. succínico</b>	<i>succinato desidrogenase</i> (E)	amperométrico(O <sub>2</sub> )	73
<b>ác. úrico</b>	<i>urato oxidase</i> (E)	amperométrico(O <sub>2</sub> )	74
		amperométrico(H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	75,76
		potenciométrico(CO <sub>2</sub> )	77
<b>adenosina</b>	<i>adenosina deaminase</i> (E)	potenciométrico(NH <sub>3</sub> )	78
	<i>intestino fino de rato</i> (T)	potenciométrico(NH <sub>3</sub> )	79
<b>álcool etílico</b>	<i>alcohol desidrogenase</i> (E)	amperométrico(O <sub>2</sub> )	80
	<i>alcohol oxidase</i> (E)	amperométrico(NADH)	84
		amperométrico(O <sub>2</sub> )	81
	<i>T.brassical</i> (O)	amperométrico(H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	82
		amperométrico(O <sub>2</sub> )	83
<b>aldeídos</b>	<i>alcohol oxidase</i> (E)	amperométrico(O <sub>2</sub> )	51
<b>alopurinol</b>	<i>xantina oxidase</i> (E)	amperométrico (xantina)	85
<b>amidalina</b>	$\beta$ - <i>glucose oxidase</i> (E)	potenciométrico(CN <sup>-</sup> )	87
<b>aminas (mono)</b>	<i>monoamina oxidase</i> (E)	amperométrico(O <sub>2</sub> )	86
<b>aminas (di)</b>	<i>diamina oxidase</i> (E)	amperométrico(O <sub>2</sub> )	88
<b>D-aminoácidos</b>	<i>D-amino acido oxidase</i> (E)	potenciométrico(NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> )	89
<b>L-aminoácidos</b>	<i>L-amino acido oxidase</i> (E)	potenciométrico(NH <sub>3</sub> )	90
<b>L-arginina</b>	sépalas de crisântemo (T)	potenciométrico(NH <sub>3</sub> )	91
	<i>arginase</i> (E)	potenciométrico(NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> )	92
<b>L-asparagina</b>	receptáculo de crisântemo (T)	potenciométrico(NH <sub>3</sub> )	91
	<i>asparaginase</i> (E)	potenciométrico(NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> )	93
	<i>aspartase</i> (E)	potenciométrico(NH <sub>3</sub> )	94
<b>aspartame</b>	<i>carboxipeptidase A + L-aspartase</i> (E)	potenciométrico(NH <sub>3</sub> )	95
	<i>carboxipeptidase A + fenilalanina decarboxilase</i> (E)	potenciométrico(CO <sub>2</sub> )	96
<b>L-aspartato</b>	<i>Bacterium cadaveris</i> (O)	potenciométrico(NH <sub>3</sub> )	97
	<i>L-aspartase</i> (E)	potenciométrico(NH <sub>3</sub> )	98
<b>Candida albicans</b>	anticorpo (anticandida)	piezelétrico	99
<b>catecol</b>	folhas de espinafre (T) ( <i>Spinacea oleracea</i> )	amperométrico(O <sub>2</sub> )	100
<b>L-Cisteína</b>	$\beta$ - <i>cianoalanina-sintetase</i> (E)	potenciométrico(NH <sub>3</sub> )	101
	berinjela (T) ( <i>Solanum melangena</i> )	amperométrico (o-quinona)	102
<b>cocaína</b>	anticorpo (antibenzoil ecgonina)	piezelétrico	103
<b>colesterol</b>	<i>colesterol estearase + colesterol oxidase</i> (E)	amperométrico(H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	104
	<i>colesterol oxidase</i> (E)	calorimétrico	105
<b>colina</b>	<i>colinesterase</i>	potenciométrico(H <sup>+</sup> )	106
<b>creatinina</b>	<i>creatinase urease e/ou creatinina deaminase</i> (E)	potenciométrico(NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> )	107
		potenciométrico(NH <sub>3</sub> )	108
<b>p-cresol</b>	<i>polifenol oxidase</i> (E)	amperométrico (p-cresol)	109
<b>dióxido de Carbono</b>	<i>anidrase carbonica</i> (E)	piezelétrico	110
	tetrakis (hidroximetil) etilendiamina	piezelétrico	111
<b>dopa</b>	<i>tirosinase</i> (E)	amperométrico (O <sub>2</sub> )	112
<b>dopamina</b>	polpa de banana (T) ( <i>polifenol oxidase</i> )	amperométrico(O <sub>2</sub> )	113
<b>etanol</b>	Ver álcool etílico		

<b>flavina-adenina dinucleotídeo</b>	<i>fosfatase alcalina + adenosina deaminase</i> (E)	potenciométrico(Γ)	114	<b>metanol</b>	<i>Metilomonas metilovora</i> (O)	biocélula à combustível(H <sub>2</sub> )	141
<b>formaldeído</b>	<i>formaldeído desidrogenase</i>	piezelétrico	115	<b>metil-paration</b>	<i>acetilcolinesterase</i> (E)	piezelétrico	103
<b>galactose</b>	<i>galactose oxidase</i> (E)	amperométrico(H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	116	<b>L-metionina</b>	<i>metionina amonialase</i> (E)	potenciométrico (NH <sub>3</sub> )	142
<b>glicose</b>	<i>glicose oxidase</i> (E)	amperométrico(O <sub>2</sub> )	1,24,25	<b>microorganismos</b>	resina epoxi	piezelétrico	143
	<i>glicose oxidase</i> (E)	amperométrico(H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	26,27,117	<b>NAD<sup>+</sup></b>	<i>hexokinase + glicose oxidase</i> (E)	amperométrico(O <sub>2</sub> )	144
	<i>glicose oxidase</i> (E)	fibra-óptica (quimiluminescência)	31,32	<b>NADH</b>	<i>alcoól desidrogenase + peroxidase</i> (E)	amperométrico(O <sub>2</sub> )	145
	<i>glicose oxidase + peroxidase</i> (E)	potenciométrico(Γ)	33			amperométrico(O <sub>2</sub> )	146
	<i>glicose oxidase</i> (E)	potenciométrico(H <sup>+</sup> )	34	<b>nitrito</b>	<i>Azotobacter vinelandii</i> (O)	potenciométrico(NH <sub>3</sub> )	147
	<i>glicose oxidase</i> (E)	potenciométrico(F <sup>-</sup> )	35		<i>nitrito redutase</i> (E)	potenciométrico(NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> )	148
	<i>glicose oxidase</i> (E)	calorimétrico	36	<b>nitroto</b>	<i>nitrito redutase</i> (E)	potenciométrico(NH <sub>3</sub> )	149
	<i>glicose oxidase</i> (E)	piezelétrico	40	<b>p-nitrofenol</b>	<i>acetilcolinesterase</i> (E)	piezelétrico	103
	<i>glicose oxidase</i> (E)	ENFET	41	<b>Paration</b>	<i>acetilcolinesterase</i> (E)	piezelétrico	103
	<i>glicose oxidase</i> (E)	ENFET	41a	<b>penicilina</b>	<i>penicilinase</i> (E)	potenciométrico(H <sup>+</sup> )	150
<b>glicose-6-fosfato</b>	<i>glicose-6-fosfato desidrogenase</i> (E)	amperométrico(NADH)	118		<i>penicilinase</i> (E)	ENFET (H <sup>+</sup> )	151
<b>D-gluconato</b>	<i>gluconato kinase + desidrogenase</i> (E)	potenciométrico(CO <sub>2</sub> )	119		<i>penicilinase</i> (E)	calorimétrico	152
<b>glutamato</b>	<i>glutamato decarboxilase</i> (E)	potenciométrico(CO <sub>2</sub> )	120	<b>peróxido de hidrogênio</b>	<i>catalase</i> (E)	calorimétrico	153
	abóbora amarela (T)	potenciométrico(CO <sub>2</sub> )	121	<b>sacarose</b>	<i>invertase</i> (E)	calorimétrico	154
<b>glutamina</b>	<i>glutaminase</i> (E)	potenciométrico(NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> )	122		<i>invertase + mutarotase + glicose oxidase</i> (E)	amperométrico(H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	155
<b>guanina</b>	figado de coelho (T)	potenciométrico(NH <sub>3</sub> )	123	<b>sulfato</b>	<i>aril sulfatase</i> (E)	amperométrico(O <sub>2</sub> )	156
	<i>guanase</i> (E)	potenciométrico(NH <sub>3</sub> )	124	<b>sulfito</b>	<i>sulfito oxidase</i> (E)	amperométrico(O <sub>2</sub> )	157
<b>3-hidroxi-butirato</b>	<i>3-hidroxi-butirato desidrogenase</i> (E)	amperométrico(NADH)	125	<b>triglicérides</b>	<i>lipase</i> (E)	calorimétrico	158
	<i>3-hidroxi-butirato desidrogenase</i> (E)	amperométrico(NADH)	126		<i>lipase + glicerol desidrogenase + peroxidase</i> (E)	amperométrico(O <sub>2</sub> )	159
<b>hipoxantina</b>	<i>xantina oxidase</i> (E)	amperométrico(H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	127	<b>uréia</b>	<i>urease</i> (E)	potenciométrico(H <sup>+</sup> )	160
<b>L-histidina</b>	<i>histidina amonialiase</i> (E)	potenciométrico(NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> )	128		<i>urease</i> (E)	potenciométrico(CO <sub>2</sub> )	161
	<i>histidina amonialiase</i> (E)	potenciométrico(NH <sub>3</sub> )	129		<i>urease</i> (E)	potenciométrico(NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> )	162
	<i>histidina decarboxilase</i> (E)	potenciométrico(CO <sub>2</sub> )	130		<i>urease</i> (E)	potenciométrico(NH <sub>3</sub> )	163
	<i>Pseudomonas sp.</i> (O)	potenciométrico(NH <sub>3</sub> )	131		<i>urease</i> (E)	calorimétrico	164
	<i>histidina amonialiase</i> (E)	amperométrico(O <sub>2</sub> )	132		<i>urease</i> (E)	ENFET(H <sup>+</sup> )	165
<b>lactose</b>	<i>β-galactosidase + glicose oxidase</i> (E)	amperométrico(H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	133	<b>vitamina B</b>	<i>fermento</i> (O) ( <i>saccharomyces cerevisiae</i> )	amperométrico(O <sub>2</sub> )	166
<b>leucina</b>	<i>leucina desidrogenase + NADH oxidase</i> (E)	amperométrico(O <sub>2</sub> )	134				
<b>lipídeos</b>	<i>fosfolipase Δ + colina oxidase</i> (E)	amperométrico(H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	135				
<b>L-lisina</b>	<i>lisina decarboxilase</i> (E)	potenciométrico(CO <sub>2</sub> )	136				
	<i>lisina decarboxilase + diamina oxidase</i> (E)	amperométrico(O <sub>2</sub> )	137				
<b>Malation</b>	<i>acetilcolinesterase</i> (E)	piezelétrico	103				
<b>maltose</b>	<i>glicoamilase + glicose oxidase</i> (E)	amperométrico(H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	138				
	<i>glicose oxidase</i> (E)	amperométrico(O <sub>2</sub> )	139				
<b>metano</b>	<i>metano oxidase</i> (E)	amperométrico(O <sub>2</sub> )	140				

(E) = enzima (O) = organismo (T) = tecido animal ou vegetal  
(C) = célula

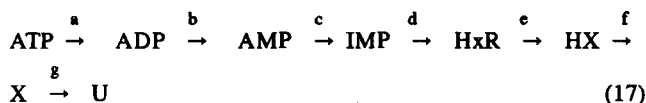
A tabela 3.2 apresenta alguns dos biossensores disponíveis comercialmente e as respectivas empresas. Pode-se notar que os biossensores à glicose são os que possuem maior comercialização, seguido pelo biossensor à ureia.

A caneta medidora de glicose comercializada pela Baxeter é muito prática para as pessoas diabéticas, pois permite o automonitoramento de glicose no sangue em 30 segundos a um custo de 50 centavos de dolar por determinação. Este sensor possui uma ponta trocável com *glicose oxidase* imobilizada que é utilizada para receber uma gota de sangue da pessoa. Após aquele intervalo de tempo supracitado, a concentração de glicose poderá ser lida diretamente de um visor digital alocado na outra extremidade da caneta.

Um outro sensor extremamente interessante é aquele destinado a determinar o grau de deteriorização (ou degradação)



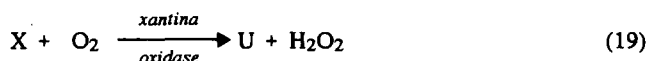
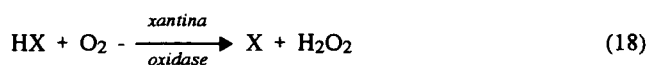
de peixes, uma vez que é muito importante para quem vende, compra e principalmente para o consumidor do produto. Quando o peixe morre, após ter sido pescado, este sofre de composição através da transformação do ATP em ADP (etapa a), este por sua vez para AMP (etapa b) e assim por diante (etapas c a g) até formar o ácido úrico (eq. 17):



onde ATP representa a adenosina-S'-difosfato, AMP a adenosina-S'-monofosfato, IMP a inosina-S'-monofosfato, HxR a inosina, HX a hipoxantina, X xantina e U ácido úrico.

Na maioria dos casos, a etapa determinante (mais lenta) é a etapa (e) ou (f), pois depende da espécie de peixe que está sendo analisado, e conseqüentemente, haverá acúmulo de HxR e HX (inosina e hipoxantina) com o tempo de estocagem desse produto.

Desta maneira, as concentrações de HxR e HX poderão ser utilizadas como indicadores do grau de deteriorização da carne de peixe. A Oriental Electric (Japão) comercializa um biossensor amperométrico baseado na detecção de peróxido de hidrogênio liberado pelas reações enzimáticas mostrada na equação 18 e 19, a seguir:



A Universal Sensors (Norte-americana) vem viabilizando o emprego de biossensores fibra-óptica, para determinação do grau de deteriorização de peixes, como também outros sensores de grande interesse. A tabela 3.3 mostra alguns biossensores que estão sendo desenvolvidos e as respectivas empresas.

TABELA 3.2 - Alguns Biossensores Disponíveis Comercialmente

BIOSENSOR	EMPRESA (PAÍS)
Aspartame	- Universal Sensors (E.U.A.)
Caneta Medidora de Glicose	- Baxeter Helthcare e PPG Biomedical Sensor (E.U.A.); Deerfield (E.U.A.)
Glicose	- Life Science Instrum., Owens, Yellowspring, Proveta, Fiatron e Universal Sensors (E.U.A.); - Fuji Electric (Japão); - Tacussel (França); - Radelkis (Hungria); - Hoffmann-La Roche (Suíça).
Grau de Deteriorização de Peixes	- Oriental Electric (Japão).
Triglicerídeos, Colesterol, Lipase	- Yellowspring, Universal Sensor, Arden Medical System e Kodak (E.U.A.)
Outros (etanol, lactato, maltose, galactose, ascorbato, aminoácidos)	- La Roche (Suíça); - Tacussel (França); - Universal Sensors e Yellowspring (E.U.A.)

#### 4. BIOSSENSORES DO FUTURO

Alguns dos biossensores apresentados na Tabela 3.3 estão sendo testados e comercializados. Por exemplo, o pâncreas artificial, que efetua o controle automático dos níveis de glicose no sangue por injeção contínua de insulina proporcionalmente a quantidade requerida, vem sendo utilizado com relativo sucesso no monitoramento e tratamento de pacientes em unidades de terapia intensiva de muitos hospitais<sup>167</sup>. Sensores construídos para monitoramento contínuo de diversos analitos (enzimas, hormônios, medicamentos, etc) em pessoas pela implantação subcutânea destes, apresentam ainda algumas limitações que necessitam ser superadas<sup>168</sup>. Há necessidade de construir sensores menores (0,5 mm de diâmetro externo), duráveis e biocompatíveis, para oferecer um tempo de vida correspondente com aqueles recomendado nos implantes arteriais (72-96 horas). Rechnitz & Nakamura<sup>169</sup> apresentam sucintamente as necessidades que um biossensor não invasivos (não há contato direto entre o biossensor e o sangue ou outros fluidos do tecido) deve ter para poder ser utilizado com alto grau de confiabilidade. Além destes requisitos, a miniaturização deste sistema permitirá seu uso acoplado ao corpo de pessoas com diabete em situação crítica, o qual poderá transportar tal sistema sem muito problema.

O aprimoramento dos sensores de fibra óptica para o monitoramento de glicose, álcool (transbucal) e os de determinação do grau de deteriorização de peixes permitirão reduzir o tempo e o custo de análise destes analitos, aliados a simplicidade de seu uso.

O desenvolvimento e aperfeiçoamento de biossensores de papel com material biológico imobilizado juntamente com corante; tubos de permeação; piezelétricos e ENFET para detecção e/ou monitoramento de gases poluentes na atmosfera deverão ser os mais utilizados até o final do milênio. Aqueles projetados para controle contínuo dos processos fermentativos (reatores de fermentação) necessitam ainda serem aprimorados para que possam ser aplicados convenientemente.

Já os imunossensores e os quimio-receptores<sup>170</sup>, poderão ser, no futuro, os mais utilizados, em virtude de sua alta especificidade e baixos limites de detecção ( $10^{-15}$  -  $10^{-9}$ M)

TABELA 3.3 - Alguns Biossensores em Desenvolvimento

BIOSENSORES	EMPRESA
Aspartame, Álcool (boca), Grau de deteriorização de peixes (fibra óptica), Glicose (implantáveis), Imunossensores	Universal Sensors (E.U.A.) Oriental Electric (Japão), Tacussel (França), Yellowspring (E.U.A.) Betalike (Japão)
Pâncreas artificial Receptores químicos (quimio-receptores) Tubo detector para gases poluentes (acetaldéido, tolueno, organofosforados, etc.)	Universal Sensors (E.U.A.)  Drägerwerk Ag Lübeck (Alemanha) com Universal Sensors (E.U.A.)

#### AGRADECIMENTOS

Agradecemos o apoio financeiro do CNPq e FAPESP pela bolsa de pós-doutorado concedida para O.F.F. e o trabalho de digitação do texto dos Senhores R. Rissardi e A. Fernando de Oliveira.

#### REFERÊNCIAS

1. Clark, L. & Lyons, C.; *Ann. N.Y.Acad.Sci.* (1962), 102, 29.
2. Updike, S.J. & Hicks, G.P.; *Nature* (1967), 214, 986.

3. Guilbault, G.G. & Montalvo, J.G.; *J. Am. Chem. Soc.* (1969), **91**, 2164.
4. Macholan, L.; "Biocatalytic Membrane Electrodes" in *Bioinstrumentation and Biosensors*, D.L. Wise, Ed., Marcel Dekker, New York (1991), p.366-367.
5. Guilbault, G.G.; Suleiman, A.A.; Fatibello-Filho, O.; Nabi Rahni, M.A.; "Immobilized Bioelectrochemical" Sensors, in *Bioinstrumentation and Biosensors*, D.L. Wise, Ed., Marcel Dekker, New York (1991), p.661-692.
6. Guilbault, G.G. & Luong, J.H.; *Selective Electrode Rev.* (1989) **11**, 3.
7. Campanella, L. & Tomassetti, M.; *Selective Electrode Rev.* (1989) **11**, 69.
8. Mascini, M. & Palleschi, G.; *Selective Electrode Rev.* (1989) **11**, 191.
9. Hansen, E.H.; *Anal. Chim. Acta* (1989) **206**, 257.
10. Guilbault, G.G. & Luong, J.H.; *Chimia* (1988) **42**, 267.
11. Rechnitz, G.A. & Nakamura, R.M.; *J. of Clin. Lab. Anal.* (1988) **2**, 131.
12. Wang, J.; *Electroanalytical Techniques in Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, VCH Publ., New York (1988).
13. Wolfbeis, O.S.; "Fiber optical Fluorosensors in Analytical and Clinical Chemistry" in *Molecular Luminescence Spectroscopy-Methods and Application: Part 2*, Shueman G.G. Ed. J.Wiley, N.York. (1988) p. 129.
14. Oliveira-Neto, G. & Yamanaka, H.; *Química Nova* (1988) **11**, 432.
15. Turner, A.P.F.; Karube, I.; Wilson, G.S.; *Biosensors: Fundamentals and Applications*, Oxford University Press, Oxford (1987).
16. Guilbault, G.G. & Kauffmann, J.M.; *Biotechnol. and Applied Biochem.* (1987) **9**, 95.
17. Mascini, M. & Guilbault, G.G.; *Biosensors* (1986) **2**, 147.
18. Guilbault, G.G. & Oliveira-Neto, G.; "Enzyme, Microbial and Immunochemical Electrode Probes" in *Enzymes and Immobilized Cells in Biotechnology*, A.I. Laskin, Ed.; Benjamin/Cummings Publ. Comp., California (1985) p. 227.
19. Guilbault, G.G.; "Analytical Uses of Immobilized Enzymes" Marcel Dekker; N. York (1984).
20. Carr, P.W. & Bowers, L.D.; "Immobilized Enzymes in Analytical and Clinical Chemistry" J.Wiley; N.York (1980).
21. Kobos, R.K.; "Potentiometric Enzyme Methods" in *Ion-Selective Electrodes in Analytical Chemistry*, H. Freiser, Ed.; Plenum Press; N.York (1980) Vol.2, p.1.
22. Guilbault, G.G.; *Handbook of Enzymatic Analysis*, Marcel Dekker; N.York (1977).
23. Guilbault, G.G.; *Enzymatic Methods of Analysis*, Pergamon Press; Oxford (1970).
24. Enfors, S.O.; *Enzyme Microbiol. Technol.* (1981), **3**, 29.
25. Koyama, M.; Sato, Y.; Aizawa, M.; Suzuki, S.; *Anal. Chim. Acta* (1980), **116**, 307.
26. Guilbault, G.G. & Lubrano, G.J.; *Anal. Chim. Acta* (1973), **64**, 439.
27. Harrison, D.J.; Turner, R.F.B.; Baltes, H.D.; *Anal. Chem.* (1988), **60**, 2002.
28. Cass, A.E.G.; Davis, G.; Francis, G.D.; Hill, A.O.; Aston, W.J.; Higgins, I.G.; Plotkin, E.V.; Scott, L.D.; Turner, A.P.F.; *Anal. Chem.*, (1984), **56**, 667.
29. Aston, W.J.; "The Construction of Mediated Amperometric Biosensors" in *Biosensors: Fundamentals and Applications*, A.P.F. Turner, I. Karube and G.S. Wilson (Eds.), Oxford University Press, Oxford, 1987 p. 276-290.
30. Wang, J.; Hutchins, L.D.; *Anal. Chem.*, (1985), **57**, 1536; Wang, J.; Golden, T.; Tuzhi, P.; *Anal. Chem.*, (1987), **59**, 740; Wang, J.; *Electroanalytical Techniques in Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, VCH Publ., New York (1988), p.113-114.
31. Abdel-Lafit, M.S.; Suleiman, A.; Guilbault, G.G.; Dremel, B.A.A.; Schmid, R.D.; *Anal. Lett.* (1990), **23**, 375.
32. Posch, H.E.; Wolfbets, O.S.; *Mikrochim Acta* (1989), **1**, 41.
33. Nagy, G.; Von-Storp, L.H.; Guilbault, G.G.; *Anal. Chem. Acta* (1973), **66**, 518.
34. Mosbach, K.; Nilsson, H.; Ancerlund, A.; *Biochim. Biophys. Acta.* (1973), **320**, 529.
35. Siddiqi, I.W.; *Clin. Chem.* (1982), **28**, 1962.
36. Muehlbaver, M.J.; Guilbeau, E.S.; Towe, B.C.; *Anal. Chem.* (1989), **61**, 77.
37. Curie, J.; Curie, P.; *Bull. Soc. Min. Paris* (1880), **3**, 90.
38. Sauerbrey, G.Z.; *Z. Physik* (1959), **155**, 206.
39. Sauerbrey, G.G.; *Z. Physik* (1964), **178**, 457.
40. Guilbault, G.G.; Jordan, J.M.; *CRC Critical Reviews in Analytical Chemistry* (1988), **19**, 10.
41. Eddowes, M.J.; Pedley, D.G.; Webb, B.C.; *Analytical Proceedings* (1986), **23**, 152.
- 41a. Hanazato, Y.; Nakako, M.; Maeda, M.; Shiono, S.; *Anal. Chim. Acta*, (1987), **193**, 87.
- 41b. Trevan, M.D.; *Immobilized Enzymes*, John Wiley, New York (1980).
42. Chibata, I.; Tosa, T.; Sato, T.; "Enzyme Technology" in *Biotechnology*, J.F. Kennedy, Ed. VDH Verlagsgesellschaft, Weinheim (1987) p.653.
43. Zaborosky, O.R.; *Immobilized Enzymes*, Chem Rubber Publ. Co., Cleveland (1973).
44. Mattiasson, B.; *Immobilized Cells and Organellas vols 1 e 2*, CRC Press, Boca Raton (1983).
45. Barker, S.A.; "Immobilization of the Biological Component of Biosensors" in *Biosensors - Fundamentals and Applications*, A.P.F. Turner, I. Karube, G. Wilson, Eds, Oxford University Press, Oxford (1987) p.85.
46. Blaedel, W.J.; Kissel, T.R.; Bogaslaski, R.C.; *Anal. Chem.* (1972), **44**, 2030.
47. Mell, L.; Maloy, J.; *Anal. Chem.* (1975), **47**, 299.
48. Leyboldt, J.K.; Gough, D.A.; *Anal. Chem.* (1984), **56**, 2896.
49. Guilbault, G.G.; Suleiman, A.A.; Fatibello-Filho, O.; Nabi-Rahni, M.A.; "Immobilized Bioelectrochemical Sensors" in *Bioinstrumentation and Biosensors*, J. Wisi, Ed., Marcel Dekker, New York (1990) p. 668.
50. Durand, P.; David, A.; Thomas, D.; *Biochem. Biophys. Acta* (1978), **527**, 277.
51. Guilbault, G.G.; Nanjo, M.; *Anal. Chim. Acta* (1975), **75**, 169.
52. Suzuki, S.; Satoh, I.; Karube, I.; *Appe Biochem. Biotchmol.* (1982), **7**, 147.
53. Matsumoto, K.; Yamada, K.; Osajima, Y.; *Anal. Chem.* (1981), **53**, 1974.
54. Macholan, L.; Chmelikova, B.; *Anal. Chim. Acta* (1986), **185**, 187.
55. Vincke, B.J.; Devleeschouwer, M.J.; Patriarche, G.J.; *Anal. Lett* (1985), **18**, 1593.
56. Mattiasson, B.; Danielsson, B.; *Carbohydr. Res.* (1982), **102**, 273.
57. Ho, M.Y.K.; Rechnitz, G.A.; *Biotechnol. Bioeng.* (1985), **27**, 1634.
58. Matsunaga, T.; Karube, I.; Suzuki, S.; *J. Microbiol. Biotechnol.* (1980), **10**, 235.
59. Mascini, M.; Moscone, D.; Palleschi, G.; *Anal. Chim. Acta* (1984), **157**, 45.
60. Mizutani, F.; Yamanaka, T.; Tanabe, Y.; Tsuda, K.; *Anal. Chim. Acta* (1985), **177**, 153.
61. Mascini, M.; Fortunati, S.; Moscone, D.; Palleschi, G.; Massi-Benedetti; Fabietti, P.; *Clin. Chem.* (1985), **31**, 451.
62. Mullen, V.H.; Churchhouse, S.J.; Keedy, F.H.; Vadgama, P.M.; *Clin. Chim. Acta* (1986), **157**, 191.
63. Tsuchida, T.; Takagushi, H.; Yoda, K.; Tarizawa, K.; Kobayashi, S.; *Biotechn. Bioeng* (1985), **27**, 837.
64. Adamowicz, E.; Burstein, C.; *Biosensors* (1988) **3**, 27.
65. Blaedel, W.J.; Engstrom, R.C.; *Anal. Chem.* (1980), **52**, 1691.

66. Rahni, M.N.; Guilbault, G.G.; Oliveira-Neto, G.; *Anal. Chem.* (1986), **58**, 523.
67. Assolant-Vinet, C.H.; Bardeletti, G.; Coulet, P.R.; *Anal. Lett.* (1987), **20**, 513.
68. Kobos, R.K.; Ransey, T.A.; *Anal. Chim. Acta* (1980), **121**, 111.
69. Ho, M.Y.K.; Rechnitz, G.A.; *Anal. Chem.* (1987), **59**, 536.
70. Zapata-Bacri, A.M.; Burstein, C.; *Biosensors* (1987), **3**, 227.
71. Rahni, M.N.; Guilbault, G.G.; Oliveira-Neto, G.; *Anal. Chim. Acta* (1986), **181**, 219.
72. Fonong, T.; Rechnitz, G.A.; *Anal. Chim. Acta* (1984), **158**, 357.
73. Guilbault, G.G.; Suleiman, A.A.; Resultados não Publicados.
74. Guilbault, G.G.; Nanjo, M.; *Anal. Chem.* (1974), **46**, 1769.
75. Jaenchen, M.; Gruenig, G.; Betermann, K.; *Anal. Lett.* (1985), **18**, 1799.
76. Iwai, H.; Akihama, S.; *Chem. Pharm. Bull.* (1986), **34**, 3471.
77. Kawashima, T.; Arima, A.; Hatakeyma, N.; Tominaga, N.; Ando, M.; *Nippon Kagaku Kaishi* (1980), 1542.
78. Deng, I.; Enke, C.; *Anal. Chem.* (1980), **52**, 1937.
79. Arnold, M.A.; Rechnitz, G.A.; *Anal. Chem.* (1981), **53**, 515.
80. Jaegfeldt, H.; Torstensson, A.; Johansson, G.; *Anal. Chim. Acta* (1978), **97**, 221.
81. Kulys, J.; Kadziauskiene, K.; *Biotechnol. Bioeng.* (1980), **22**, 221.
82. Belghit, H.; Romette, J.L.; Thomas, D.; *Biotechnol. Bioeng.* (1987), **30**, 1001.
83. Hikuma, M.; Kubo, T.; Yasuda, T.; Karube, I.; Suzuki, S.; *Biotechnol. Bioeng.* (1979), **21**, 1845.
84. Albery, W.J.; Bartlett, P.N.; Cass, A.E.; Sim, K.W.; *J. Electroanal. Chem. Interfacial Electrochem.*
85. Martin, G.B.; Rechnitz, G.A.; *Anal. Chim. Acta* (1990), **237**, 91.
86. Karube, I.; Satoh, I.; Araki, Y.; Suzuki, S.; Yamada, H.; Resultados não Publicados.
87. Rechnitz, G. A.; Llenado, R.; *Anal. Chem.* (1971), **43**, 1457.
88. Toul, Z.; Macholan, L.; *Coll. Czech. Chem. Commun.* (1975), **40**, 2208.
89. Llenado, R.; Rechnitz, G.; *Anal. Chem.* (1974), **46**, 1109.
90. Guilbault, G. G.; Hrabankova, E.; *Anal. Chim. Acta* (1971), **56**, 285.
91. Uchiyama, S.; Rechnitz, G. A.; *Anal. Lett.* (1987), **20**, 451.
92. Anfalt, T.; Granelli, A.; Jagner, D.; *Anal. Lett.* (1973), **6**, 969.
93. Wawro, R.; Rechnitz, G.; *J. Membrane Sci.* (1976), **56**, 333.
94. Fatibello-Filho, O.; Suleiman, A.A.; Guilbault, G.G.; *J. Macromol. Sci. Chem.* (1989), **26**, 1261.
95. Fatibello-Filho, O.; Suleiman, A.A.; Guilbault, G.G.; Lubrano, G.L.; *Anal. Chem.* (1988), **60**, 2397.
96. Nikolelis, D.P. and Krull, U.J.; *Analyst* (1990), **115**, 883.
97. Kobos, R.K.; Rechnitz, G.A.; *Anal. Lett.* (1977), **10**, 751.
98. Fatibello-Filho, O.; Suleiman, A.A.; Guilbault, G.G.; *Biosensors* (1989), **4**, 313.
99. Karube, I.; Goth, A.; *Nato Advanced Research Workshop on Analytical uses of Immobilized Biological Compounds*, Reidel Press, 1987, p. 187.
100. Uchiyama, S.; Tamata, M.; Tofuku, Y.; Suzuki, S.; *Anal. Chim. Acta* (1989), **208**, 287.
101. Guilbault, G.G.; Gutknecht, W.F.; Kuan, S.S.; Cockran, R.; *Anal. Biochem.* (1972), **46**, 200.
102. Navaratne, A.; Lin, M.S.; Rechnitz, G.A.; *Anal. Chim. Acta* (1990), **237**, 107.
103. Guilbault, G.G.; Luong, J.H.; *J. of Biotechnol.* (1988), **9**, 1.
104. Clark, L.C.; Duggan, C.; Grooms, T.; Hart, L.; Moore, M.; *Clin. Chem.* (1981), **27**, 1978.
105. Danielsson, B.; Mattiasson, B.; Mosbach, K.; *Appl. Biochem. Bioeng.* (1981), **3**, 97.
106. Campanella, L.; Tomassetti, M.; Sammartino, M.P.; *Analyst.* (1988), **113**, 77.
107. Thompson, H.; Rechnitz, G.A.; *Anal. Chem.* (1974), **46**, 246.
108. Campanella, L.; Mazzei, F.; Sammartino, M.P.; Tomassetti, M.; *Biolecc. and Bioenerget.* (1990), **23**, 195.
109. Hall, G.H.; Best, D.J.; Turner, A.P.F.; *Enzyme Microb. Technol.* (1988), **10**, 543.
110. Fatibello-Filho, O.; Guilbault, G.G.; Resultados não Publicados.
111. Fatibello-Filho, O.; Andrade, J.F.; Suleiman, A.A.; Guilbault, G.G.; *Anal. Chem.* (1989), **61**, 746.
112. Iborra, J.L.; Vilanova, R.; Lozano, J.A.; *Biochem. Educ.* (1981), **9**, 5.
113. Sidwell, J.S.; Rechnitz, G.A.; *Biotech. Lett.* (1985), **7**, 419.
114. Yatim, A.R.; Riechel, T.L.; *Anal. Lett.* (1984), **17**, 835.
115. Guilbault, G.G.; *Anal. Chem.* (1984), **55**, 1682.
116. Johnson, J.M.; Halsall, H.B.; Heineman, W.R.; *Anal. Chem.* (1982), **54**, 1394.
117. Palleschi, G.; Nabi-Rahni, M.; Lubrano, G.J.; Ngwainbi, J.; Guilbault, G.G.; *Anal. Biochem.* (1986), **159**, 114.
118. Cenas, N.; Rozgaite, J.; Kulys, J.; *Biotechnol. Bioeng.* (1984), **26**, 551.
119. Jensen, I.M.; Rechnitz, G.; *J. Membrane Sci.* (1979), **5**, 117.
120. Yanushyvychyute, B.J.; Pulyukonis, A.B.; Zazlauskas, D.A.; *Anal. Chem. (URSS)* (1983), **38**, 498.
121. Kuriyama, S.; Rechnitz, G.A.; *Anal. Chim. Acta* (1981), **131**, 91.
122. Guilbault, G.G.; Shu, F.; *Anal. Chim. Acta* (1971), **56**, 333.
123. Arnold, M.A.; Rechnitz, G.A.; *Anal. Chem.* (1982), **54**, 777.
124. Nikolelis, D.; Papastathopoulos, D.S.; Hadjiioannou, T.P.; *Anal. Chim. Acta* (1981), **126**, 143.
125. Palleschi, G.; Rathore, H.S.; Mascini, M.; *Anal. Chim. Acta* (1988), **209**, 223.
126. Macneil, C.J.; Spoor, J.A.; Cooper, J.M.; Albert, K.G.M.M.; Mullen, W.H.; *Anal. Chim. Acta* (1990), **237**, 99.
127. Watanabe, E.; Ando, K.; Karube, I.; Matsuoka, H.; Suzuki, S.; *J. Food Sci.* (1983), **48**, 496.
128. Ngo, T.; *Int. J. Biochem.* (1975), **6**, 371.
129. Walters, R.; Johnson, P.; Buck, R.; *Anal. Chem.* (1980), **52**, 1684.
130. Kovach, P.M.; Meyerhoff, M.E.; *Anal. Chem.* (1982), **54**, 217.
131. Walters, R.R.; Moriarty, B.E.; Buck, R.P.; *Anal. Chem.* (1980), **52**, 1680.
132. Cheng, F.; Christian, G.D.; *Analyst* (1977), **102**, 124.
133. Bertrand, C.; Coulet, P.R.; Gatheron, D.G.; *Anal. Chim. Acta* (1981), **126**, 23.
134. Huck, H.; Schelter-Graf, A.; Danzer, J.; Kirch, P.; Schmidt, H.L.; *Analyst* (1984), **109**, 147.
135. Suzuki, S.; Karube, I.; *Enzyme Eng.* (1980), **55**, 205.
136. Guilbault, G.G.; White, C.; *Anal. Chem.* (1978), **50**, 1481.
137. Macholan, L.; *Coll. Czech. Chem. Commun.* (1978), **43**, 1811.
138. Coulet, P.R.; Bertrand, C.; *Anal. Lett.* (1979), **12**, 581.
139. Marschall, L.B.; Christian, G. D.; Kumar, A.; *Analyst* (1977), **102**, 424.
140. Karube, I.; Okada, T.; Suzuki, S.; *Anal. Chim. Acta* (1982), **135**, 61.
141. Box, J.; Mason, J.R. Comunicação Verbal.

142. Guilbault, G.G.; Kuan, S.S.; Fung, H.Y.; *Anal. Chem.* (1979), **51**, 2319.
143. Ishmor, Y.; Karube, I.; Suzuki, S.; *Applied and Environ. Microbiol.*, (1981), **632**, 637.
144. Pfeiffer, D.; Scheller, F.; Janchen, M.; Betermann, K.; Weise, H.; *Anal. Lett.* (1980), **13**, 1179.
145. Jaegfeldt, H.; Torstenson, A.; Johnansson, G.; *Anal. Chim. Acta* (1978), **97**, 221.
146. Kirstein, D.; Schubert, F.; Scheller, F.; *Anal. Lett.* (1982), **15**, 1479.
147. Kobos, R.K.; Pyon, H.Y.; *Biotechnol. Bioeng.* (1981), **23**, 627.
148. Kiang, C.; Kuan, S.S.; Guilbault, G.G.; *Anal. Chem.* (1978), **50**, 1319.
149. Kiang, C.; Kuan, S.S.; Guilbault, G.G.; *Anal. Chim. Acta* (1975), **80**, 209.
150. Dobrolyubov, A.G.; Emel'Yandu, Yu. G.; Grinshpan, D.D.; Itsygin, S.B.; Kaputskii, F.N.; *Antibiot. Med. Biotechnol.* (1987), **32**, 894.
151. Caras, S.D.; Janata, J.; *Anal. Chem.* (1980), **52**, 1935.
152. Mattiasson, B.; Danielsson, B.; Winqvist, F.; Nilsson, H.; Mosbach, K.; *Appl. Environ. Microbiol.* (1981), **41**, 903.
153. Danielsson, B.; Mosbach, K.; *FEBS Lett.* (1979), **101**, 47.
154. Mattiasson, B.; Danielsson, B.; *Carbohydr. Res.* (1982), **102**, 273.
155. Xu, Y.; Guilbault, G.G.; Kuan, S.S.; *Anal. Chem.* (1989), **61**, 782.
156. Guilbault, G.G.; Cserfalvi, T.; *Anal. Chim. Acta* (1976), **84**, 259.
157. Smith, V.I.; *Anal. Chem.* (1987), **59**, 2256.
158. Satoh, I.; Danielsson, B.; Mosbach, K.; *Anal. Chim. Acta* (1981), **131**, 255.
159. Kelly, T.A.; Christian, G.D.; *Analyst* (1984), **109**, 453.
160. Nilsson, H.; Akerlund, A.; Mosbach, K.; *Biochem. Biophys. Acta.* (1973), **320**, 529.
161. Tran-Minh, C.; Broun, G.; *Anal. Chem.* (1975), **47**, 1359.
162. Guilbault, G.G.; Nagy, G.; *Anal. Chem.* (1973), **45**, 417.
163. Mascini, M.; Guilbault, G.G.; *Anal. Chem.* (1977), **49**, 755.
164. Fulton, S.P.; Cooney, C.L.; Weaver, J.C.; *Anal. Chem.* (1980), **52**, 505.
165. Miyahara, Y.; Matsu, F.; Moriizumi, T.; "Micro-Enzyme sensor using semiconductor and enzyme-immobilization techniques."; in *Proceedings of the International Meeting on Chemical Sensors*, Fukuoka, Japan, September 19-22, 1983, p. 513.
166. Suzuki, S.; Satoh, I.; Karube, I.; *Appl. Biochem. Biotechnol.* (1982), **7**, 147.
167. Mascini, M.; Pallechi, G.; *Selective Electrode Rev.* (1989), **11**, 191.
168. Collison, M.E.; Meyerhoff, M.E.; *Anal. Chem.* (1990), **7**, 425A.
169. Rechnitz, G.A.; Nakamura, R.M.; *J. of Clin. Laborat. Anal.* (1988), **2**, 131.
170. Rechnitz, G.A.; *Chemical and Eng.* (1988), September 5, 24.

Publicação financiada pela FAPESP