



Mestrado Integrado em Eng. BIOMÉDICA e Eng. FÍSICA

UC – BIOSSENSORES

Cap2 – Elementos Biológicos

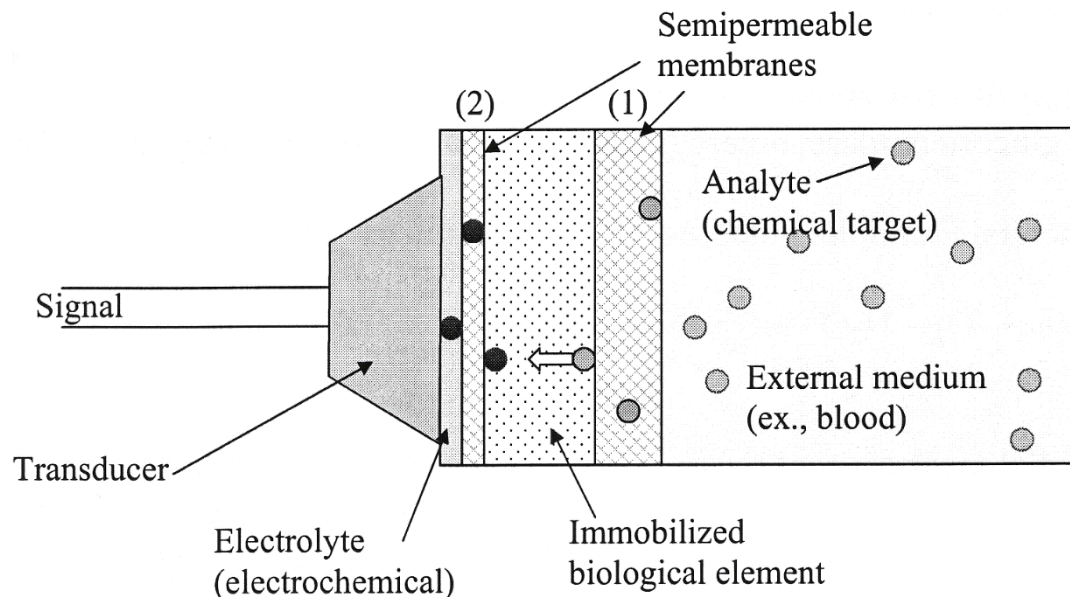


Elementos biológicos

Elementos (materiais) biológicos tais como:

Enzimas e Anticorpos são utilizados com muito sucesso

Células e DNA estão progressivamente a ser mais utilizados.



Classes dos biossensores

Biossensores catalisadores:

Dispositivos cinéticos que medem concentrações em estado estacionário de uma espécie (detectado por um transdutor) e formado devido a uma reacção biocatalítica

Biocatalisadores utilizados:

- 1) enzimas
- 2) micro-organismos
- 3) tecidos

Catalisador é toda e qualquer substância que acelera uma reação,

A **catálise** é a alteração de velocidade de uma reação química devido à adição de uma substância (catalisador) que praticamente não se transforma no final da reação.



Classes dos biossensores

Biossensores de afinidade:

Dispositivos nos quais as moléculas da substância a analisar ligam-se às moléculas receptoras (imobilizado na superfície do biossensor) "**irreversivelmente**", provocando uma alteração físico-química que é detectada por um transdutor

Moléculas receptoras:

- 1) anticorpos
- 2) ácidos nucleicos



Enzimas

Enzimas são catalisadores biológicos que aumentam a velocidade das reacções químicas que ocorrem na célula e organismos sem se alterar.

Os reagentes que participam nas reacções catalisadas por enzimas chamam-se substratos e cada enzima tem um carácter específico, isto é, actua sobre um determinado substrato convertendo-o num determinado produto.

Muitas enzimas (amidases, descarboxidases, esterases, fosfatases, nucleases, oxido-redutases) são utilizadas em biossensores.



Enzimas

Os reagentes consumidos ou produtos formados podem ser detectados ou medidos através dos transdutores electroquímicos, ópticos, etc.

Existe uma classe de enzima que, em comparação com os outros grupos, tem sido especialmente fértil: a das oxido-redutases.

Este grupo de enzimas catalisa reacções de oxidação-redução ou redox que envolvem processos de transferência de electrões na conversão enzimática do reagente em produto.

A actividade das enzimas oxido-redutases depende, em geral, de uma molécula orgânica não proteica, uma vitamina ou um ião metálico, denominados co-enzima ou co-factores.



Enzimas

Entre as oxido-redutases mais estudadas no desenvolvimento de biossensores podem destacar-se três subdivisões principais:

Oxidase – Enzimas que transferem hidrogénio para o oxigénio, em particular, dois ($2\text{H}^+ + 2\text{e}^-$) ou quatro ($4\text{H}^+ + 4\text{e}^-$) hidrogénios formando respectivamente peróxido de hidrogénio (H_2O_2) e água.

Desidrogenases – Enzimas que transferem hidrogénio para um receptor que não o oxigénio molecular (NAD^+ , substratos).

Peroxidases - Enzimas que transferem hidrogénio para peróxidos (H_2O_2 ou peróxidos orgânicos).



Vantagens da utilização de enzimas em biossensores

- 1 – Ligam-se a um substrato
- 2 – São extremamente selectivas
- 3 – Têm actividade catalítica, melhorando a sensibilidade
- 4 – Actuam razoavelmente rápido
- 5 – São os componentes biológicos mais utilizados



Vantagens da utilização de enzimas em biossensores

Os catalisadores agem provocando um novo caminho reacional, no qual tem uma menor energia de ativação.

Como são catalisadores, as enzimas não são consumidas na reação e não alteram o seu [equilíbrio químico](#).

As enzimas convertem uma substância, chamada de [substrato](#), noutra denominada [produto](#), e são extremamente específicas para a reacção que catalisam.



Isso significa que, em geral, uma enzima catalisa um e só um tipo de reacção química. Consequentemente, o tipo de enzimas encontradas numa célula determina o tipo de [metabolismo](#) que a célula efetua.



Desvantagens da utilização de enzimas em biossensores

- 1 – São caras. O custo de extrair, isolar e purificar é muito elevado e por vezes o custo da fonte da enzima também pode ser elevado. Contudo, encontram-se comercialmente disponíveis uma larga gama de enzimas, normalmente em ensaios com características bem definidas.
- 2 – Existe normalmente uma perda de actividade quando elas são imobilizados num transdutor.
- 3 – Têm tendência a perder actividade, devido à desactivação, após um período de tempo relativamente pequeno.



Discussão

Porque é que a resposta de uma enzima se torna não-linear para concentrações analíticas elevadas?



Discussão

As enzimas podem catalisar até vários milhões de reacções por segundo.

As velocidades de reacção dependem das condições em que as enzimas se encontram e da concentração de substrato. Condições de [temperatura](#) elevada, pH extremos ou elevadas concentrações [salinas](#) desestabilizam a estrutura da proteína, [desnaturando-a](#). Por outro lado, em geral, um aumento na concentração de substrato tende a aumentar a actividade enzimática.

A **saturação acontece** porque, à medida que é aumentada a concentração de substrato, aumenta também a quantidade de enzima presente sob a forma de complexo enzima-substrato (ES). À **velocidade máxima**, todos os centros activos estão ocupados (saturados) com substrato, ou seja, não existe enzima livre para ligar mais substrato e a concentração de complexo ES é igual à concentração de enzima.



Aplicações das enzimas em biossensores

O maior mercado das enzimas reside actualmente nos diagnósticos clínicos *in vitro*.

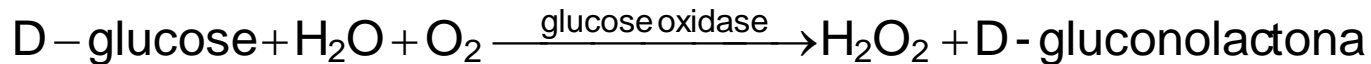
As enzimas para fins de diagnóstico, devem possuir elevado grau de pureza. Implica a utilização de processos de purificação complexos e dispendiosos.

Na área das análises clínicas, uma aplicação importante de enzimas em diagnóstico clínico relaciona-se com o controlo da glucose em pacientes com diabetes e, mais recentemente, do colesterol de acordo com o seguinte esquema de reacções enzimáticas:



Aplicações das enzimas em biossensores

Glucose:



Crítérios de desempenho:

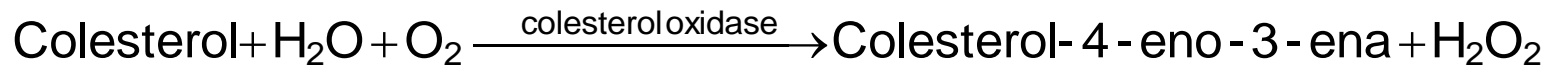
Gama: < 1-30mM

Tempo de resposta: 1-1.5 min

Tempo de recuperação: 30s

Tempo de vida: vários meses

Colesterol



Aplicações das enzimas em biossensores

Estas técnicas tiveram enorme sucesso com a implementação das Tiras Teste, que permitem o controlo pelo próprio paciente no domicílio, pois são de utilização muito simples.

Evita-se assim a ida regular dos doentes ao hospital ou centro de saúde.

Estes ensaios são efectuados quantitativamente em auto-analisadores ou qualitativamente (avaliação visual) no caso das Tiras Teste.



Aplicações das enzimas em biossensores

Este tipo de biossensor caracteriza-se por uma complexidade mínima, mas capaz de produzir resultados com suficiente exactidão, determinando se a glucose ou colesterol estão acima ou abaixo de um valor pré-definido fisiológico específico.

Neste caso, o biossensor deve ser projectado de modo a dar um número mínimo de respostas ou sinais positivos falsos, mas mais importante um número mínimo de falsos negativos.



Tecidos

Tecidos de animais e de plantas podem ser directamente utilizados com uma preparação mínima.

Geralmente, os tecidos contêm uma multiplicidade de enzimas e podem não ser tão selectivos como as enzimas purificadas.

Contudo, as enzimas nos tecidos existem no seu ambiente natural e neste caso estão menos sujeitas a degradação.

Assim, os biossensores podem ter um tempo de vida maior.

Por outro lado, a resposta pode ser mais lenta, uma vez que existe mais material de tecido para ser difundido pelo substrato.



Vantagens da utilização de tecidos em biossensores

Utilização de tecidos de plantas e animais como elementos selectivos em biossensores.

- 1 - Os tecidos são mantidas no seu ambiente natural
- 2 - A actividade dos tecidos é estável (no que respeita a alterações de pH e de temperatura)
- 3 - Em alguns casos funcionam onde as enzimas purificadas falham
- 4 - São muito mais baratos que as enzimas purificadas
- 5 - Melhores tempo de vida nos biossensores



Desvantagens da utilização de tecidos em biossensores

A maior desvantagem é alguma perda de selectividade uma vez que normalmente contêm, uma mistura de enzimas, isto é, alguns tecidos podem ser utilizados para determinar mais que uma substância (vantagem ou desvantagem?).

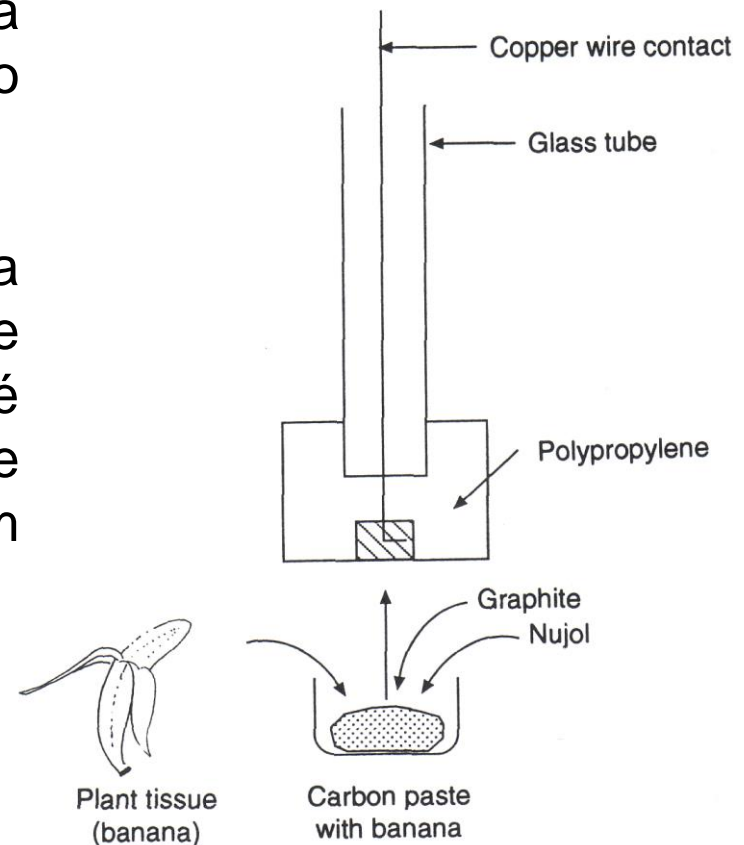


Aplicações de tecidos em biossensores

Biossensor para determinação da dopamina (substância química do cérebro).

Utiliza o tecido da banana misturado com grafite em pó e parafina líquida e essa mistura é colocada num recipiente que contém um eléctrodo, sendo assim formado o biossensor.

Eléctrodo:



Micro-organismos

Os micro-organismos têm um papel muito importante na maior parte dos processos biotecnológicos industriais, em campos como na quantidade de uma determinada bebida, síntese farmacêutica, fabrico de comida, tratamento de água e lixo e produção de energia.

Muitos biossensores baseados em micro-organismos imobilizados num transdutor foram desenvolvidos para monitorizar esses processos.



Vantagens da utilização de micro-organismos em biossensores

- 1 – São uma fonte barata comparativamente às enzimas isoladas.
- 2 – São menos sensíveis a inibições de solutos e são mais tolerantes a alterações de pH e temperatura
- 3 – Têm tempos de vida longos.



Desvantagens da utilização de micro-organismos em biossensores

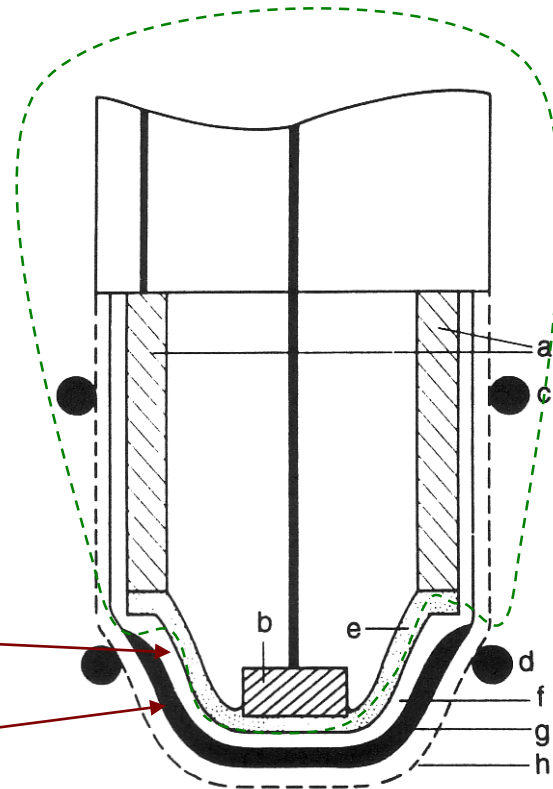
- 1 – Têm por vezes longos tempos de resposta
- 2 – Têm tempos de recuperação longos
- 3 – Tal como os tecidos, também estes contêm muitas enzimas e por isso podem ter uma menor selectividade.



Aplicações dos micro-organismos em biossensores

Um biossensor de glucose utilizando uma bactéria:

- (a) ânodo
- (b) cátodo de platina
- (c) e (d) anéis de borracha
- (e) gel electrólito
- (f) membrana
- (g) micro-organismos retidos na rede de nylon
- (h) membrana de celofane



Anticorpo

Os anticorpos são provavelmente os agentes biológicos mais versáteis.

Um **anticorpo** pode ser desenvolvido contra praticamente qualquer substância (o **antigénio**) e assim formar um material extremamente selectivo.

Os organismos desenvolvem anticorpos, que normalmente são proteínas, que podem ser ligadas a um antigénio invasor e assim removê-lo.



Anticorpo

Um anticorpo desconhecido pode ser determinado utilizando um antigénio já classificado (enzimas, células sanguíneas vermelhas, sondas fluorescentes, sondas quimiluminescentes).

De facto a classificação pode estar presente tanto no anticorpo como no antigénio.

Nos biossensores, o ênfase reside na classificação com enzimas.



Anticorpo

Os anticorpos são muito utilizados em exames imunológicos.

Ligam-se ainda mais intensamente e especificamente ao antígeno correspondente do que as enzimas aos seus substratos.

Um anticorpo é quase sempre totalmente específico para um antígeno. Porque é que esta característica pode tornar-se uma desvantagem?

Resposta: Normalmente um ensaio (*assay*) é necessário para medir a quantidade total de um analito, enquanto que o anticorpo é selectivo apenas para analitos específicos.



Anticorpos como elementos selectivos nos biossensores

Vantagens:

- 1 – São muito selectivos, de facto eles podem ser selectivos mesmo entre diferentes estirpes do mesmo material
- 2 – São ultra-sensíveis
- 3 – Ligam-se intensamente

Desvantagem:

- 1 – Não existe efeito catalítico



Ácidos Nucleico (DNA e RNA)

Têm um funcionamento parecido com o dos anticorpos

Probes de DNA podem ser utilizadas para detectar doenças genéticas, cancro e infecções virais.

Tal como com um anticorpo, um *assay* de DNA envolve, frequentemente, a adição de DNA classificados (*labelled* DNA) ao sistema.

A classificação pode ser radioactiva, fotométrica, enzimática ou electroactiva o que nos leva a uma larga gama de biossensores.

Com a engenharia genética e de proteínas, é possível uma outra utilização para o DNA no desenvolvimento de biossensores:



Ácidos Nucleicos

1- Melhoramento da produção de enzimas:

Algumas enzimas estão presentes em quantidades tão pequenas que são difíceis de isolar.

Um exemplo é a *glucose dehydrogenase* (GDH), utilizada nos biossensores de glucose, a qual não necessita de oxigénio (ao contrário da glucose oxidase).

Uma fonte de GDH é a bactéria *acinetobacter calcoaceticus*, contudo, está presente apenas em quantidades muito pequenas.

Estes níveis podem ser aumentados significativamente utilizando técnicas de clonagem, as quais duplicam os genes codificados GDH, e consequentemente as enzimas.



Ácidos Nucleicos

2- Melhoramento das propriedades das enzimas:

Alterações nas enzimas podem ser realizadas, quer directamente através da engenharia de proteínas ou modificando o gene replicador utilizando engenharia genética.

As modificações podem:

- a) melhorar a quantidade de enzimas
- b) alterar a dependência do pH
- c) alterar a resposta linear à concentração do substrato
- d) melhorar a estabilidade durante a operação
- e) reduzir a sensibilidade a substâncias que podem interferir
- f) alargar ou reduzir a especificidade do substrato



Ácidos Nucleicos

Grande importância dos ácidos nucleicos como agentes biosselektivos

Deve-se

À rápida expansão do conhecimento da estrutura e do papel dos genes nos sistemas biológicos e aos avanços da tecnologia de como os manipular

Faz com que

Exista actualmente um continuado aumento do número de aplicações para os ácidos nucleicos em biossensores



Receptores

São proteínas ou glicoproteínas

Um receptor é uma estrutura numa célula, que pode disparar uma resposta fisiológica amplificada quando é ligada a um determinado ligante.

Este receptor biológico tem tendência a ter afinidade para uma gama de compostos relacionados estruturalmente em vez de um analito específico, o que é frequentemente atractivo nos biossensores.

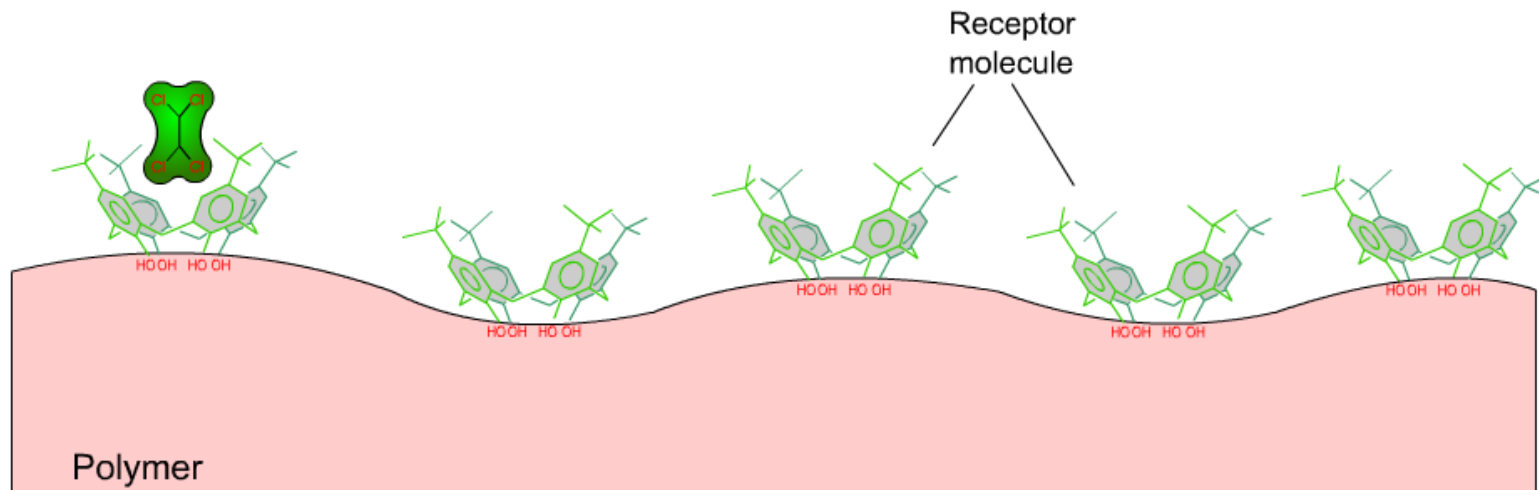


Receptores

Selective molecular receptors

[Related topics](#)

Polymers and so-called supramolecular compounds have an increasing role in selective chemical sensing. They may offer extreme selectivity properties and high flexibility. Two different model systems can demonstrate the basis of selective detection. Polymers, like polysiloxanes, utilize the selective bulk absorption of molecules which corresponds to their permselective properties due to specific built-in organic side-chains. Supramolecular compounds, like calixarenes that are bound generally to polymeric surfaces, utilize the incorporation of molecules in cages built up of cyclic organic molecules.



Receptores

Como é que os receptores diferem dos anticorpos no seu modo de acção?

Um anticorpo liga-se rigorosamente com o seu antigénio complementar. De facto, um antigénio pode ser induzido a criar o anticorpo correspondente.

Receptores são como mensageiros que transmitem sinais entre diferentes partes de um sistema biológico. Pode ser um sinal químico e neste caso o receptor pode responder a uma determinada substância química (ou um grupo de químicos).

