



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA - UFU



LAÍS RABELO VIEIRA

**BIOSENSORES ENZIMÁTICOS E SUAS POSSÍVEIS APLICAÇÕES NA
INDÚSTRIA ALIMENTÍCIA**

UBERLÂNDIA- MG

2020

LAÍS RABELO VIEIRA

BIOSSENSORES ENZIMÁTICOS E SUAS POSSÍVEIS APLICAÇÕES NA INDÚSTRIA
ALIMENTÍCIA

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Graduação em Engenharia Química, da Universidade Federal de Uberlândia, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Bacharel em Engenharia Química.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Larissa Nayhara Soares Santana Falleiros

UBERLÂNDIA

2020

BIOSSENSORES ENZIMÁTICOS E SUAS POSSÍVEIS APLICAÇÕES NA INDÚSTRIA
ALIMENTÍCIA

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao
Curso de Graduação em Engenharia Química, da
Universidade Federal de Uberlândia, como parte
dos requisitos necessários à obtenção do título de
Bacharel em Engenharia Química.

Uberlândia, 11 de dezembro de 2020.

BANCA EXAMINADORA

Prof.^a Dr.^a Larissa Nayhara Soares Santana Falleiros
(Orientadora)

Prof. Dr. Danylo de Oliveira Silva
(FEQUI UFU)

M. Sc. Carla Cristina de Sousa
(Doutoranda PPGEG/UFU)

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo dom da vida e pelo privilégio das experiências até aqui obtidas.

À professora Larissa Nayhara Soares Santana Falleiros, por me acolher como orientanda deste Trabalho e também durante dois anos de Iniciação Científica. Agradeço pela paciência, pelo apoio, pelas leituras atentas e por tanto conhecimento partilhado.

À Carla Sousa, doutoranda em Engenharia Química, pela parceria e pelas ricas contribuições para meu crescimento acadêmico.

Aos meus pais, Barbara Rabelo e Flávio Vieira, por sempre acreditarem em mim e serem fonte de amor e carinho na minha vida. E, especialmente, à minha mãe, por estar sempre me apoiando e me ajudando.

Ao meu irmão, pelo companheirismo.

Às minhas avós, Benedita de Oliveira e Terezinha Ávila, por serem tão presentes e exemplos de força e amor para mim.

A Thomaz Marra Aquino, pelo apoio e presença na minha caminhada pessoal e estudantil.

A todos os professores, com os quais tive a honra de conviver, pela acolhida e ensinamentos.

Aos meus colegas e amigos, pelos momentos de estudo, de diálogo e também de descontração.

Enfim, a todos os que, direta ou indiretamente, contribuíram para a efetivação deste trabalho, muito obrigada.

RESUMO

Biossensores são ferramentas analíticas que empregam um elemento biológico, podendo ser uma célula, uma enzima ou um microrganismo, por exemplo. Biossensores enzimáticos empregam uma enzima como elemento biológico e apresentam alta sensibilidade e seletividade. Essas ferramentas podem ser empregadas em diferentes áreas e seu uso na área alimentícia se torna vantajoso devido ao fornecimento de informações de forma rápida e precisa, além de diminuir a possibilidade de contaminação devido à menor necessidade de tratamento da amostra. Porém, o desenvolvimento de biossensores enzimáticos passa por dificuldades relacionadas à manutenção da estabilidade da enzima. Assim, esse Trabalho de Conclusão de Curso visa à realização de uma revisão bibliográfica sobre biossensores enzimáticos que podem ter aplicação na indústria alimentícia, analisando as técnicas utilizadas para que essas adversidades sejam superadas. Para isso, foram estudados diferentes trabalhos que abordam o desenvolvimento de biossensores enzimáticos e estes foram comparados, analisando a enzima utilizada, o método de modificação empregado e os resultados obtidos, como limites de detecção e estabilidade. Dessa forma, concluiu-se que ainda são necessárias mais pesquisas nessa área, com estudos relacionados às técnicas de imobilização e de modificação de eletrodos para que se torne viável a ampla comercialização e utilização de biossensores enzimáticos na área de alimentos.

Palavras-chave: análise de alimentos, eletroquímica, modificação de eletrodo, sensores.

ABSTRACT

Biosensors are analytical tools that make use of a biologic element as cells, enzymes or microorganisms for instance. Enzymatic biosensors employ an enzyme as a biologic element and present high sensitivity and selectiveness characteristics. These tools can be used in different industries and their use in the food industry becomes useful for providing information in a fast and accurate way besides decreasing the possibility of contamination since requires less sample treatment. However the development of the enzymatic biosensors face challenges related to the maintenance of the enzyme stability. Therefore this Final Course Assignment aims to perform a bibliographic review about enzymatic biosensors that can be used in the food industry, analyzing the techniques used so that these adversities can be overcome. For this purpose, different enzymatic biosensors development assignments have been compared in the sense of analyzing the enzyme, the modification methods used and their results, as detection limits and stability. This brought to a conclusion that further research is needed in this area focusing on studies about immobilization and electrode modification techniques so it becomes possible for enzymatic biosensors to be commercialized and used in the food industry.

Keywords: food analysis, electrochemistry, electrode modification, sensors.

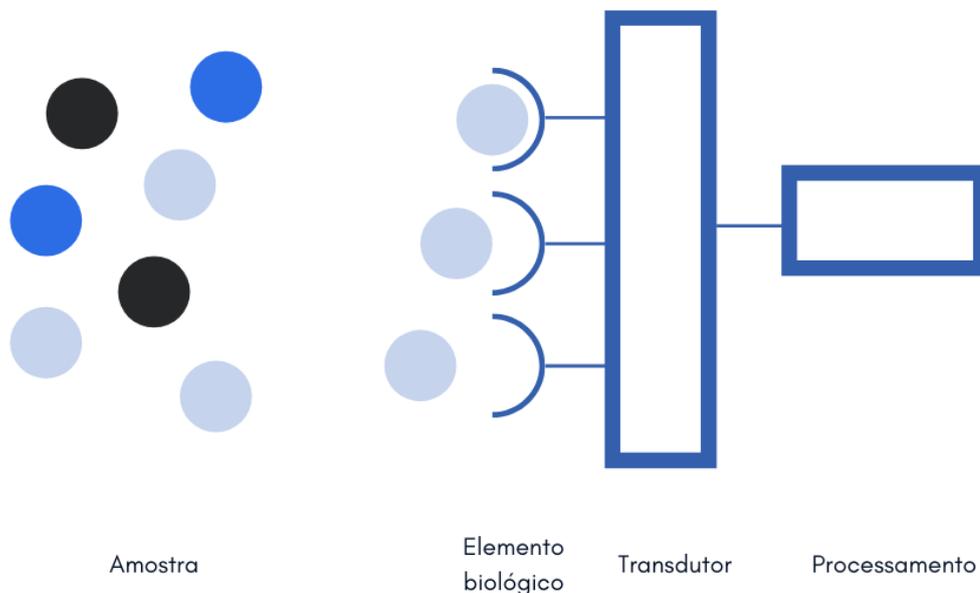
SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	7
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	9
2.1	SENSORES	9
2.2	BIOSSENSORES	9
2.2.1	Biossensores ópticos	11
2.2.2	Biossensores calorimétricos	12
2.2.3	Biossensores piezoelétricos	12
2.2.4	Biossensores eletroquímicos	13
2.2.5	Imunossensores	14
2.2.6	Genossensores	14
2.2.7	Biossensores celulares	15
2.2.8	Biossensores enzimáticos	15
2.3	ENZIMAS	16
2.4	IMOBILIZAÇÃO EM BIOSSENSORES ENZIMÁTICOS	17
3	APLICAÇÕES DE BIOSSENSORES ENZIMÁTICOS EM ALIMENTOS	18
3.1.1	Biossensor enzimático para detecção de glicose e lactose	18
3.1.2	Biossensor enzimático para detecção de antioxidantes	21
3.1.3	Biossensor enzimático para detecção de quantidade de álcool	24
3.1.4	Biossensor enzimático para detecção de tiramina	27
3.1.5	Biossensor enzimático para detecção de íons metálicos	29
4	DISCUSSÃO E PERSPECTIVAS	33
5	CONCLUSÃO	36
	REFERÊNCIAS	37

1 INTRODUÇÃO

Um biossensor é uma ferramenta analítica formada por um elemento biológico, um transdutor e um sistema eletrônico, como mostrado na Figura 1. O elemento biológico pode ser uma enzima, um microrganismo, um anticorpo, células ou ácidos nucleicos, e atua reagindo com o analito de interesse. O transdutor, então, converte a reação em um sinal mensurável, podendo ser óptico, calorimétrico, piezoelétrico ou eletroquímico. O sistema eletrônico processa e exibe os dados obtidos (KARUNAKARAN; RAJKUMAR; BHARGAVA, 2015; LAKSHMIPRIYA; GOPINATH, 2019). Esta monografia tem como foco os biossensores enzimáticos.

Figura 1 - Funcionamento de um biossensor



Fonte: Adaptado de Vaidya e Annapure (2019).

Um biossensor enzimático utiliza uma enzima como elemento biológico, ressaltando que as enzimas são o elemento biológico mais antigo e o mais utilizado no desenvolvimento de biossensores (ZHU *et al.*, 2019). O primeiro biossensor de que se tem registro foi desenvolvido por Clark; Lyons (1962), que descreveram o aprisionamento da enzima glicose oxidase em membranas nos eletrodos para determinação da glicose presente no sangue. Desde então, foram realizadas muitas pesquisas nessa área, e diferentes biossensores enzimáticos para a detecção de diferentes analitos foram desenvolvidos (CHOUTEAU *et al.*, 2005; KOYAMA *et al.*, 1980; SHAHAR *et al.*, 2019a; VARMIRA *et al.*, 2018).

Os biossensores têm aplicação em diferentes áreas como saúde, agricultura, alimentos, entre outros (FURTADO *et al.*, 2008). Na área de alimentos, uma etapa essencial na produção é a garantia da qualidade do produto que chega ao consumidor, já que a ocorrência de contaminação, deterioração ou adulteração afeta diretamente a sua saúde e nutrição. Existem diferentes técnicas de análise para avaliação das características de um produto, que geralmente são caras por necessitarem de mão de obra especializada para preparação e processamento de amostra, além de serem bastante demoradas (DANG *et al.*, 2020; VAIDYA; ANNAPURE, 2019).

Assim, os biossensores se apresentam como ferramentas promissoras na área de análise de alimentos, já que possuem diversas vantagens, como menor preço, alta seletividade e sensibilidade, respostas rápidas, possibilidade de miniaturização, facilidade de operação, e detecção em tempo real e *in situ* (DANG *et al.*, 2020; SEZGINTÜRK, 2020). Além disso, vários aspectos de alimentos como conteúdo de nutrientes (açúcar, ácidos orgânicos, etanol, antioxidantes), adulteração, presença de substâncias tóxicas e deterioração podem ser analisados por biossensores enzimáticos (VAIDYA; ANNAPURE, 2019).

O biossensor mais comercializado atualmente, e também o primeiro a ser comercializado, tem o propósito de detectar a glicose presente no sangue e é amplamente utilizado por diabéticos devido à sua alta exatidão e precisão, além da facilidade de uso (SEZGINTÜRK, 2020). Para que seja possível a ampla comercialização de biossensores, estes devem apresentar algumas características, como: alta estabilidade e seletividade, tempo de resposta rápido e baixos limites de detecção (FURTADO *et al.*, 2008).

No entanto, o desenvolvimento de biossensores enzimáticos apresenta algumas dificuldades na extração, purificação e armazenamento da enzima utilizada, além de dificuldades em manter a estabilidade da enzima durante a imobilização, reação e armazenamento (KAUR *et al.*, 2019; NAVAE; SALIMI, 2019). Essas dificuldades podem estar impedindo sua ampla comercialização.

Nesse contexto, esta monografia apresenta como objetivos gerais: realizar uma revisão bibliográfica sobre biossensores; revisar e discutir artigos recentes que desenvolveram biossensores enzimáticos para aplicação na indústria alimentícia; analisar e discutir as aplicações desses biossensores. E como objetivos específicos: (i) levantar informações sobre biossensores, abordando aspectos como seu funcionamento e classificações; (ii) identificar e correlacionar as técnicas utilizadas para melhorar as características apresentadas pelos biossensores enzimáticos com aplicação na área de alimentos; (iii) analisar e discutir os

empecilhos e possibilidades para que os biossensores enzimáticos venham a se tornar amplamente comercializados e utilizados na área de alimentos.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 SENSORES

Os sensores são aparelhos eletrônicos utilizados para coletar e transmitir dados. Assim, eles recebem uma entrada de dados, que são convertidos geralmente em um sinal elétrico para gerar um valor de saída. Esses dados podem ser propriedades tanto físicas quanto químicas, como temperatura, pH, pressão, posição, vazão, presença de certos elementos químicos, entre outros (LAKSHMIPRIYA; GOPINATH, 2019; MUKHERJEE; PANJA; DEY, 2020; REVATHI; RAJENDRA KUMAR, 2019).

As principais características de um sensor são: a não interferência nos valores de entrada e a sensibilidade apenas às quantidades que serão medidas. Os sensores podem ser divididos em químicos ou físicos, sendo que os sensores químicos utilizam informações químicas fornecidas por uma reação, enquanto os sensores físicos captam medidas físicas como temperatura, pressão, força, absorvância, condutividade, etc (ENSAFI, 2019).

2.2 BIOSSENSORES

Biossensores são aparelhos eletrônicos utilizados em técnicas analíticas, podendo detectar espécies químicas ou biológicas rapidamente, de forma qualitativa ou quantitativa, possuindo um elemento biológico como sensor (FURTADO *et al.*, 2008; TURNER; NEWMAN, 2005). São constituídos por um elemento biológico, um transdutor físico-químico para converter a atividade gerada pelo elemento biológico em um sinal mensurável e um sistema de processamento para converter o sinal em um dado compreensível (BROOKS *et al.*, 1991; COOPER; HALL, 1988; LAKSHMIPRIYA; GOPINATH, 2019).

Os elementos biológicos atuam reconhecendo e reagindo com o analito de interesse, gerando uma alteração em alguma propriedade físico-química, como variação de massa, transferência de elétrons ou calor, modificação do pH, entre outros. A especificidade da interação entre o biorreceptor e o analito de interesse determina a eficiência do biossensor. Podem ser utilizados como elementos biológicos: enzimas, anticorpos, ácido nucleico, células,

organelas, proteínas, entre outros (ENSAFI, 2019; FURTADO *et al.*, 2008; LOZANO *et al.*, 2019).

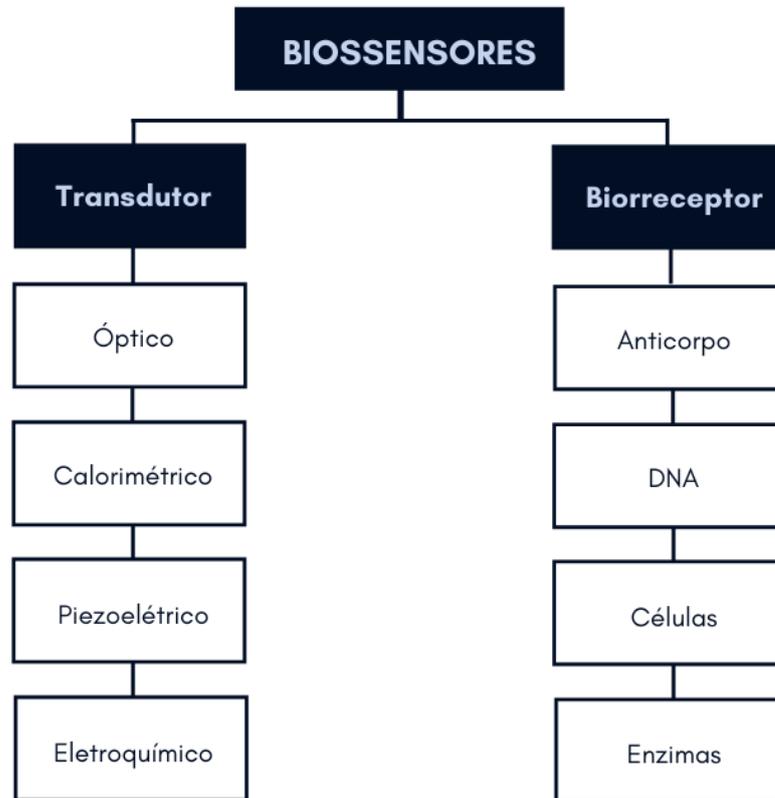
A alteração gerada pela interação entre o elemento biológico e o analito de interesse é detectada e medida pelo transdutor, convertendo as informações em um sinal mensurável, como uma corrente ou voltagem (ENSAFI, 2019; FURTADO *et al.*, 2008; MELLO, 2019). Para que o biossensor seja estável, é preciso realizar a imobilização do elemento biológico na superfície do transdutor, utilizando um método reversível ou irreversível (ENSAFI, 2019). Os sinais mensuráveis podem ser lidos diretamente ou podem passar por processamento (MELLO, 2019).

Os transdutores podem ser eletroquímicos, ópticos, calorimétricos e piezoelétricos (BROOKS *et al.*, 1991; KARUNAKARAN; RAJKUMAR; BHARGAVA, 2015; REVATHI; RAJENDRA KUMAR, 2019), sendo que, na sua maioria, produzem sinais elétricos ou ópticos proporcionalmente à interação entre o analito de interesse e o elemento biológico (ENSAFI, 2019). A escolha do tipo do transdutor a ser utilizado depende de qual material biológico será utilizado e das propriedades da amostra que será analisada (FURTADO *et al.*, 2008).

Quando comparados com outras técnicas de medição, os biossensores apresentam certas vantagens, como: sensibilidade, seletividade, estabilidade, portabilidade, praticidade (por não necessitarem de um pré-tratamento da amostra), rapidez na análise e baixo custo (ENSAFI, 2019; FURTADO *et al.*, 2008).

Dependendo da interação entre o analito de interesse e o elemento biológico, o biossensor pode ser classificado em: sensor de afinidade, sensor metabólico e sensor catalítico. Se o elemento biológico faz uma ligação com o analito, esse sensor é um sensor de afinidade. Se a interação entre o elemento biológico e o analito geram uma mudança química que pode medir a concentração do substrato, o sensor é metabólico. Se o elemento biológico se combina com o analito de forma a não o mudar quimicamente, mas convertendo-o em um substrato auxiliar, é um sensor catalítico. Os biossensores também podem ser classificados em relação ao tipo de transdutor (óptico, calorimétrico, piezoelétrico e eletroquímico) ou ao elemento biológico utilizado (enzima, anticorpo, ácido nucleico e células) (KARUNAKARAN; RAJKUMAR; BHARGAVA, 2015), como mostrado na Figura 2.

Figura 2 – Classificação de biossensores em relação ao transdutor e ao biorreceptor



2.2.1 Biossensores ópticos

Nos biossensores ópticos, a interação física ou química entre o analito e o elemento biológico produz uma mudança na luz de entrada, podendo ser uma mudança na fase, amplitude, polarização ou frequência dessa luz. Seus principais componentes são: uma fonte de luz, o meio para a transmissão óptica, o elemento biológico imobilizado e o sistema de detecção óptica. Esse tipo de biossensor tem aplicações em diversas áreas, como em produtos farmacêuticos e no monitoramento ambiental. Algumas vantagens deste biossensor são: seletividade, especificidade, isolamento de interferência eletromagnética, além da possibilidade de realizar medições em tempo real e a maior desvantagem é o alto custo dos instrumentos (KARUNAKARAN; RAJKUMAR; BHARGAVA, 2015; KHANSILI; RATTU; KRISHNA, 2018).

2.2.2 Biossensores calorimétricos

Esse tipo de biossensor é construído pela combinação de uma enzima imobilizada com um sensor de temperatura (MOHANTY; KOUGIANOS, 2006). Eles são constituídos por uma caixa isolada com um trocador de calor. Quando o substrato entra em contato com esse mecanismo, acontece a formação de produtos e produção de calor, sendo que a diferença de temperatura entre o substrato e o produto é medida pelo termistor (KAUR *et al.*, 2019). Um termistor é um sensor sensível a mudanças na temperatura de um sistema (MALHOTRA; ALI, 2018).

As principais vantagens deste biossensor são: a sensibilidade, a estabilidade e a possibilidade de miniaturização (KARUNAKARAN; RAJKUMAR; BHARGAVA, 2015), além de não precisarem de calibração frequente e serem inativos frente a propriedades ópticas e eletroquímicas da amostra (MOHANTY; KOUGIANOS, 2006). Porém, apresentam altos custos e realizam análises com baixa especificidade, já que efeitos de diluição, solvatação e perdas de calor para o exterior podem afetar a variação de temperatura, gerando erros (MELO, 2008). Podem ser empregados em medidas de glicose e de ureia (KAUR *et al.*, 2019), na indústria alimentícia e para monitoramento ambiental (KARUNAKARAN; RAJKUMAR; BHARGAVA, 2015), entre outros.

2.2.3 Biossensores piezoelétricos

Os biossensores piezoelétricos utilizam o princípio da piezoelectricidade. Quando um estresse mecânico é aplicado, como pressão, em alguns materiais, surge uma diferença de potencial. O material do transdutor deve ser um piezoelétrico, como quartzo, que é revestido por elementos biológicos, e tem uma frequência natural de vibração. Como a frequência de ressonância pode ser medida com alta precisão, é possível calcular a massa do analito de interesse que foi absorvida na superfície do transdutor (KARUNAKARAN; RAJKUMAR; BHARGAVA, 2015).

Esse tipo de biossensor pode ser aplicado em diferentes áreas, como na detecção de biomarcadores de câncer (SU *et al.*, 2013), na detecção do vírus da hepatite C (SKLÁDAL *et al.*, 2004) e na detecção de resíduos de pesticidas (SHANG *et al.*, 2011).

2.2.4 Biossensores eletroquímicos

De acordo com a International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC), um biossensor eletroquímico é um dispositivo independente e integrado, capaz de fornecer informações específicas usando um elemento biológico, que é retido em contato direto com o transdutor eletroquímico (THÉVENOT *et al.*, 2001). Neste tipo de biossensor, é utilizado um eletrodo como transdutor, que consegue detectar diferentes propriedades elétricas como resistência, corrente, potencial, capacitância e impedância (KARUNAKARAN; RAJKUMAR; BHARGAVA, 2015).

Biossensores eletroquímicos conseguem converter diretamente a interação entre o elemento biológico e o analito em um sinal elétrico, acompanhando as espécies que são produzidas ou consumidas pelo elemento biológico, sendo assim bastante chamativos na análise da composição ou concentração da amostra (KARUNAKARAN; RAJKUMAR; BHARGAVA, 2015; LOZANO *et al.*, 2019). Possuem como características: o baixo custo, facilidade de aplicação e portabilidade; e sua eficiência e aplicabilidade dependem de fatores como sensibilidade, seletividade, reprodutibilidade, tempo de resposta e precisão (ENSAFI, 2019). Há pesquisas relatando a aplicabilidade de biossensores eletroquímicos em diferentes áreas, como na avaliação de qualidade da água (YANG *et al.*, 2020), na produção de biossensores vestíveis (possuem alta flexibilidade, o que possibilita seu contato direto com a pele) para avaliação do suor humano (ZHANG *et al.*, 2020b) e na determinação de triglicerídeos totais em amostras de soro humano (DI TOCCO *et al.*, 2018).

Os biossensores eletroquímicos são classificados em: amperométricos, potenciométrico ou condutimétricos (LAKSHMIPRIYA; GOPINATH, 2019). Os amperométricos realizam medidas de correntes que resultam de reações de oxidação ou redução quando um potencial é aplicado no eletrodo, forçando a espécie eletroativa a ganhar ou perder elétrons. A corrente obtida é proporcional à concentração do analito (KARUNAKARAN; RAJKUMAR; BHARGAVA, 2015).

Biossensores potenciométricos geralmente utilizam um eletrodo de referência, que é inerte, e um eletrodo operante (MELO, 2008), que, ao receberem uma voltagem aplicada, produzem um fluxo de corrente devido a reações eletroquímicas (MOHANTY; KOUGIANOS, 2006). A partir dessa reação eletroquímica, é possível obter informações sobre a atividade de íons, medindo o acúmulo de carga potencial no eletrodo operante e comparando com o eletrodo de referência, sendo que o potencial medido é atribuído ao número de espécies eletroativas presentes na amostra (REZAEI; IRANNEJAD, 2019). Apresenta como vantagem a

possibilidade de realizar medidas em amostras com concentrações baixas e em pouco volume, (REZAEI; IRANNEJAD, 2019), além de serem rápidos e terem baixo custo (MELO, 2008).

Os biossensores condutimétricos medem a condutividade elétrica da solução durante a reação entre o analito e o elemento biológico. A condutividade depende da quantidade de íons ou elétrons produzidos pela reação, podendo ser avaliada pela mobilidade de íons e pode ser afetada pelo pH, conforme a concentração de íons varia (KAUR *et al.*, 2019). Ademais, apresentam algumas desvantagens como: a alta sensibilidade a variações de temperatura e a necessidade de diluição prévia da amostra (MELO, 2008).

2.2.5 Imunossensores

Os imunossensores são biossensores que utilizam a reação entre um anticorpo, que vai atuar como o elemento biológico, e um antígeno específico, formando um complexo estável. Apresentam alta especificidade e alta seletividade, além de possibilitarem o acompanhamento da reação em tempo real e conseguirem detectar o analito, mesmo na presença de substâncias interferentes (FELIX; ANGNES, 2018; KARUNAKARAN; RAJKUMAR; BHARGAVA, 2015). Porém, são sensíveis à temperatura e pH (LU; SUN; SUN, 2020). Há estudos que indicam seu uso de forma satisfatória na detecção do marcador da depressão (SUN *et al.*, 2020), no diagnóstico precoce de sepse neonatal (MOLINERO-FERNÁNDEZ *et al.*, 2020) e na detecção do antígeno marcador de câncer de ovário (PAKCHIN *et al.*, 2020), por exemplo.

2.2.6 Genossensores

Neste biossensor, o elemento biológico utilizado é uma fita simples de DNA, que fica imobilizada na superfície do transdutor. Essa sequência simples se liga a uma sequência alvo presente na amostra, formando um DNA de fita dupla (FARIA, 2017; KARUNAKARAN; RAJKUMAR; BHARGAVA, 2015). Pode ser utilizado na detecção de fragmentos de espécies químicas e biológicas e de sequências RNA e DNA de humanos, animais, bactérias e vírus, o que possibilita seu uso na detecção de problemas genéticos, no diagnóstico de doenças, na contaminação de água e alimentos, entre outros (FARIA, 2017; KARUNAKARAN; RAJKUMAR; BHARGAVA, 2015; TOMBELLI, 2012). Pesquisas estudam seu uso na detecção do vírus H1N1 (gripe suína) (RAVINA *et al.*, 2020), na contagem de bactérias totais presentes em uma amostra (JIANG *et al.*, 2019) e no diagnóstico de Zika (ALZATE *et al.*, 2020).

2.2.7 Biossensores celulares

Os biossensores celulares têm células como elemento biológico (LU; SUN; SUN, 2020), sendo que o analito pode ser um substrato ou um inibidor (KAUR *et al.*, 2019). Ao utilizar células, enzimas e outras moléculas ficam no seu ambiente natural e, por isso, apresentam ótima atividade e especificidade em relação ao analito alvo (GUPTA *et al.*, 2019). Além disso, esses biossensores apresentam como vantagens: baixo custo, não invasivos, respostas rápidas e praticidade em medições a longo prazo. Porém, necessitam de alto controle do ambiente para preservação das células (LU; SUN; SUN, 2020). Há pesquisas para emprego de biossensores celulares em várias áreas, como: na detecção de sabores amargos (TIAN *et al.*, 2020), na detecção da presença de metais pesados em plantas (WANG *et al.*, 2019) e na avaliação da eficácia e cardiotoxicidade de medicamentos para câncer (WEI *et al.*, 2019).

2.2.8 Biossensores enzimáticos

Os biossensores enzimáticos utilizam enzimas como elementos biológicos, integrados ou associados ao transdutor (KARUNAKARAN; MADASAMY; SETHY, 2015), sendo este o tipo de biossensor mais comum (PACHECO *et al.*, 2017). As enzimas são relevantes na fabricação de biossensores devido à sua especificidade em relação a moléculas específicas, o que faz com que o biossensor apresente alta seletividade (NAVAEE; SALIMI, 2019). Além disso, a atividade catalítica das enzimas consegue fornecer limites de detecção bem baixos (KARUNAKARAN; RAJKUMAR; BHARGAVA, 2015).

A enzima precisa ser imobilizada no eletrodo, sendo que o método de imobilização pode afetar a sensibilidade, seletividade, estabilidade e reprodutibilidade do biossensor (ZHU *et al.*, 2019). Após a imobilização, deve ser garantido que a enzima esteja fortemente ligada à superfície do transdutor, evitando possível dessorção durante o uso do biossensor; e que a estrutura e atividade da enzima permaneçam intactas (PACHECO *et al.*, 2017). Além disso, as enzimas necessitam de um ambiente específico para manter sua atividade (REVATHI; RAJENDRA KUMAR, 2019) e seu desempenho no biossensor é afetado pelo pH, pela temperatura e pelo tipo de carga enzimática (NAVAEE; SALIMI, 2019).

Há pesquisas desenvolvendo biossensores enzimáticos para serem empregados em diferentes áreas, como na detecção de poluentes (hidrocarbonetos halogenados), em amostras de água (SHAHAR *et al.*, 2019b), na determinação de eugenol em amostras dentárias (LOPEZ

et al., 2020) e na análise de metabissulfito de sódio em amostras de camarões (JUBETE *et al.*, 2017).

2.3 ENZIMAS

Enzimas são proteínas que atuam como catalisadores de reações (LARTIGUE, 1975; LIU, 2020; MESSING, 1975; PALMER; BONNER, 2011a; SUMNER; SOMERS, 1953). Algumas enzimas precisam de um grupo não proteico para apresentarem atividade, os cofatores. Os cofatores podem ser íons-metálicos, moléculas orgânicas e vitaminas (VANDENBERGHE *et al.*, 2020).

As enzimas aumentam a velocidade de reações que ocorrem em células vivas sem sofrerem alterações (PALMER; BONNER, 2011a). Por não serem alteradas nem consumidas durante a reação, as enzimas podem ser recicladas e reutilizadas várias vezes. As funções que as enzimas apresentam dependem de diferentes características, como: estrutura tridimensional, estabilidade e interação com outras moléculas (VANDENBERGHE *et al.*, 2020).

Os reagentes de reações catalisadas por enzimas são chamados de substratos, sendo que as enzimas são altamente específicas, tanto em relação ao substrato quanto em relação aos produtos formados, conseguindo diferenciar formas estereoquímicas e isômeros (LIU, 2020; PALMER; BONNER, 2011b). As enzimas se ligam ao substrato formando um complexo enzima-substrato, diminuindo a energia de ativação, sem alterar os valores de energia livre e da constante de equilíbrio (LIU, 2020).

As enzimas são classificadas em sete classes, sendo elas: oxidoredutases (catalisam reações de oxidorredução), transferases (catalisam transferências de um grupo de um substrato para outro), hidrolases (catalisam a hidrolisação de diferentes ligações), liases (catalisam a remoção não hidrolítica de grupos), isomerases (catalisam mudanças geométricas ou estruturais de uma molécula), ligases (catalisam a ligação de duas moléculas) e translocases (catalisam o movimento ou separação de íons ou moléculas em membranas) (VANDENBERGHE *et al.*, 2020).

As enzimas são utilizadas na produção de alimentos, bebidas, roupas, produtos de limpeza, produtos farmacêuticos e aparelhos de monitoramento. Porém, mudanças nas condições da reação, como pH e temperatura, afetam sua atividade e estabilidade (PRASAD; ROY, 2018).

2.4 IMOBILIZAÇÃO EM BIOSENSORES ENZIMÁTICOS

Uma etapa importante para a construção de um biossensor enzimático é a imobilização da enzima na superfície do eletrodo (BROOKS *et al.*, 1991; FRITZEN *et al.*, 1996; NAVAE; SALIMI, 2019). O método de imobilização utilizado pode ter influência em algumas características, como: sensibilidade, seletividade, estabilidade e reprodutibilidade (ZHU *et al.*, 2019). Por isso, a imobilização afeta diretamente o funcionamento do biossensor (DA SILVA *et al.*, 2019).

A imobilização consiste em aprisionar a enzima em um suporte sólido, sendo que a movimentação do substrato e do produto não deve ser afetada (BERNATH; VENKATASUBRAMANIAN; VIETH, 1977; PUNDIR, 2015; SIRISHA; JAIN; JAIN, 2016). Geralmente, após passar pela imobilização, a enzima apresenta melhores condições, como: estabilidade de armazenamento e maior resistência a pH e temperatura (LIU; CHEN; SHI, 2018).

Os principais métodos utilizados para realizar a imobilização de enzimas são: adsorção, ligação covalente, aprisionamento e ligação cruzada (NAVAE; SALIMI, 2019). A adsorção é realizada por forças intramoleculares entre a enzima e o material condutivo, como van der Waals, ligação iônica, e ligação de hidrogênio (NAVAE; SALIMI, 2019). Nos biossensores, após despejar um pouco de solução enzimática na superfície do eletrodo, o solvente é evaporado. Esse método não é muito utilizado porque podem ocorrer perdas da enzima durante a realização de uma análise ou durante o armazenamento, devido às fracas forças de ligações entre a enzima e o transdutor (PACHECO *et al.*, 2017).

No método da ligação covalente, é formada uma ligação covalente forte entre a enzima e o suporte (SNEHA; BEULAH; MURTHY, 2019). Esse método promove fortes ligações entre a enzima e superfície do eletrodo, que deve ser modificado para apresentar as interações desejadas com a enzima (NAVAE; SALIMI, 2019). A ligação covalente aumenta a estabilidade da enzima imobilizada e evita que ocorra dessorção (LIU; CHEN; SHI, 2018). Geralmente, esse método é irreversível e produz eletrodos que não podem ser reutilizados (NAVAE; SALIMI, 2019).

O aprisionamento consiste no confinamento físico e estabilização da enzima em materiais como géis ou membranas na superfície do eletrodo. Esse método mantém as propriedades específicas da enzima na superfície do eletrodo por mais tempo, além de ser mais simples, quando comparado à ligação covalente (NAVAE; SALIMI, 2019).

No método de ligação cruzada, são usados reagentes bifuncionais para que ocorra reticulação da enzima no suporte, sendo que o reagente bifuncional mais utilizado é o glutaraldeído (LIU; CHEN; SHI, 2018). Para evitar reações indesejáveis e gerar espaço entre as moléculas da enzima, geralmente utilizam-se proteínas inertes, como albumina sérica bovina (PACHECO *et al.*, 2017). Esse método tem como vantagens a estabilização e diminuição da dessorção da enzima, porém podem ocorrer problemas na transferência de massa do substrato, além de ser um processo experimental complexo (NAVAEE; SALIMI, 2019).

3 APLICAÇÕES DE BIOSSENSORES ENZIMÁTICOS EM ALIMENTOS

Os biossensores enzimáticos possuem potenciais aplicações em diferentes áreas, como em diagnósticos médicos, no monitoramento do meio ambiente, em indústrias de bioprocessamento, na análise de água e de alimentos e no bioterrorismo (KAUR *et al.*, 2019). As principais dificuldades enfrentadas no desenvolvimento de novas tecnologias que empregam biossensores enzimáticos referem-se à extração, à purificação e ao armazenamento das enzimas (NAVAEE; SALIMI, 2019).

Devido às análises precisas, rápidas e em tempo real, os biossensores enzimáticos têm potenciais aplicações nas indústrias de alimentos e de bebidas, por isso têm sido utilizados na detecção de patógenos e na deterioração causada por esses patógenos em alimentos (KAUR *et al.*, 2019). Como a utilização de biossensores reduz as etapas de manipulação e de preparação de amostras, o risco de contaminação humana também é reduzido, tendo assim seu uso recomendado para análises de alimentos (FURTADO *et al.*, 2008).

3.1.1 Biossensor enzimático para detecção de glicose e lactose

Portaccio; Lepore (2017) desenvolveram um biossensor amperométrico utilizando as enzimas β -galactosidase de *Aspergillus oryzae* e glicose oxidase de *Aspergillus niger* para determinação da concentração de lactose e glicose, respectivamente, presentes em uma amostra aquosa. Foi utilizado um sistema com três eletrodos: um de grafite, um de platina e um de prata (Ag/AgCl). As enzimas foram imobilizadas por ligação covalente na superfície do eletrodo de grafite, sendo que este atuava como o eletrodo de trabalho, o eletrodo de platina como o contra eletrodo, e o eletrodo de prata como o eletrodo de referência.

Como o biossensor desenvolvido por Portaccio; Lepore (2017) era amperométrico, foi aplicada uma diferença de potencial nos eletrodos de +700 mV. A oxidação do substrato pelas

enzimas imobilizadas produzia uma resposta elétrica, que era medida utilizando o software Labview.

Foram realizados diversos testes por Portaccio; Lepore (2017) para determinar os valores ótimos de operação (concentração de glicose oxidase, concentração de β -galactosidase, e pH) medindo a resposta linear e sensibilidade de cada biossensor preparado. Posteriormente, Portaccio; Lepore (2017) utilizaram amostras reais de suco de abacaxi e laranja, leite desnatado e soro de leite, sendo que as concentrações de glicose e lactose obtidas pelo biossensor e pelo teste comercial em cada amostra são apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1 – Resultados obtidos pelo biossensor bienzimático desenvolvido por Portaccio, Lepore, 2017

Produto	Glicose (mM) biossensor	Glicose (mM) teste comercial	Lactose (mM) biossensor	Lactose (mM) teste comercial
Suco de abacaxi	118 ± 19	123 ± 7		
Suco de laranja	106 ± 12	110 ± 8		
Leite desnatado			132 ± 15	130 ± 10
Soro de leite			123 ± 13	125 ± 8

Fonte: PORTACCIO; LEPORE, 2017.

Na Tabela 1 apresentam-se os valores de glicose e lactose determinados pelo biossensor e por um teste comercial. É possível perceber que os valores obtidos pelo biossensor estão muito próximos dos obtidos pelo teste comercial, já que a maior diferença percentual foi de 4,24% para o suco de abacaxi, o que evidencia sua aplicabilidade para a determinação destes sacarídeos. Segundo a ANVISA (2017), 100 mg de lactose para cada 100 gramas ou mililitros de produto é a quantidade considerada como segura para intolerantes à lactose. Segundo Portaccio; Lepore (2017), o limite de detecção da lactose apresentado pelo biossensor foi de 0,001 mM, que é igual a 0,0342 mg de lactose para 100 mL de solução. Assim, esse biossensor apresenta potencial aplicação para análise de produtos sem lactose, a fim de verificar se as quantidades desse dissacarídeo são aceitáveis.

Na Tabela 1, é possível notar que não foram realizadas medições simultâneas de lactose e glicose em um mesmo produto no trabalho de Portaccio; Lepore (2017), talvez pela escolha

dos alimentos que foram testados. Assim, seria interessante a realização de testes avaliando as quantidades de lactose e glicose presentes em um produto simultaneamente, como em iogurtes, o que poderia diminuir tempo e custos ao resumir diferentes testes em apenas um.

É importante destacar o uso de mais de uma enzima em um mesmo biossensor no trabalho desenvolvido por Portaccio; Lepore (2017), o que mostra a grande possibilidade de biossensores que podem ser desenvolvidos para diferentes aplicações em diversas áreas. Já estão sendo desenvolvidos vários trabalhos que utilizam mais de uma enzima em um mesmo biossensor, como Liu *et al.*, (2019), que desenvolveram um biossensor utilizando as enzimas peroxidase de rábano silvestre e glicose oxidase para detecção de glicose, H_2O_2 e íons de metais pesados (Cr III e Cr IV).

Diferentes trabalhos envolvendo biossensores enzimáticos para detecção da quantidade de glicose presente em amostras já foram desenvolvidos (VIEIRA *et al.*, 2021; ZHANG *et al.*, 2020a). Fatoni; Aziz; Anggraeni (2020) desenvolveram um biossensor colorimétrico utilizando a enzima glicose oxidase, imobilizada por ligação cruzada com glutaraldeído em esferas de quitosana. A enzima, ao reagir com glicose, formava peróxido de hidrogênio e gluconato. Após, injetava-se oxissulfato de titânio, que, ao reagir com o peróxido de hidrogênio, formava um produto de cor amarela. Para a detecção da cor, foram testados três métodos: um resistor dependente de luz (LDR), um sensor de cor (TCS230) e uma webcam. Foram plotadas as curvas de calibração (concentração de glicose pela intensidade das cores vermelho, verde e azul), sendo que o que apresentou maior sensibilidade foi o TCS230, e este foi utilizado nas análises posteriores.

O biossensor foi então utilizado para quantificar a glicose presente em amostras de sangue, que obteve resultados que concordavam com os obtidos com testes comerciais (diferença percentual menor que 2%), sendo um método promissor para análises simples, em tempo real e em equipamentos portáteis, que pode ser estudado para ser aplicado em outras áreas.

No entanto, de acordo com Fatoni; Aziz; Anggraeni (2020), o limite de detecção apresentado pelo biossensor foi de 0,14 mM. Já o biossensor bienzimático desenvolvido por Portaccio; Lepore (2017) apresentou um limite de detecção para a glicose de 0,001 mM. Comparando esses dois trabalhos, é possível perceber que o biossensor desenvolvido por Portaccio; Lepore (2017) apresentou um limite de detecção inferior, o que possibilita a identificação e quantificação de quantidades ínfimas de glicose presentes em uma amostra, o que pode ser considerado como uma vantagem.

3.1.2 Biossensor enzimático para detecção de antioxidantes

Os antioxidantes eliminam e impedem a formação de espécies reativas de oxigênio no organismo (HALLIWELL, 1996), sendo considerados, por isso, como agentes preventivos e terapêuticos para diversas doenças associadas ao estresse oxidativo, como diabetes, doenças cardiovasculares e neurodegenerativas (CÖMERT; GÖKMEN, 2020; SEIFRIED; HARRISON; SEIFRIED, 2017). Dessa forma, é crescente o interesse em produtos que contenham antioxidantes.

Becker *et al.* (2019) desenvolveram um biossensor enzimático amperométrico, utilizando a enzima xantina oxidase, que teve aplicabilidade demonstrada para determinação de antioxidantes, expressa pela inibição de H_2O_2 , presentes em frutas da Amazônia. Os eletrodos foram impressos, sendo que o eletrodo de trabalho foi um disco de grafite, o eletrodo auxiliar era uma linha curva, e o eletrodo de pseudo-referência era de Ag/AgCl. O eletrodo de trabalho foi modificado com azul da prússia (hexacianoferrato férrico), o que alterou suas propriedades elétricas.

Becker *et al.* (2019) realizaram a imobilização da enzima no eletrodo de trabalho por fotopolimerização em uma unidade de azida pendente em um fotopolímero solúvel em água (PVA-AWP), sendo que os eletrodos foram expostos à luz neon para polimerização. Os parâmetros (quantidade de enzima por eletrodo, razão de enzima para PVA-AWP, e tempo de polimerização em exposição UV) para a construção do biossensor foram otimizados.

Os eletrodos foram testados por Becker *et al.* (2019) em tampão fosfato em um potencial de -100mV, que corresponde à redução de H_2O_2 . Hipoxantina foi adicionada sucessivamente ao tampão para aumentar a concentração do substrato, enquanto as correntes iam sendo registradas. Assim, construíram-se curvas de calibração com concentrações crescentes de hipoxantina, na presença ou ausência de antioxidantes.

Na presença da enzima, a hipoxantina é oxidada em ácido úrico e H_2O_2 , que é reduzido na superfície do eletrodo de trabalho. A presença de antioxidantes reduz a concentração de H_2O_2 , causando uma diminuição da intensidade da corrente, sendo possível comparar a inclinação resultante com a inclinação da curva de calibração, obtendo a capacidade antioxidante. Ácido gálico foi utilizado como antioxidante de referência, sendo que foram realizados testes com polpas e refrescos de morango, laranja, maracujá, graviola, bacuri e murici, que foram preparados com tampão.

Segundo Becker *et al.* (2019), o biossensor apresentou tempo de resposta rápido, boa sensibilidade e reprodutibilidade, baixo custo, estabilidade de sinal, fácil automação,

simplicidade de fabricação e operação e ausência de interferências por outros compostos. Além disso, as capacidades antioxidantes mais altas foram apresentadas pelas frutas da Amazônia (graviola, bacuri e murici), de 50 a 60%; enquanto morango, maracujá e laranja apresentaram capacidades antioxidantes de 15 a 40%.

Um ponto que deve ser destacado é a utilização do composto hexacianoferrato férrico, azul da prússia, para modificação dos eletrodos. Esse composto reduz a interferência de outros compostos que possam ser reduzidos por ter um baixo potencial de detecção, sendo assim bastante conhecido por aumentar a seletividade em biossensores (KARYAKIN, 2017), o que condiz com o trabalho de Becker *et al.* (2019). Segundo eles, a utilização do azul da prússia reduziu o valor do potencial de operação, o que garantiu a ausência de interferências.

Vários biossensores estão sendo desenvolvidos utilizando o azul da prússia (ALLERPELLITERO *et al.*, 2019; JIRAKUNAKORN *et al.*, 2020; RADULESCU *et al.*, 2019). Jirakunakorn *et al.* (2020) desenvolveram um biossensor amperométrico modificado com o azul da prússia utilizando a enzima uricase para detecção de ácido úrico em amostras humanas e obtiveram resultados que concordavam com os obtidos por análise enzimática colorimétrica.

Zrinski *et al.* (2020) desenvolveram um biossensor amperométrico para detecção da capacidade antioxidante em bebidas utilizando a enzima lacase. Utilizaram uma célula com três eletrodos, sendo o eletrodo de trabalho um eletrodo de carbono impresso, o eletrodo de referência era de Ag/AgCl e um fio de platina como eletrodo auxiliar. O eletrodo de trabalho foi modificado com nanoplaquetas de grafeno e nanopartículas de ouro. Posteriormente, a enzima foi imobilizada em sua superfície.

Para melhorar o desempenho do biossensor, Zrinski *et al.* (2020) otimizaram os parâmetros de operação: quantidade de nanoplaquetas de grafeno, o pH, taxa de varredura e potencial de operação. Para testar o biossensor, foram preparadas amostras com vinho e xarope de mirtilo, sendo que os resultados foram comparados com os valores obtidos por espectrofotometria. Os resultados obtidos pelo biossensor estavam de acordo com os obtidos pelo método de referência. De acordo com Zrinski *et al.* (2020), a vantagem apresentada pelo biossensor desenvolvido é a detecção de compostos fenólicos e polifenólicos a baixos potenciais de operação, sem interferência de outros compostos.

Mais uma vez foram utilizados eletrodos modificados para obtenção de melhores resultados. Segundo Zrinski *et al.* (2020), a utilização de nanoplaquetas de grafeno aumentou a homogeneidade da superfície do eletrodo, melhorando suas características eletroquímicas. Já a utilização de nanopartículas de ouro resultou em uma diminuição de resistência de transferência de carga.

A combinação de nanoplacas de grafeno e nanopartículas de ouro também foi utilizada por Zou *et al.* (2019) para fabricação de um sensor eletroquímico para detecção de bisfenol A em amostras de água. Segundo Zou *et al.* (2019), o uso de nanoplacas de grafeno e nanopartículas de ouro melhorou a condutividade e facilitou a transferência de elétrons entre a solução e a superfície do eletrodo, o que corrobora os resultados obtidos por Zrinski *et al.* (2020).

Na Tabela 2 apresentam-se dados dos biossensores desenvolvidos por Becker *et al.* (2019) e por Zrinski *et al.* (2020). É possível notar que ambos os trabalhos utilizaram métodos para modificação dos eletrodos, conseguindo, assim, trabalhar em baixos potenciais de operação, o que é vantajoso por evitar que outros compostos presentes na amostra sofram oxidação. Portanto, uma alternativa que deve ser explorada é a utilização de compostos alternativos que possam modificar a estrutura dos elementos de um biossensor, conferindo-lhe características desejáveis. Assim, seria possível viabilizar e popularizar a utilização de biossensores.

Tabela 2 – Comparação dos biossensores enzimáticos desenvolvidos por Becker *et al.* (2019) e Zrinski *et al.* (2020)

	Becker et al. (2019)	Zrinski et al. (2020)
Enzima	Xantina oxidase	Lacase
Substrato	Hipoxantina	Hidroquinona e compostos fenólicos
Modificação do eletrodo	Azul da prússia	Nanoplacas de grafeno e nanopartículas de ouro
Limite de detecção (μM)	2,17	1,5
Limite de quantificação (μM)	7,15	5
Faixa linear (μM)	1,0 – 75	4,0 – 130
Aplicação	Amostras de frutas	Vinho e xarope de blueberry

Adaptado de Becker *et al.* (2019) e Zrinski *et al.* (2020).

Também é possível observar na Tabela 2 que os dois biossensores desenvolvidos por Becker *et al.* (2019) e Zrinski *et al.* (2020) exibiram ampla faixa linear e baixos limites de detecção, apresentando, assim, potenciais aplicações na indústria alimentícia para determinação da quantidade de antioxidantes presentes em sucos e iogurtes, por exemplo. Além disso, podem

ter ampla aplicação em diversas áreas, como na indústria de cosméticos, já que alguns produtos utilizam antioxidantes em sua fórmula para reduzir os sinais de envelhecimento na pele (OTHMAN *et al.*, 2020).

Além disso, antioxidantes são amplamente utilizados em indústrias alimentícias para conservação de alimentos, sendo adicionados em alimentos com ácidos graxos insaturados para aumentar o prazo de validade e evitar que, sob estresse oxidativo, se tornem rançosos. Também podem ser utilizados para ajudar a manter o sabor, a textura e a cor do alimento durante o armazenamento (SINDHI *et al.*, 2013). Sendo assim, os biossensores desenvolvidos por Becker *et al.* (2019) e Zrinski *et al.* (2020) também podem ter aplicações nas indústrias de alimentos para checar a quantidade de antioxidantes, com o propósito de melhorar as características de um produto.

3.1.3 Biossensor enzimático para detecção de quantidade de álcool

Bekmezci *et al.* (2020) desenvolveram um biossensor amperométrico utilizando a enzima álcool oxidase, que foi aplicado na análise de quantidade de álcool presente em bebidas alcoólicas. Foi construído um sistema com 3 eletrodos, sendo que o eletrodo de trabalho foi um eletrodo de grafite que continha a enzima imobilizada, um fio de platina foi utilizado como contraeletrodo e um fio de prata foi utilizado como o pseudoeletrodo de referência. Os eletrodos estavam conectados a um potenciostato.

Bekmezci *et al.* (2020) modificaram o eletrodo de trabalho com nanotubos de carbono de paredes múltiplas. Esses eletrodos modificados passaram, então, por uma etapa de eletropolimerização de polietilenoglicol com funcionalidade fluoreno para que se formassem filmes de polifluoreno-g-poli (etileno glicol) na superfície do eletrodo. Após essas etapas, a enzima foi imobilizada no eletrodo, utilizando glutaraldeído como agente reticulante. Foram realizadas etapas de otimização para determinação dos valores ótimos das seguintes variáveis: quantidade de nanotubos de carbono, número de ciclos do polímero, quantidade de enzima e pH.

Para comparar o desempenho do biossensor modificado com nanotubos de carbono e polifluoreno-g-poli (etileno glicol), prepararam-se outros dois eletrodos: um eletrodo que passou apenas pelas etapas de eletropolimerização e imobilização, sem a modificação com os nanotubos e outro que foi modificado apenas com os nanotubos, sem passar pela etapa de eletropolimerização. Os melhores resultados foram obtidos pelo eletrodo que foi modificado com os nanotubos de carbono e a eletropolimerização. Segundo Bekmezci *et al.* (2020), a

combinação de nanotubos com polímeros conjugados modificou a superfície do eletrodo, o que pode ter levado o biossensor a apresentar alta sensibilidade, estabilidade e tempo de resposta curto.

Os sinais de resposta foram conduzidos a $-0,7$ V, resultando do consumo de oxigênio pela reação de oxidação de álcoois pela enzima álcool oxidase. Segundo Bekmezci *et al.* (2020), o biossensor apresentou boa estabilidade em uso sucessivo, já que se apresentou estável para 10 medidas seguidas em um período de uma hora, além de ter retido 95% das respostas originais após ficar um dia guardado a 4°C . Além disso, o biossensor apresentou maior faixa de medida para o etanol (0,0085 a 5,95 mM) e um limite de detecção de 0,11 mM. De acordo com o trabalho, o biossensor não foi afetado por substâncias interferentes como glicose, uréia, ácido ascórbico, úrico e cítrico.

Bekmezci *et al.* (2020) utilizaram o biossensor para medir a quantidade de álcool presente em bebidas comerciais, sendo que os valores obtidos foram comparados com os valores presentes no rótulo. Os resultados obtidos foram satisfatórios, considerando-se que o erro percentual foi menor que 7%.

O trabalho de Bekmezci *et al.* (2020) apresentou, então, um potencial biossensor com aplicações na área de alimentos, para determinação da quantidade de álcool presente em bebidas alcoólicas comerciais. É possível destacar que esse biossensor pode ter outras aplicações além dessa; por exemplo, na medição de álcool presente em bebidas probióticas fermentadas, como kefir e kombucha.

Ainda analisando o trabalho de Bekmezci *et al.* (2020), é importante frisar a importância do desenvolvimento e do estudo de novas técnicas para aprimorar as características dos eletrodos utilizados em biossensores, que neste caso foi a combinação de nanotubos de carbono com um polímero conjugado, que segundo os autores, melhorou as propriedades da superfície do material, possibilitando que a imobilização da enzima fosse mais efetiva. Isso leva a crer que milhares de combinações de materiais podem ser desenvolvidas, gerando biossensores com propriedades melhoradas.

Poucos trabalhos têm sido reportados na literatura abordando a aplicação de biossensores enzimáticos na detecção de álcool. Porém, Bilgi; Sahin; Ayrançi (2018) desenvolveram um biossensor amperométrico para detecção de etanol. Foi utilizado um sistema com três eletrodos impressos, sendo o eletrodo de trabalho um eletrodo de carbono, um eletrodo de referência de prata e um contraeletrodo de carbono. Os eletrodos foram modificados com ácido rosmarínico. A enzima álcool desidrogenase foi imobilizada no eletrodo de trabalho modificado por ligação cruzada, utilizando glutaraldeído como agente reticulante.

A enzima álcool desidrogenase catalisa a oxidação do etanol na presença de NAD^+ , em acetaldeído, NADH e H^+ (TACIN, 2015). O biossensor desenvolvido por Bilgi; Sahin; Ayranci (2018) determinava o NADH formado através da sua oxidação na superfície do eletrodo de trabalho. Os valores de pH, concentração de NAD^+ , quantidade de enzima para imobilização, e potencial de operação foram otimizados.

Bilgi; Sahin; Ayranci (2018) utilizaram amostras comerciais de cerveja, vinho branco e raki para testar o biossensor desenvolvido, sendo que as amostras foram diluídas em tampão fosfato. Os valores de correntes obtidos foram convertidos em concentração de etanol através da curva de calibração obtida utilizando soluções padrão de etanol. As concentrações de etanol obtidas foram comparadas com os valores indicados nos rótulos, sendo que os percentuais de recuperação foram muito próximos de 100%.

Bilgi; Sahin; Ayranci (2018) também realizaram testes para determinar a estabilidade operacional e a de armazenamento. O biossensor apresentou melhor performance nos dois primeiros dias e, após 30 dias, a resposta amperométrica decaiu em 88,1%. Apesar da atividade ter diminuído bastante, os autores consideraram vantajoso o funcionamento do biossensor após tanto tempo, já que os eletrodos impressos de carbono são feitos para serem descartados após um único uso. Essa estabilidade operacional foi atribuída à utilização de ácido rosmarínico. Em relação à estabilidade de armazenamento, o biossensor foi armazenado por oito semanas, sendo testado uma vez por semana. Após as oito semanas, o biossensor manteve 21,23% da sua sensibilidade original, sendo que essa queda foi atribuída à diminuição da atividade da enzima.

Assim, o biossensor desenvolvido por Bilgi; Sahin; Ayranci (2018) apresenta-se promissor para determinação de álcool em produtos comerciais, já que apresentou um limite de detecção de 0,0071 mM e uma faixa linear de 0,02371 mM a 1 mM. Porém, ao ser comparado com o trabalho de Bekmezci *et al.* (2020), discutido anteriormente, o limite de detecção apresentado pelo biossensor de Bilgi; Sahin; Ayranci (2018) foi muito menor, o que é uma vantagem. Ademais, é preciso levar em consideração que os trabalhos utilizaram enzimas e métodos de modificação diferentes, podendo ter levado a resultados tão distintos.

Assim, como não há uma ampla variedade de trabalhos no desenvolvimento de biossensores para detecção de etanol na literatura, torna-se necessário o aumento de pesquisas nessa área. Seria interessante o estudo de diferentes estratégias para modificação dos eletrodos, visando a uma maior estabilidade perante o armazenamento em longo prazo.

3.1.4 Biossensor enzimático para detecção de tiramina

A tiramina é uma amina biogênica presente em plantas, em células microbianas e animais, podendo ser encontrada em alimentos crus, fermentados, envelhecidos ou estragados. Se presentes em altas quantidades no corpo humano, a tiramina pode ser tóxica, causando dor de cabeça, enxaqueca, náusea, vômito, hipertensão e desordens neurológicas e respiratórias (LI *et al.*, 2017; TOFALO *et al.*, 2016). As aminas biogênicas são comumente encontradas nos alimentos, porém sua concentração aumenta durante o armazenamento e envelhecimento. Sendo assim, a quantidade de aminas biogênicas presentes em um produto pode ser utilizada como indicador de atividade microbiana (PIASTA *et al.*, 2014).

Da Silva *et al.* (2019) utilizaram a enzima tirosinase para desenvolver um biossensor amperométrico para detecção de tirosina em alimentos e bebidas fermentadas. Foi montado um sistema com três eletrodos: um eletrodo de carbono vítreo como eletrodo de trabalho, um fio de platina como contraeletrodo e um eletrodo de Ag/AgCl como eletrodo de referência.

Os eletrodos de carbono vítreo foram modificados com nanopartículas de ouro e com polimerização para formação de um filme de ácido poli-(8-anilino-1-naftaleno-sulfônico). Da Silva *et al.* (2019) também prepararam um eletrodo modificado apenas com nanopartículas de ouro, um eletrodo que passava apenas pela polimerização, e um eletrodo de carbono vítreo que não passou por nenhuma modificação. Os valores de potencial aplicado e quantidade de enzima foram otimizados. A tiramina, na presença de tirosinase, é convertida em dopamina. A dopamina gerada é então convertida em o-dopaquinona na presença de tirosinase. A o-dopaquinona gerada sofre redução na superfície do eletrodo. Como utilizou-se o método amperométrico, a corrente gerada pela reação de redução da o-dopaquinona foi medida (DA SILVA *et al.*, 2019).

O biossensor que apresentou maior sensibilidade foi o que utilizava o eletrodo modificado com nanopartículas de ouro e um polímero, sendo que este foi escolhido para realizar testes nas amostras reais. Segundo Da Silva *et al.* (2019), o biossensor manteve 97,5% do valor inicial apresentado após 20 medidas sucessivas, além de ter mantido 94,3% da resposta original após ter sido armazenado por 20 dias em tampão Britton-Robinson a 4° C.

Ao analisar os dados fornecidos por Da Silva *et al.* (2019), a estabilidade em relação ao armazenamento do biossensor se destaca, já que este conseguiu manter 94,3% do valor inicial após 20 dias. Além disso, sua estabilidade em relação ao funcionamento também foi consideravelmente alta, sendo que o biossensor manteve 97,5% da resposta inicial após 20 usos

consecutivos. Esses resultados são extremamente vantajosos, pois mostram que este biossensor tem alta viabilidade para ser empregado e comercializado.

Para analisar a aplicabilidade do biossensor desenvolvido, Da Silva *et al.* (2019) testaram a concentração de tiramina presente em amostras de vinho, cerveja, iogurte e queijo roquefort. Os valores obtidos estavam de acordo com os valores presentes na literatura (desvio padrão relativo menor que 5%).

Como o biossensor apresentou bons resultados em diferentes tipos de amostras de alimentos, mesmo em um alimento sólido (queijo), pode ser considerado uma ferramenta promissora na análise de alimentos em indústrias.

Alguns trabalhos reportados na literatura descrevem o desenvolvimento de biossensores enzimáticos para a detecção da tiramina. Um deles foi o de Sánchez-Paniagua López; Redondo-Gómez; López-Ruiz (2017), que desenvolveram um biossensor amperométrico enzimático. Foi utilizada a enzima tirosinase e as medições foram realizadas por um potenciostato que estava conectado a um sistema de três eletrodos. O eletrodo de trabalho utilizado foi de carbono vítreo, um contraeletrodo de prata e um eletrodo de referência de Ag/AgCl.

Para efeito de comparação, Sánchez-Paniagua López; Redondo-Gómez; López-Ruiz (2017) produziram eletrodos com diferentes materiais de fosfato de cálcio e um sem nenhum desses materiais. Os materiais de fosfato de cálcio foram misturados com soluções de tirosinase e espalhados na superfície do eletrodo. Posteriormente, os eletrodos foram incubados em glutaraldeído para induzir a imobilização da enzima. O eletrodo que apresentou melhores resultados foi o cimento de fosfato de cálcio, que é geralmente formado por fosfato dicálcico dihidratado, fosfato de octacálcio e hidroxiapatita (SÁNCHEZ-PANIAGUA LÓPEZ *et al.*, 2009) e, por isso, esse composto foi o escolhido para modificação do eletrodo de trabalho.

As variáveis razão de enzima e cimento de fosfato de cálcio, quantidade de mistura de enzima com o cimento espalhado pelo eletrodo, tempo de reação de ligação cruzada com glutaraldeído, potencial utilizado, pH e temperatura foram otimizados por Sánchez-Paniagua López; Redondo-Gómez; López-Ruiz (2017).

O funcionamento do biossensor de Sánchez-Paniagua López; Redondo-Gómez; López-Ruiz (2017) é basicamente o mesmo de Da Silva *et al.* (2019). A tiramina foi detectada pela redução eletroquímica a -0,1 V da o-dopaquinona gerada pela reação catalisada pela enzima tirosinase. O biossensor foi então testado em amostras pré-tratadas de queijo Gouda e Brie e, segundo Sánchez-Paniagua López; Redondo-Gómez; López-Ruiz (2017), os resultados obtidos foram satisfatórios (porcentagens de recuperação de 95,5% a 96,9%).

Como visto anteriormente, a quantidade de tiramina presente em um alimento pode aumentar devido à atividade microbiana no armazenamento. Assim, Sánchez-Paniagua López; Redondo-Gómez; López-Ruiz (2017) mantiveram um pedaço de queijo Brie em temperatura ambiente e, após sete dias, a quantidade de tiramina presente no queijo praticamente dobrou quando comparada com a primeira quantidade obtida.

Além disso, após seis dias de uso, o biossensor manteve 95% do sinal inicial. Logo, Sánchez-Paniagua López; Redondo-Gómez; López-Ruiz (2017) obtiveram um biossensor que pode ter amplas aplicações para detecção da tiramina, por apresentar alta sensibilidade e respostas rápidas, além de conseguir manter sua atividade mesmo após armazenamento (95% do sinal inicial por seis dias, sendo utilizado uma vez por dia e armazenado em tampão fosfato a 4°C e pH 6,0).

Tanto Sánchez-Paniagua López; Redondo-Gómez; López-Ruiz (2017) quanto Da Silva *et al.* (2019) realizaram modificações nos eletrodos visando à obtenção de melhores resultados. Porém, Sánchez-Paniagua López; Redondo-Gómez; López-Ruiz (2017) realizaram uma modificação relativamente mais simples, com menor quantidade e complexidade de materiais e etapas. Entretanto, os dois trabalhos obtiveram ótimos resultados para amostras reais de alimentos na determinação de tiramina, apresentando ferramentas promissoras, que poderiam ser utilizadas tanto por indústrias quanto por consumidores.

Os biossensores poderiam ser utilizados pelos consumidores para checar se um alimento não se encontra estragado, já que um aumento na atividade microbiana também aumenta a concentração de tiramina presente em um alimento. Além disso, pessoas que fazem uso de alguns remédios antidepressivos e ansiolíticos podem ter aumento da pressão e batimentos cardíacos causados pela ingestão de grandes quantidades de tiramina (LI *et al.*, 2017). Sendo assim, esses consumidores poderiam ser beneficiados pelo uso de um biossensor que quantificasse a tiramina em um alimento, podendo evitar esses efeitos.

3.1.5 Biossensor enzimático para detecção de íons metálicos

Os metais geralmente reagem com enzimas, membranas ou componentes de células, inibindo ou estimulando as ações destes, resultando em diferentes efeitos no organismo. A rota primária de exposição a metais, na maioria da população, é pela ingestão de alimentos e água (GILBERT, 2020). Alguns metais são tóxicos ao organismo e, em casos de alta exposição, podem causar intoxicação (NORDBERG; FOWLER; NORDBERG, 2015).

Por exemplo, a ingestão de Cádmio em alimentos e na água pode causar diarreia e vômito e a alta exposição a esse metal pela ingestão de alimentos pode causar problemas como osteoporose em mulheres na menopausa (NORDBERG *et al.*, 2007). A exposição a Chumbo pode causar encefalopatia, coma e convulsões (SKERFVING; BERGDAHL, 2007).

Da Silva; Ghica; Brett (2020) desenvolveram um biossensor eletroquímico com a enzima glicose oxidase para detecção dos íons metálicos Hg^{2+} , Cd^{2+} , Pb^{2+} , e Cr^{VI} , pela inibição da enzima. Foi utilizado um sistema com 3 eletrodos. O eletrodo de trabalho foi um eletrodo de carbono vítreo, o contraeletrodo foi um fio de platina e um eletrodo de Ag/AgCl foi utilizado como eletrodo de referência.

Assim como no trabalho de Bekmezci *et al.* (2020), Da Silva; Ghica; Brett, (2020) utilizaram nanotubos de carbono de paredes múltiplas, sendo que foi produzido um filme com os nanotubos de carbono e quitosana para modificar o eletrodo de carbono vítreo. O eletrodo modificado passou por um processo de eletropolimerização em solvente eutético profundo para formação de um filme de polímero.

Para efeito de comparação, Da Silva; Ghica; Brett (2020) também produziram um eletrodo modificado que foi eletropolimerizado em uma solução aquosa. O eletrodo que foi eletropolimerizado em solvente eutético apresentou melhores resultados e, por isso, foi escolhido para imobilização da enzima. O biossensor, então, teve a enzima imobilizada em sua superfície por ligação cruzada, utilizando glutaraldeído como agente reticulante.

Para avaliação da inibição da atividade enzimática, Da Silva; Ghica; Brett (2020) realizaram medidas amperométricas, em que, após a estabilização da corrente, adicionavam concentrações conhecidas de glicose e mediam o valor da corrente gerada. Posteriormente, adicionavam concentrações conhecidas de íons metálicos e mediam o valor da corrente. Como a atividade enzimática é inibida pela presença de íons metálicos, o valor da corrente diminui, e essa diminuição era proporcional à concentração de inibidor presente na solução. As variáveis quantidade de enzima utilizada e pH da solução foram otimizadas pelos autores para melhor operação do biossensor por inibição.

Da Silva; Ghica; Brett (2020) realizaram testes com diferentes íons que poderiam atuar como interferentes e nenhum deles apresentou resultados significantes. De acordo com Da Silva; Ghica; Brett (2020), o biossensor desenvolvido apresentou boa performance, alta sensibilidade e sensibilidade, além de não necessitar de nenhum tratamento entre as análises para restabelecer a atividade da enzima. Isso, segundo os autores, pode ser atribuído ao uso de solvente eutético na modificação do eletrodo, que melhorou as propriedades eletroanalíticas e a ligação da enzima e do polímero.

Ademais, o biossensor desenvolvido por Da Silva; Ghica; Brett (2020) mostrou-se estável, já que foram realizadas medições diárias de glicose após experimentos de inibição e, após 20 dias, a resposta em relação à glicose caiu apenas 13% do valor inicial. Ainda segundo Da Silva; Ghica; Brett (2020), a perda da atividade enzimática não afeta a utilização do biossensor pelo processo de inibição.

Para testar a aplicação do biossensor, Da Silva; Ghica; Brett (2020) adicionaram concentrações conhecidas dos íons metálicos em amostras de leite. O biossensor foi capaz de detectar as concentrações dos íons com, no mínimo, 99,5% de recuperação aparente média.

Assim, esse biossensor por inibição apresenta potencial aplicação na indústria alimentícia, podendo ser utilizado para análises de diferentes tipos de alimentos. Porém, mais pesquisas podem ser feitas para aprimorar o funcionamento desse biossensor, buscando uma forma para que ele seja capaz de detectar a presença de mais de um íon metálico em uma mesma amostra.

Além disso, é importante destacar a utilização de um mecanismo diferente de detecção do analito, a inibição da enzima. Com essa utilização, é possível perceber as possibilidades que existem no ramo de biossensores, seja nos métodos de detecção ou nas modificações de eletrodos, o que permite o desenvolvimento de aparelhos cada vez mais precisos e eficazes.

Em relação à modificação realizada nos eletrodos, Da Silva; Ghica; Brett (2020) utilizaram um método que já foi citado anteriormente no trabalho de Bekmezci *et al.* (2020), que é a utilização de nanotubos de carbono e eletropolimerização na superfície dos eletrodos. Em ambos os trabalhos, obtiveram biossensores que apresentavam boas propriedades eletroanalíticas, que podem ser resultantes da modificação dos eletrodos.

Outro trabalho que também utilizou inibição de enzima para detecção de metais pesados foi o de Dalkiran (2020), que utilizou a enzima peroxidase de rábano silvestre para detecção dos íons Pb^{2+} , Ni^{2+} e Cd^{2+} em água de torneira.

Dalkiran (2020) utilizou um sistema com três eletrodos: um de Ag/AgCl como eletrodo de referência, um fio de platina como contraeletrodo e um eletrodo de carbono vítreo como eletrodo de trabalho. As medidas amperométricas foram realizadas em um potencial de -0,25V.

Para modificação do eletrodo de trabalho, Dalkiran (2020) utilizou nanopartículas de óxido de estanho e índio (ITO) e tricloreto de hexamina de rutênio (III) (RUT) em uma solução de quitosana. Para comparação, também foram preparados eletrodos apenas com ITO e quitosana e apenas com RUT e quitosana. Na sequência, os eletrodos tiveram a enzima peroxidase imobilizada em sua superfície.

O biossensor que apresentou melhor resposta amperométrica e maior sensibilidade na resposta a peróxido de hidrogênio (substrato da enzima peroxidase) foi o modificado com ITO e RUT em solução de quitosana. As concentrações de ITO e RUT utilizadas foram otimizadas por Dalkiran (2020) por um método matemático e estatístico. Além disso, os valores de concentração de H_2O_2 , concentração de enzima, pH e potencial de operação foram otimizados pelo autor.

Dalkiran (2020) realizou medições amperométricas da resposta do biossensor em relação ao substrato H_2O_2 . Após a obtenção do estado estacionário, realizavam-se medidas do valor da corrente. Posteriormente, alíquotas de concentrações conhecidas da solução padrão do substrato eram adicionadas e a corrente resultante medida. A diferença entre o valor das correntes foi plotada em função da concentração de substrato.

Para medições que utilizavam a inibição da enzima, Dalkiran (2020) adicionava concentrações conhecidas de substrato e realizava medidas da corrente gerada. Posteriormente, adicionavam-se concentrações conhecidas dos íons metálicos, e a corrente era medida. O aumento da concentração de metais leva a uma proporcional diminuição da corrente, devido à inibição enzimática.

Para testar a aplicabilidade do biossensor, Dalkiran (2020) utilizou amostras de água de torneira para medição da presença dos íons metálicos. Porém, foi necessária a adição de íons metálicos, já que após realizar uma análise por espectrometria de absorção atômica, as quantidades dos íons presentes na água eram menores que os limites de detecção apresentados pelo biossensor. Os resultados obtidos pelo biossensor estavam de acordo com os obtidos por espectrometria de absorção atômica, sendo que não houve diferença significativa estaticamente.

Segundo Dalkiran (2020), o biossensor desenvolvido apresentou boa seletividade e estabilidade, sem sofrer interferências de outras espécies. Após duas semanas, houve perda da resposta inicial de 11%, 13% e 19% para Cd^{2+} , Ni^{2+} e Pb^{2+} , respectivamente, que pode ter decorrido da perda de parte da atividade enzimática. Além disso, apresentou tempo de resposta rápido, cerca de 10 segundos, para estabilização da corrente após a adição das soluções com íons metálicos.

Pela análise da Tabela 3, é possível comparar as concentrações molares de cada metal, que são consideradas aceitáveis pela Organização Mundial de Saúde (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2017) presentes em água potável. É possível perceber que os limites de detecção dos biossensores desenvolvidos por Da Silva; Ghica; Brett, (2020) e por Dalkiran (2020) são menores que os valores recomendados pela Organização Mundial de Saúde (OMS) (2017), o que significa que os biossensores são capazes de detectar esses valores de

concentração. Portanto, os biossensores desenvolvidos nos trabalhos supracitados apresentam-se como ferramentas promissoras para detecção de íons metálicos presentes em água, que poderiam ter aplicação em indústrias alimentícias que fazem captação de água de rios como insumo para produção de seus alimentos para averiguar se as concentrações de íons metálicos estão dentre os valores permitidos. Além disso, pode ter potencial aplicação na área ambiental, para monitoramento da “saúde” de rios e lagos.

Tabela 3 – Comparação entre os valores recomendados pela OMS (2017) de concentração de íons metálicos em água potável e os limite de detecção apresentados pelos biossensores desenvolvidos por Da Silva; Ghica; Brett (2020) e Dalkiran (2020)

Metal	Limite recomendado pela OMS (nM)	Limite de detecção (nM) Da Silva; Ghica; Brett (2020)	Limite de detecção (nM) Dalkiran. (2020)
Mercúrio	30	2,30	
Cádmio	26,7	1,75	1
Chumbo	48,3	2,70	8
Cromo	960	2,44	
Níquel	1200		3

Adaptado de Da Silva; Ghica; Brett (2020); Dalkiran, (2020); Guidelines for Drinkin-water Quality: fourth edition incorporating the first addendum, (2017).

4 DISCUSSÃO E PERSPECTIVAS

Segundo Nikoleli *et al.* (2018), as tendências na fabricação de biossensores para o monitoramento de alimentos visam à alta sensibilidade e seletividade, a respostas rápidas em tempo real, com mínima preparação de amostra, à portabilidade do equipamento, além da possibilidade de uso por pessoas que não foram treinadas. Essas características já podem ser observadas nos trabalhos discutidos anteriormente, conforme resumido na Tabela 4.

Analisando a Tabela 4, é possível notar que a maioria dos biossensores discutidos não demanda uma preparação trabalhosa e extensa das amostras a serem analisadas, passando apenas por uma etapa de diluição. Isso torna os biossensores ferramentas vantajosas ao serem comparados a métodos tradicionais de análises, que necessitam de diversas etapas de preparação de amostra. Como consequência, os biossensores podem ser utilizados por uma mão de obra menos específica e qualificada para realizar diferentes análises, o que, em uma indústria, poderia impactar na diminuição de custos. Outra consequência vantajosa ao diminuir etapas de preparação de amostra é a possibilidade de comercialização dos biossensores para o uso de consumidores, para verificar a concentração de algum analito presente em uma amostra.

Tabela 4 - Resumo das características apresentadas pelos biossensores discutidos

Analito	Autores	Enzima	Aplicações	Limite de detecção (mM)	Preparo da amostra	Estabilidade
Glicose	Portaccio e Lepore, 2017	glicose oxidase	suco de abacaxi e laranja	0,001	diluição	2 meses
	Fatoni; Aziz; Anggraeni, 2020	glicose oxidase	amostra de sangue	0,14	diluição em tampão fosfato	não informado
Lactose	Portaccio e Lepore, 2017	beta-galactosidase	leite desnatado e soro de leite	0,001	diluição	2 meses
Antioxidante	Becker et al., 2019	xantina oxidase	morango, laranja, maracujá, graviola, bacuri e murici	0,00217	preparadas com tampão fosfato	6 horas de uso contínuo
	Zrinski et al., 2020	lacase	vinho e xarope de mirtilo	0,0015	sem preparo	sem redução significativa da corrente de resposta após 5 dias
Álcool	Bekmezci et al., 2020	álcool oxidase	rum, raki e vodka	0,11	sem preparo	10 medidas sucessivas em 1h e 95% da resposta original após 1 dia
	Bilgi; Sahin; Ayranci, 2018	álcool desidrogenase	cerveja, vinho branco e raki	0,0071	diluição em tampão fosfato	resposta após 30 dias com redução da resposta inicial
Tiramina	Da Silva et al., 2019	tirosinase	cerveja, vinho tinto, iogurte e queijo	0,00071	iogurte e queijo: adição de tampão, centrifugação e coleta de sobrenadante	2 medidas consecutivas e 94,3% da resposta inicial após 20 dias
	Sánchez-Paniagua López; Redondo-Gómez; López-Ruiz, 2017	tirosinase	queijos gouda e brie	0,0000485	adição de tampão, mistura, centrifugação e coleta de sobrenadante (2x)	95% do sinal inicial após 6 dias
Metais pesados	Da Silva; Gica; Brett, 2020	glicose oxidase	leite	Hg: 0,000023 Cd: 0,0000175 Pb: 0,000027 Cr: 0,0000244	adição de concentrações conhecidas de íons metálicos	20 dias
	Dalkiran, 2020	peroxidase de rábano silvestre	água de torneira	Cd: 0,00001 Pb: 0,00008 Ni: 0,00003	adição de concentrações conhecidas de íons metálicos	2 semanas

Fontes: Becker *et al.*, (2019); Bekmezci *et al.*, (2020); Bilgi; Sahin; Ayranci, (2018); Da Silva *et al.*, (2019); Da Silva; Ghica; Brett, (2020); Dalkiran, (2020); Fatoni; Aziz; Anggraeni, (2020); Portaccio; Lepore, (2017); Sánchez-Paniagua López; Redondo-Gómez; López-Ruiz, (2017); Zrinski *et al.*, (2020).

Também é possível analisar, pela Tabela 4, que os biossensores enzimáticos desenvolvidos foram aplicados em diferentes produtos alimentícios, o que apresenta a possibilidade da sua aplicação em diferentes ramos da indústria. Outro ponto a ser observado é a variedade de enzimas, eletrodos, métodos e materiais para modificação de eletrodos que foram estudados, o que resultou, na grande maioria dos trabalhos, em limites de detecção muito baixos. Baixos limites de detecção são vantajosos por possibilitarem a detecção de quantidades muito pequenas de um analito presente em uma amostra.

Segundo Luong; Male; Glennon, (2008), a baixa comercialização de biossensores, quando comparada à quantidade de trabalhos desenvolvidos nessa área, ocorre devido a problemas em relação à estabilidade, sensibilidade de detecção, e confiabilidade. Ao analisar a estabilidade apresentada pelos biossensores discutidos na Tabela 4, é possível perceber que a maioria dos biossensores ainda apresenta tempos relativamente curtos de estabilidade, o que pode acontecer devido à perda de atividade enzimática com o passar do tempo. Por isso, torna-se necessário o estudo de novas e diferentes técnicas, ou até mesmo a combinação de métodos e materiais que consigam prolongar a estabilidade apresentada por um biossensor enzimático. Porém, em relação à sensibilidade e à confiabilidade, os biossensores discutidos mostraram-se promissores, já que a maioria apresentou baixos limites de detecção, além de resultados muito próximos aos obtidos por outros métodos de análise.

Outro ponto que não foi muito abordado na presente monografia, mas que é uma ferramenta promissora no futuro dos biossensores, é a utilização de nanomateriais. Os trabalhos de Zrinski *et al.* (2020), Bekmezci *et al.* (2020), Da Silva *et al.* (2019), Da Silva; Ghica; Brett (2020) e Dalkiran (2020) utilizaram nanomateriais para realizar modificações nos eletrodos. Os nanomateriais estão sendo amplamente aplicados na fabricação de biossensores por apresentarem características como grandes áreas de superfície, o que pode melhorar a imobilização da enzima. Além disso, seu uso pode melhorar as características apresentadas pelo biossensor, como maior sensibilidade e menor limite de detecção, já que os nanomateriais possuem alta capacidade de transferência de carga, através da modificação dos eletrodos (DANG *et al.*, 2020; MALHOTRA; ALI, 2018).

Além disso, outro ponto que pode representar o futuro dos biossensores enzimáticos é a utilização de nanoenzimas, que são formadas por nanomateriais de metais nobres e de transição e atuam em algumas reações, assim como as enzimas, agindo como catalisadores (STASYUK *et al.*, 2019; WANG; GUNASEKARAN, 2020). As nanoenzimas apresentam algumas vantagens, como: baixo custo, alta estabilidade, facilidade no armazenamento a longo prazo e facilidade para produção em massa, quando comparadas com as enzimas na sua forma natural

(WEI; WANG, 2013). Devido a essas vantagens, as nanoenzimas podem representar o futuro dos biossensores enzimáticos, por possuírem propriedades que facilitariam sua comercialização e armazenamento.

5 CONCLUSÃO

Os biossensores são ferramentas analíticas relativamente novas, mas que estão recebendo grande interesse por apresentarem vantagens quando comparados a métodos tradicionais de análise, como: menor custo, menor preparação de amostras, respostas rápidas, possibilidade de miniaturização e uso por pessoas não treinadas. Os biossensores enzimáticos para análise de alimentos apresentam as mesmas vantagens, e como foi visto e discutido no presente trabalho, essas ferramentas podem ter aplicações em diversos ramos da indústria alimentícia. Porém, seu desenvolvimento enfrenta desafios relacionados à estabilidade apresentada pela enzima e pelo biossensor a longo prazo, o que atua como empecilho para sua ampla comercialização e utilização por indústrias e consumidores. Ao analisar diferentes trabalhos que utilizaram métodos de modificação dos eletrodos foi possível concluir que essa técnica deve ser empregada no desenvolvimento de biossensores, já que sua utilização melhora as características e os resultados apresentados por essas ferramentas. Assim, para que as adversidades citadas anteriormente venham a ser superadas e os biossensores enzimáticos venham a se tornar amplamente utilizados na indústria alimentícia, é necessário que se façam mais pesquisas estudando e utilizando combinações de técnicas ou materiais a serem empregados nas etapas de imobilização da enzima e na modificação dos eletrodos.

REFERÊNCIAS

- ALLER-PELLITERO, M. *et al.* Electrochromic biosensors based on screen-printed Prussian Blue electrodes. **Sensors and Actuators, B: Chemical**, [S. l.], v. 290, p. 591–597, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.snb.2019.03.100>.
- ALZATE, D. *et al.* Genosensors for differential detection of Zika virus. **Talanta**, [S. l.], v. 210, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2019.120648>.
- ANVISA. **Rotulagem de lactose em alimentos tem regra publicada - Notícias**. [s. l.], 2017. Disponível em: <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/noticias-anvisa/2017/rotulagem-de-lactose-em-alimentos-tem-regra-publicada>. Acesso em: 18 set. 2020.
- BECKER, M. M. *et al.* Development of a highly sensitive xanthine oxidase-based biosensor for the determination of antioxidant capacity in Amazonian fruit samples. **Talanta**, [S. l.], v. 204, p. 626–632, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2019.06.002>.
- BEKMEZCI, S. A. *et al.* A new ethanol biosensor based on polyfluorene-g-poly(ethylene glycol) and multiwalled carbon nanotubes. **European Polymer Journal**, [S. l.], v. 122, n. 109300, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2019.109300>.
- BERNATH, F. R.; VENKATASUBRAMANIAN, K.; VIETH, W. R. Immobilized enzymes. *In: Annual Reports on Fermentation Processes*. [S. l.]: Academic Press, Inc., 1977. v. 1p. 235–266. *E-book*. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0968-0004\(80\)80065-X](https://doi.org/10.1016/S0968-0004(80)80065-X).
- BILGI, M.; SAHIN, E. M.; AYRANCI, E. Sensor and biosensor application of a new redox mediator: Rosmarinic acid modified screen-printed carbon electrode for electrochemical determination of NADH and ethanol. **Journal of Electroanalytical Chemistry**, [S. l.], v. 813, p. 67–74, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jelechem.2018.02.012>.
- BROOKS, S. L. *et al.* Biosensors for Process Control. **Enzyme and Microbial Technology**, [S. l.], v. 13, n. 12, p. 946–955, 1991. Disponível em: <https://doi.org/10.1088/0031-8949/1988/T23/054>.
- CHOUTEAU, C. *et al.* A bi-enzymatic whole cell conductometric biosensor for heavy metal ions and pesticides detection in water samples. **Biosensors and Bioelectronics**, [S. l.], v. 21, n. 2, p. 273–281, 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bios.2004.09.032>.
- CLARK, L. C.; LYONS, C. Electrode Systems for Continuous Monitoring in Cardiovascular Surgery. **Annals of the New York Academy of Sciences**, [S. l.], v. 102, n. 1, p. 29–45, 1962. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1962.tb13623.x>.
- CÖMERT, E. D.; GÖKMEN, V. Physiological relevance of food antioxidants. *In: Advances in Food and Nutrition Research*. [S. l.: s. n.]. v. 93p. 205–250. *E-book*. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/bs.afnr.2020.03.002>.
- COOPER, J. C.; HALL, E. A. H. The nature of biosensor technology. **Journal of Biomedical Engineering**, [S. l.], v. 10, n. 3, p. 210–219, 1988. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/0141-5425\(88\)90001-5](https://doi.org/10.1016/0141-5425(88)90001-5).

DA SILVA, W. *et al.* Tyrosinase based amperometric biosensor for determination of tyramine in fermented food and beverages with gold nanoparticle doped poly(8-anilino-1-naphthalene sulphonic acid) modified electrode. **Food Chemistry**, [S. l.], v. 282, n. 2019, p. 18–26, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.12.104>.

DA SILVA, W.; GHICA, M. E.; BRETT, C. M. A. Biotoxic trace metal ion detection by enzymatic inhibition of a glucose biosensor based on a poly(brilliant green)–deep eutectic solvent/carbon nanotube modified electrode. **Talanta**, [S. l.], v. 208, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2019.120427>.

DALKIRAN, B. Amperometric determination of heavy metal using an HRP inhibition biosensor based on ITO nanoparticles-ruthenium (III) hexamine trichloride composite: Central composite design optimization. **Bioelectrochemistry**, [S. l.], v. 135, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2020.107569>.

DANG, Y. T. H. *et al.* Biosensors in Food Traceability and Quality. *In: Reference Module in Food Science*. [S. l.]: Elsevier, 2020. p. 1–14. *E-book*. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/b978-0-08-100596-5.22853-9>.

DI TOCCO, A. *et al.* Development of an electrochemical biosensor for the determination of triglycerides in serum samples based on a lipase/magnetite-chitosan/copper oxide nanoparticles/multiwalled carbon nanotubes/pectin composite. **Talanta**, [S. l.], v. 190, p. 30–37, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2018.07.028>.

ENSAFI, A. A. An introduction to sensors and biosensors. *In: ENSAFI, A. A. (org.). Electrochemical Biosensors*. [S. l.]: Elsevier Inc., 2019. p. 1–10. *E-book*. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816491-4.00001-2>.

FARIA, H. A. M. **Biossensores descartáveis de DNA para detecção dos vírus da zika e da dengue**. 2017. 119p. Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Física Biomolecular - Instituto de Física, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.11606/T.76.2017.tde-05052017-094358>.

FATONI, A.; AZIZ, A. N.; ANGGRAENI, M. D. Low-cost and real-time color detector developments for glucose biosensor. **Sensing and Bio-Sensing Research**, [S. l.], v. 28, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.sbsr.2020.100325>.

FELIX, F. S.; ANGNES, L. Electrochemical immunosensors – A powerful tool for analytical applications. **Biosensors and Bioelectronics**, [S. l.], v. 102, p. 470–478, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bios.2017.11.029>.

FRITZEN, M. *et al.* Immobilized Transport Mutants of Bacterial Cells in Biosensor Arrays. Improved Selectivity for the Simultaneous Determination of Glucose and Lactose. *In: Progress in Biotechnology*. [S. l.], v. 11, p. 821–827, 1996. *E-book*. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0921-0423\(96\)80112-2](https://doi.org/10.1016/S0921-0423(96)80112-2).

FURTADO, R. F. *et al.* Aplicações de Biossensores na Análise da Qualidade de Alimentos. **Embrapa Agroindústria Tropical**, [S. l.], p. 21, 2008. Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/427390/aplicacoes-de-biossensores-na-analise-da-qualidade-de-alimentos>.

GILBERT, S. G. Metal toxicology. *In*: WEXLER, P. (org.). **Information Resources in Toxicology**. 5. ed. [S. l.]: Elsevier, 2020. v. Volume 1:p. 201–202. *E-book*. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813724-6.00019-0>.

GUPTA, N. *et al.* Cell-based biosensors: Recent trends, challenges and future perspectives. **Biosensors and Bioelectronics**, [S. l.], v. 141, n. June, p. 111435, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bios.2019.111435>.

HALLIWELL, B. Antioxidants in Human Health and Disease. **Annual Review of Nutrition**, [S. l.], v. 16, p. 33–50, 1996. Disponível em: <https://doi.org/10.1146/annurev.nutr.16.1.33>.

JIANG, X. *et al.* Amperometric genosensor for culture independent bacterial count. **Sensors and Actuators, B: Chemical**, [S. l.], v. 299, n. May, p. 126944, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.snb.2019.126944>.

JIRAKUNAKORN, R. *et al.* Uric acid enzyme biosensor based on a screen-printed electrode coated with Prussian blue and modified with chitosan-graphene composite cryogel. **Microchemical Journal**, [S. l.], v. 154, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.microc.2020.104624>.

JUBETE, E. *et al.* SO2SAFE - enzymatic SO2 biosensor for rapid food safety monitoring. **Procedia Technology**, [S. l.], v. 27, p. 51–52, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.protcy.2017.04.024>.

KARUNAKARAN, C.; MADASAMY, T.; SETHY, N. K. Enzymatic Biosensors. *In*: KARUNAKARAN, C.; BHARGAVA, K.; BENJAMIN, R. (org.). **Biosensors and Bioelectronics**. [S. l.]: Elsevier Inc., 2015. p. 133–204. *E-book*. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803100-1.00003-7>.

KARUNAKARAN, C.; RAJKUMAR, R.; BHARGAVA, K. Introduction to Biosensors. *In*: KARUNAKARAN, C.; BHARGAVA, K.; BENJAMIN, R. (org.). **Biosensors and Bioelectronics**. [S. l.]: Elsevier Inc., 2015. p. 1–68. *E-book*. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803100-1.00001-3>.

KARYAKIN, A. A. Advances of Prussian blue and its analogues in (bio)sensors. **Current Opinion in Electrochemistry**, [S. l.], v. 5, n. 1, p. 92–98, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.coelec.2017.07.006>.

KAUR, J. *et al.* Enzyme-based biosensors. *In*: PA, Kunal *et al.* (org.). **Bioelectronics and Medical Devices: From Materials to Devices - Fabrication, Applications and Reliability**. [S. l.]: Elsevier Ltd, 2019. p. 211–240. *E-book*. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-102420-1.00013-3>.

KOYAMA, M. *et al.* Improved enzyme sensor for glucose with an ultrafiltration membrane and immobilized glucose oxidase. **Analytica Chimica Acta**, [S. l.], v. 116, n. 2, p. 307–314, 1980. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0003-2670\(01\)95210-9](https://doi.org/10.1016/S0003-2670(01)95210-9).

LAKSHMIPRIYA, T.; GOPINATH, S. C. B. An introduction to biosensors and biomolecules. *In*: GOPINATH, S. C. B.; LAKSHMIPRIYA, T. (org.). **Nanobiosensors for Biomolecular Targeting: A volume in Micro and Nano Technologies**. [S. l.]: Elsevier Inc.,

2019. p. 1–21. *E-book*. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813900-4.00001-4>.

LARTIGUE, D. J. Basic Enzymology. *In*: MESSING, R. A. (org.). **Immobilized Enzymes for Industrial Reactors**. [S. l.]: Academic Press, Inc., 1975. p. 11–38. *E-book*. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-492350-8.50007-4>.

LI, Y. *et al.* Tyramine detection using PEDOT:PSS/AuNPs/1-methyl-4-mercaptopyridine modified screen-printed carbon electrode with molecularly imprinted polymer solid phase extraction. **Biosensors and Bioelectronics**, [S. l.], v. 87, p. 142–149, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bios.2016.08.006>.

LIU, D. M.; CHEN, J.; SHI, Y. P. Advances on methods and easy separated support materials for enzymes immobilization. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, [S. l.], v. 102, p. 332–342, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.trac.2018.03.011>.

LIU, L. *et al.* Poly(noradrenalin) based bi-enzyme biosensor for ultrasensitive multi-analyte determination. **Talanta**, [S. l.], v. 194, p. 343–349, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2018.10.055>.

LIU, S. Enzymes. *In*: LIU, S. (org.). **Bioprocess Engineering Kinetics, Sustainability, and Reactor Design**. 3rd. ed. [S. l.]: Elsevier, 2020. p. 229–290. *E-book*. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-821012-3/00007-5>.

LOPEZ, J. C. *et al.* Development of an enzymatic biosensor to determine eugenol in dental samples. **Talanta**, [S. l.], v. 210, p. 120647, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2019.120647>.

LOZANO, M. G. *et al.* Biosensors for food quality and safety monitoring: Fundamentals and applications. *In*: KUDDUS, M. (org.). **Enzymes in Food Biotechnology: Production, Applications, and Future Prospects**. [S. l.]: Academic Press, 2019. p. 691–709. *E-book*. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813280-7.00040-2>.

LU, X.; SUN, J.; SUN, X. Recent advances in biosensors for the detection of estrogens in the environment and food. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, [S. l.], v. 127, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.trac.2020.115882>.

LUONG, J. H. T.; MALE, K. B.; GLENNON, J. D. Biosensor technology: Technology push versus market pull. **Biotechnology Advances**, [S. l.], v. 26, n. 5, p. 492–500, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2008.05.007>.

MALHOTRA, B. D.; ALI, Md. A. Nanomaterials in Biosensors: Fundamentals and Application. *In*: MALHOTRA, B. D.; ALI, Md. A. (org.). **Nanomaterials for Biosensors: Fundamentals and Applications**. [S. l.]: Elsevier, 2018. p. 1–74. *E-book*. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-44923-6.00001-7>.

MELLO, H. J. N. P. D. **Biossensores do estado sólido e dispositivos transistores de efeito de campo fabricados com semicondutores orgânicos**. 2019. 162 p. Tese (Doutorado) - Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2019. Disponível em: <https://bv.fapesp.br/pt/dissertacoes-teses/167838/biossensores-do-estado-solido-e-dispositivos-transistores-de>.

MELO, A. F. **Desenvolvimento Preliminar de um Biossensor Enzimático para Determinação de Taninos Hidrolisáveis**. 2008. 104p. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, [s. l.], 2008.

MESSING, R. A. Introduction and General History of Immobilized Enzymes. *In*: MESSING, R. A. (org.). **Immobilized Enzymes for Industrial Reactors**. [S. l.]: ACADEMIC PRESS, INC., 1975. p. 1–10. *E-book*. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-492350-8.50006-2>.

MOHANTY, S. P.; KOUZIANOS, E. Biosensors: a tutorial review. **IEEE Potentials**, [S. l.], v. 25, n. 2, p. 35–40, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1109/MP.2006.1649009>.

MOLINERO-FERNÁNDEZ, Á. *et al.* An array-based electrochemical magneto-immunosensor for early neonatal sepsis diagnostic: Fast and accurate determination of C-reactive protein in whole blood and plasma samples. **Microchemical Journal**, [S. l.], v. 157, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.microc.2020.104913>.

MUKHERJEE, A.; PANJA, A. K.; DEY, N.. Introduction to sensors and systems. *In*: MUKHERJEE, A.; PANJA, A. K.; DEY (org.). **A Beginner's Guide to Data Agglomeration and Intelligent Sensing**. [S. l.]: Elsevier, 2020. p. 1–27. *E-book*. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-820341-5.00001-1>.

NAVAEE, A.; SALIMI, A. Enzyme-based electrochemical biosensors. *In*: ENSAFI, A. A. (org.). **Electrochemical Biosensors**. [S. l.]: Elsevier Inc., 2019. p. 167–211. *E-book*. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816491-4.00007-3>.

NIKOLELI, G. P. *et al.* Novel Biosensors for the Rapid Detection of Toxicants in Foods. *In*: TOLDRÁ, F. (org.). **Advances in Food and Nutrition Research**. 1. ed. [S. l.]: Elsevier Inc., 2018. v. 84p. 57–102. *E-book*. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/bs.afnr.2018.01.003>.

NORDBERG, G. F. *et al.* Cadmium. *In*: NORDBERG, G. F. *et al.* (org.). **Handbook on the Toxicology of Metals**. 3rd Editi ed. [S. l.]: Elsevier, 2007. p. 445–486. *E-book*. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/B978-012369413-3/50078-1>

NORDBERG, G. F.; FOWLER, B. A.; NORDBERG, M. Toxicology of Metals: Overview, Definitions, Concepts, and Trends. *In*: NORDBERG, G. F.; FOWLER, B. A.; NORDBERG, M. (org.). **Handbook on the Toxicology of Metals**. Fourth Edi ed. [S. l.]: Elsevier, 2015. v. 1p. 1–12. *E-book*. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-59453-2.00001-9>.

OTHMAN, A. *et al.* Easy-to-use and inexpensive sensors for assessing the quality and traceability of cosmetic antioxidants. **Talanta**, [S. l.], v. 208, n. October 2020, p. 120473, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2019.120473>.

PACHECO, J. G. *et al.* Biosensors. *In*: LARROCHE, Christian *et al.* (org.). **Current Developments in Biotechnology and Bioengineering**. [S. l.]: Elsevier, 2017. p. 627–648. *E-book*. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63663-8.00021-5>.

PAKCHIN, P. S. *et al.* A novel electrochemical immunosensor for ultrasensitive detection of CA125 in ovarian cancer. **Biosensors and Bioelectronics**, [S. l.], v. 153, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bios.2020.112029>.

PALMER, T.; BONNER, P. L. An Introduction to Enzymes. *In*: PALMER, T.; BONNER, P. L. (org.). **Enzymes: Biochemistry, Biotechnology, Clinical Chemistry**. 2nd. ed. [S. l.]: Elsevier, 2011 a. p. 2–13. *E-book*. Disponível em: <https://doi.org/10.1533/9780857099921.1.2>.

PALMER, T.; BONNER, P. L. Specificity of Enzyme Action. *In*: PALMER, T.; BONNER, P. L. (org.). **Enzymes: Biochemistry, Biotechnology, Clinical Chemistry**. 2nd editio ed. [S. l.]: Elsevier, 2011 b. p. 67–75. *E-book*. Disponível em: <https://doi.org/10.1533/9780857099921.1.67>.

PIASTA, A. M. *et al.* New procedure of selected biogenic amines determination in wine samples by HPLC. **Analytica Chimica Acta**, [S. l.], v. 834, p. 58–66, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.aca.2014.05.028>.

PORTACCIO, M.; LEPORE, M. Determination of Different Saccharides Concentration by Means of a Multienzymes Amperometric Biosensor. **Journal of Sensors**, [S. l.], p. 1–8, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1155/2017/7498945>.

PRASAD, S.; ROY, I. Converting Enzymes into Tools of Industrial Importance. **Recent Patents on Biotechnology**, [S. l.], v. 12, n. 1, p. 33–56, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.2174/1872208311666170612113303>.

PUNDIR, C. S. Immobilization of Enzyme Nanoparticles. *In*: PUNDIR, C. S. (org.). **Enzyme Nanoparticles: Preparation, Characterisation, Properties and Applications**. [S. l.]: Elsevier, 2015. p. 23–32. *E-book*. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-38913-6.00004-0>.

RADULESCU, M. C. *et al.* Ester flavorants detection in foods with a bienzymatic biosensor based on a stable Prussian blue-copper electrodeposited on carbon paper electrode. **Talanta**, [S. l.], v. 199, p. 541–546, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2019.02.094>.

RAVINA *et al.* Genosensor for rapid, sensitive, specific point-of-care detection of H1N1 influenza (swine flu). **Process Biochemistry**, [S. l.], v. 98, n. July, p. 262–268, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2020.09.016>.

REVATHI, C.; RAJENDRA KUMAR, R. T. Enzymatic and nonenzymatic electrochemical biosensors. *In*: HYWEL, M.; ROUT, C. S.; LATE, D. J. (org.). **Fundamentals and Sensing Applications of 2D Materials**. [S. l.]: Elsevier Ltd, 2019. p. 259–300. *E-book*. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-102577-2.00007-5>.

REZAEI, B.; IRANNEJAD, N. Electrochemical detection techniques in biosensor applications. *In*: ENSAFI, A. A. (org.). **Electrochemical Biosensors**. [S. l.]: Elsevier Inc., 2019. p. 11–43. *E-book*. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816491-4.00002-4>.

SÁNCHEZ-PANIAGUA LÓPEZ, M. *et al.* Highly sensitive amperometric biosensor based on a biocompatible calcium phosphate cement. **Biosensors and Bioelectronics**, [S. l.], v. 24, n. 8, p. 2574–2579, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bios.2009.01.002>.

SÁNCHEZ-PANIAGUA LÓPEZ, M.; REDONDO-GÓMEZ, E.; LÓPEZ-RUIZ, B. Electrochemical enzyme biosensors based on calcium phosphate materials for tyramine detection in food samples. **Talanta**, [S. l.], v. 175, p. 209–216, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2017.07.033>.

SEIFRIED, R. M.; HARRISON, E.; SEIFRIED, H. E. Antioxidants in health and disease. In: COULSTON, A. M. *et al.* (org.). **Nutrition in the Prevention and Treatment of Disease**. Fourth Edi ed. [S. l.]: Elsevier Inc., 2017. p. 321–346. *E-book*. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802928-2.00016-3>.

SEZGINTÜRK, M. K. Introduction to commercial biosensors. In: SEZGINTÜRK, M. K. (org.). **Commercial Biosensors and Their Applications: Clinical, Food, and Beyond**. [S. l.]: Elsevier, 2020. p. 1–28. *E-book*. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-818592-6.00001-3>.

SHAHAR, H. *et al.* Optical enzymatic biosensor membrane for rapid in situ detection of organohalide in water samples. **Microchemical Journal**, [S. l.], v. 146, p. 41–48, 2019 a. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.microc.2018.12.052>.

SHAHAR, H. *et al.* Detection of halogenated hydrocarbon pollutants using enzymatic reflectance biosensor. **Sensors and Actuators, B: Chemical**, [S. l.], v. 281, p. 80–89, 2019 b. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.snb.2018.10.076>.

SHANG, Z. J. *et al.* A rapid detection of pesticide residue based on piezoelectric biosensor. **Procedia Engineering**, [S. l.], v. 15, p. 4480–4485, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.proeng.2011.08.842>.

SINDHI, V. *et al.* Potential applications of antioxidants – A review. **Journal of Pharmacy Research**, [S. l.], v. 7, n. 9, p. 828–835, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jopr.2013.10.001>.

SIRISHA, V. L.; JAIN, A.; JAIN, A. Enzyme Immobilization: An Overview on Methods, Support Material, and Applications of Immobilized Enzymes. In: TOLDRÁ, F. (org.). **Advances in Food and Nutrition Research**. [S. l.]: Elsevier Inc., 2016. v. 79p. 179–211. *E-book*. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/bs.afnr.2016.07.004>.

SKERFVING, S.; BERGDAHL, I. A. Lead. In: NORDBERG, G. F. *et al.* (org.). **Handbook on the Toxicology of Metals**. 3rd editio ed. [S. l.]: Elsevier, 2007. p. 599–643. *E-book*. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/B978-012369413-3/50086-0>.

SKLÁDAL, P. *et al.* Piezoelectric biosensors for real-time monitoring of hybridization and detection of hepatitis C virus. **Journal of Virological Methods**, [S. l.], v. 117, n. 2, p. 145–151, 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2004.01.005>.

SNEHA, H. P.; BEULAH, K. C.; MURTHY, P. S. Enzyme immobilization methods and applications in the food industry. In: KUDDUS, M. (org.). **Enzymes in Food Biotechnology: Production, Applications, and Future Prospects**. [S. l.]: Elsevier Inc., 2019. p. 645–658. *E-book*. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813280-7.00037-2>.

STASYUK, N. *et al.* Amperometric biosensors based on oxidases and PtRu nanoparticles as

artificial peroxidase. **Food Chemistry**, [S. l.], v. 285, n. August 2019, p. 213–220, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.01.117>.

SU, L. *et al.* Detection of cancer biomarkers by piezoelectric biosensor using PZT ceramic resonator as the transducer. **Biosensors and Bioelectronics**, [S. l.], v. 46, p. 155–161, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bios.2013.01.074>.

SUMNER, J. B.; SOMERS, G. F. General Properties of Enzymes. *In*: SUMNER, J. B.; SOMERS, G. F. (org.). **Chemistry and Methods of Enzymes**. 3rd editio ed. [S. l.]: Elsevier, 1953. p. 1–67. *E-book*. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/B978-1-4832-3150-1.50008-1>.

SUN, B. *et al.* A novel electrochemical immunosensor for the highly sensitive and selective detection of the depression marker human apolipoprotein A4. **Bioelectrochemistry**, [S. l.], v. 135, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2020.107542>.

TACIN, M. V. **Imobilização da enzima álcool desidrogenase em suportes alginato-quitosana e glioxil-agarose**. 2015. 52 p. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2015. Disponível em: <https://repositorio.unesp.br/handle/11449/123821>.

THÉVENOT, D. R. *et al.* Electrochemical biosensors: recommended definitions and classification. **Biosensors and Bioelectronics**, [S. l.], v. 16, p. 121–131, 2001. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0956-5663\(01\)00115-4](https://doi.org/10.1016/S0956-5663(01)00115-4).

TIAN, Y. *et al.* A sperm-cell-based biosensor using a fluorescence probe for responsive signal readout toward bitter flavor detection. **Talanta**, [S. l.], v. 211, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2020.120731>.

TOFALO, R. *et al.* **Biogenic Amines: Toxicology and Health Effect**. 1. ed. [S. l.]: Elsevier Ltd., 2016. *E-book*. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384947-2.00071-4>.

TOMBELLI, S. Piezoelectric biosensors for medical applications. *In*: HIGSON, S. (org.). **Biosensors for Medical Applications**. [S. l.]: Elsevier Masson SAS., 2012. p. 41–64. *E-book*. Disponível em: <https://doi.org/10.1533/9780857097187.1.41>.

TURNER, A. P. F.; NEWMAN, J. D. An Introduction to Biosensors. *In*: SCOTT, A. O. (org.). **Biosensors for Food Analysis**. [S. l.]: Woodhead Publishing Limited, 2005. p. 13–27. *E-book*. Disponível em: <https://doi.org/10.1533/9781845698157.1.13>.

VAIDYA, A. M.; ANNAPURE, U. S. Enzymes in biosensors for food quality assessment. *In*: KUDDUS, M. (org.). **Enzymes in Food Biotechnology: Production, Applications, and Future Prospects**. [S. l.]: Elsevier Inc., 2019. p. 659–674. *E-book*. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813280-7.00038-4>.

VANDENBERGHE, L. P. S. *et al.* Classification of enzymes and catalytic properties. *In*: SINGH, S. P. *et al.* (org.). **Biomass, Biofuels, Biochemicals: Advances in Enzyme Catalysis and Technologies**. [S. l.]: Elsevier, 2020. p. 11–30. *E-book*. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-819820-9.00002-8>.

VARMIRA, K. *et al.* Fabrication of a novel enzymatic electrochemical biosensor for

determination of tyrosine in some food samples. **Talanta**, [S. l.], v. 183, p. 1–10, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2018.02.053>.

VIEIRA, N. S. *et al.* Development of amperometric biosensors using VO₂/GOx films for detection of glucose. **Materials Science in Semiconductor Processing**, [S. l.], v. 121, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.mssp.2020.105337>.

WANG, W.; GUNASEKARAN, S. Nanozymes-based biosensors for food quality and safety. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, [S. l.], v. 126, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.trac.2020.115841>.

WANG, X. *et al.* A living plant cell-based biosensor for real-time monitoring invisible damage of plant cells under heavy metal stress. **Science of the Total Environment**, [S. l.], v. 697, p. 134097, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.134097>.

WEI, H.; WANG, E. Nanomaterials with enzyme-like characteristics (nanozymes): next-generation artificial enzymes. **Chemical Society Reviews**, [S. l.], n. 14, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1039/c3cs35486e>.

WEI, X. *et al.* Efficacy and cardiotoxicity integrated assessment of anticancer drugs by a dual functional cell-based biosensor. **Sensors and Actuators, B: Chemical**, [S. l.], v. 283, p. 881–889, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.snb.2018.12.085>.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Guidelines for drinking-water quality: fourth edition incorporating first addendum**, [S. l.], 2017. *E-book*. Disponível em: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/254637>.

YANG, Y. *et al.* A portable instrument for monitoring acute water toxicity based on mediated electrochemical biosensor: Design, testing and evaluation. **Chemosphere**, [S. l.], v. 255, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.126964>.

ZHANG, B. L. *et al.* A gold nanoparticles deposited polymer microneedle enzymatic biosensor for glucose sensing. **Electrochimica Acta**, [S. l.], v. 358, 2020 a. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.electacta.2020.136917>.

ZHANG, Q. *et al.* Wearable electrochemical biosensor based on molecularly imprinted Ag nanowires for noninvasive monitoring lactate in human sweat. **Sensors and Actuators, B: Chemical**, [S. l.], v. 320, 2020 b. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.snb.2020.128325>.

ZHU, Y. C. *et al.* Enzyme-based biosensors and their applications. In: SINGH, Ram Sarup *et al.* (org.). **Advances in Enzyme Technology: Biomass, Biofuels, Biochemicals**. [S. l.]: Elsevier B.V., 2019. p. 201–223. *E-book*. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-64114-4.00008-X>.

ZOU, J. *et al.* Highly sensitive detection of bisphenol A in real water samples based on in-situ assembled graphene nanoplatelets and gold nanoparticles composite. **Microchemical Journal**, [S. l.], v. 145, p. 693–702, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.microc.2018.11.040>.

ZRINSKI, I. *et al.* Evaluation of phenolic antioxidant capacity in beverages based on laccase

immobilized on screen-printed carbon electrode modified with graphene nanoplatelets and gold nanoparticles. **Microchemical Journal**, [S. l.], v. 152, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.microc.2019.104282>.