

BIOSENSORES PARA O MONITORAMENTO DA EXPOSIÇÃO A POLUENTES AMBIENTAIS

Biosensors to monitor the exposition to environmental pollutants

Paulo Rubens Guimarães Barrocas¹, Ana Cláudia Santiago de Vasconcellos², Sheila da Silva Duque³, Lísia Maria Gobbo dos Santos⁴, Silvana do Couto Jacob⁵, Ana Luzia Lauria-Filgueiras⁶, Josino Costa Moreira⁷

RESUMO

Este artigo apresenta uma síntese crítica da literatura sobre a tecnologia dos biossensores. Os princípios nos quais se baseia esta nova abordagem analítica, suas principais características que a diferenciam dos outros métodos tradicionais (químicos e bioensaios), as múltiplas configurações e tipos que têm sido desenvolvidos por pesquisadores das mais variadas áreas da ciência e uma definição adequada para esta nova classe de sistemas analíticos são examinados. Por fim, as diversas aplicações dos biossensores, com ênfase para o monitoramento de poluentes ambientais perigosos para a saúde humana (ex: pesticidas, metais, fenol, nitrito, disruptores endócrinos, etc.) e as perspectivas futuras nesta área são discutidas.

PALAVRAS-CHAVE

Biossensor, poluente, exposição, monitoramento ambiental

ABSTRACT

This article presents a critical review of the literature about the biosensor technology. The principles of this new analytical approach, its main unique characteristics and the multiple configurations or types developed, as well as a suitable definition for this class of analytical systems are evaluated. The various applications of the biosensors in several areas, specially for the monitoring of environmental pollutants (e.g. pesticides, metals, phenol, nitrite, endocrine disruptors, etc.) hazardous to human health, and the future perspectives in this field are discussed.

KEY WORDS

Biosensor, pollutant, exposure, environmental monitoring

¹ Pesquisador do Departamento de Saneamento e Saúde Ambiental da Escola Nacional de Saúde Pública. Fundação Oswaldo Cruz. End: Escola Nacional de Saúde Pública Sérgio Arouca. Departamento de Saneamento e Saúde Ambiental - Rua Leopoldo Bulhões, 1480 / sala 521 CEP: 21041-210.

² Mestranda do Curso de Saúde Pública da Escola Nacional de Saúde Pública. Fundação Oswaldo Cruz.

³ Tecnologista do Laboratório de Zoonoses Bacterianas. Instituto Oswaldo Cruz. Fundação Oswaldo Cruz.

⁴ Doutoranda do Curso de Vigilância Sanitária do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde. Fundação Oswaldo Cruz.

⁵ Pesquisadora do Departamento de Química do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde. Fundação Oswaldo Cruz.

⁶ Pesquisadora do Laboratório de Zoonoses Bacterianas do Instituto Oswaldo Cruz.

⁷ Pesquisador do Centro de Estudos da Saúde do Trabalhador e Ecologia Humana da Escola Nacional de Saúde Pública. Fundação Oswaldo Cruz.

1. INTRODUÇÃO

Embora bioensaios sejam utilizados para a avaliação dos efeitos de substâncias químicas nos organismos há várias décadas, o desenvolvimento da tecnologia dos biossensores é relativamente recente. Devido à grande versatilidade dos biossensores, houve um aumento significativo do seu uso em diversos campos da ciência nas últimas décadas. Isto pode ser constatado pelo aumento exponencial no número de publicações que tratam desta abordagem. Obtiveram-se resultados similares em levantamentos realizados nas bases de dados *PubMed* e *Web of Science*, utilizando como palavra-chave o termo *biosensor*. A exceção de um único artigo de 1965, as primeiras referências sobre biossensores surgem a partir de 1984. Entre os anos de 1965 e 1985, apenas sete artigos foram publicados. Já no período seguinte (1986-1996) obteve-se cerca de 2.000 referências, enquanto nos últimos anos (1997-2007) foram encontrados 12.000 artigos. Outros exemplos do crescente interesse da comunidade científica sobre o tema foram a realização do primeiro simpósio (nos EUA) e a publicação do primeiro periódico (*Biosensors and Bioelectronics*) dedicados ao tema, respectivamente em 1984 e 1985 (IEEE, 1984).

O grande atrativo desta técnica, em relação aos métodos químicos tradicionais, é que ela permite determinar diretamente a biodisponibilidade das substâncias químicas e seus efeitos biológicos. Estes dados possuem diversas aplicações em várias áreas, como por exemplo: a maximização da absorção de vitaminas e nutrientes na área de nutrição, o estudo da efetividade de novas drogas na medicina, a avaliação do risco das espécies químicas de poluentes nas ciências ambientais. O objetivo do presente artigo foi realizar uma revisão crítica da literatura sobre este importante tema, enfatizando suas aplicações para o monitoramento de poluentes ambientais perigosos para a saúde humana.

1.1. DEFINIÇÃO E PRINCIPAIS CARACTERÍSTICAS

Atualmente, com as crescentes aplicações dos biossensores em vários campos da ciência, diferentes abordagens têm sido utilizadas por pesquisadores para a sua construção e o termo tem sido empregado para designar várias configurações de sistemas analíticos, indiscriminadamente. Rodriguez-Mozaz *et al.* (2005) apresentaram uma definição conveniente para biossensores, que pode ser aplicada aos vários tipos existentes: “*Biossensor é um sistema autônomo integrado, composto de um elemento biológico receptor em contato direto com um elemento conversor, o qual é capaz de converter a reação entre o elemento biológico e o analito de interesse em um sinal mensurável*” (Figura 1).

Enquanto os receptores biológicos são os responsáveis pela seletividade do sistema, a sua sensibilidade é determinada principalmente pelo conversor (Castillo *et al.*, 2004). O elemento biológico pode ser uma enzima, um anticorpo, microorganismos, ácidos nucléicos ou mesmo células inteiras. Conseqüentemente,

alguns exemplos das reações biológicas monitoradas são: a atividade ou inibição de enzimas, a indução de genes específicos ou até a morte celular. A interação do elemento biológico receptor com o analito alvo através de reações específicas gera alterações no meio (ex: alteração da concentração de prótons, emissão de gases, emissão ou absorção de luz, liberação de calor, aumento da massa do receptor e/ou alteração do estado de oxidação do analito), as quais são captadas e transformadas pelo conversor em um sinal mensurável (ex: variação na corrente, no potencial, na temperatura, etc.). Este sinal é proporcional à concentração do analito, permitindo medições tanto qualitativas e quantitativas em tempo real. Geralmente, os conversores realizam medidas óticas ou eletroquímicas, que são amplificadas eletronicamente (Batzias & Siontorou, 2007; Alfaya & Kubota, 2002).

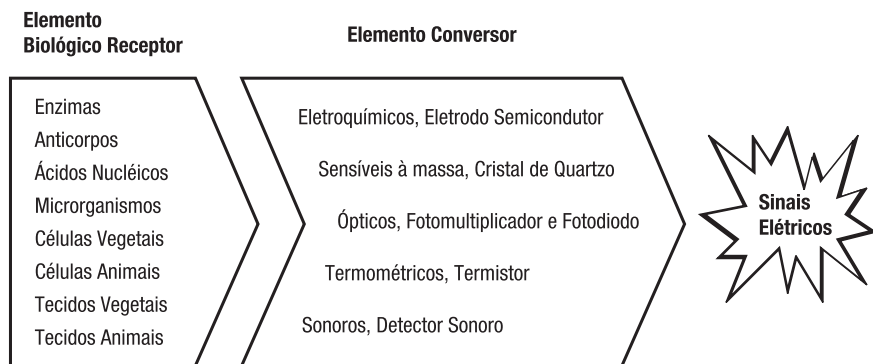


Figura 1
Representação esquemática dos Biossensores (adaptado de Nakamura & Karube, 2003).

Os biossensores, definidos como uma classe específica de sistemas analíticos podem ser diferenciados dos bioensaios tradicionais pela ausência, nestes últimos, de um conversor como parte integral do sistema analítico. Nos bioensaios tradicionais, os resultados são obtidos após o uso de equipamentos ou “conversores” externos. Isto gera muitas vezes a necessidade de diversas etapas de processamento das amostras, com maiores custos e tempos de resposta (Rodriguez-Mozaz *et al.*, 2006).

As principais características genéricas dos biossensores são a grande especificidade e sensibilidade, a simplicidade e a rapidez nas análises, fazendo dos biossensores uma alternativa promissora, de baixo custo de operação e de manutenção (Figura 2). Além destas vantagens, existe a possibilidade de miniaturização dos biossensores, tornando-os sistemas portáteis, o que aliado à capacidade de trabalhar em condições de campo (ex: elevadas temperaturas,

ambientes contaminados) e à possibilidade de determinar os analitos diretamente em amostras complexas (ex: amostras ambientais ou biológicas), sem a necessidade de longos e custosos pré-tratamentos, os tornam candidatos ideais para programas de monitoramento ambientais. Isto é ainda mais relevante, nos casos onde se deseja monitoramento em tempo real, visto que os biossensores podem ser automatizados. Apesar de todas estas vantagens, o uso de biossensores para o monitoramento ambiental ainda é pequeno, quando comparado ao seu uso na medicina e na indústria farmacêutica. Por fim, a tecnologia dos biossensores pode complementar os métodos analíticos tradicionais, fornecendo informações que de outra forma não estariam disponíveis (ex: biodisponibilidade e efeitos biológicos) (Selifonova *et al.*, 1993; Ramanathan *et al.*, 1997; Parellada *et al.*, 1998).

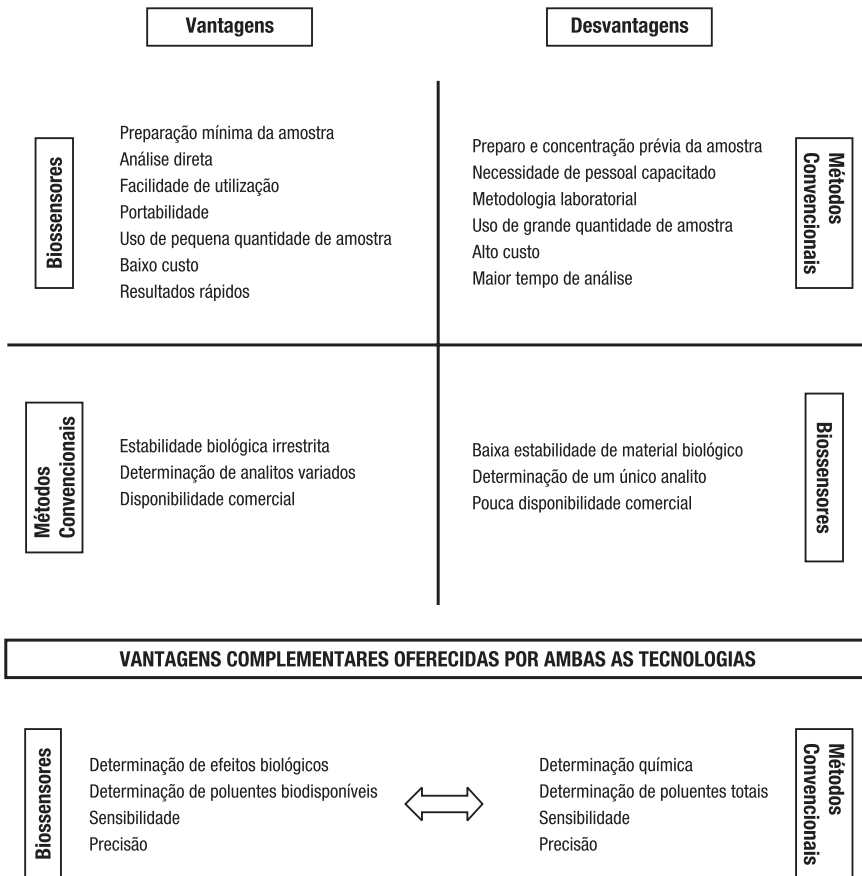


Figura 2

Comparação das características dos Biossensores em relação aos métodos analíticos tradicionais (adaptado de Rodriguez-Mozaz *et al.*, 2004).

A principal desvantagem dos biossensores, é a sua direta dependência do elemento biológico receptor. Conseqüentemente esta técnica analítica, em geral, é menos reprodutível que os métodos químicos tradicionais (Ron, 2007).

2. CLASSIFICAÇÕES DOS BIOSSENSORES

Os biossensores podem ser classificados de diversas maneiras. Dois tipos de classificação comumente descritos na literatura são baseados no método de conversão do sinal ou no elemento biológico receptor (Alfaya & Kubota, 2002).

2.1. CLASSIFICAÇÃO CONFORME O MÉTODO DE CONVERSÃO DO SINAL

Segundo Rodriguez-Mozaz *et al.* (2004), podemos classificar os biossensores em quatro grupos diferentes, de acordo com a forma de conversão do sinal:

2.1.1. BIOSSENSORES ELETROQUÍMICOS

Neste grupo de biossensores, a reação entre o receptor biológico e o analito estudado gera variações na corrente ou no potencial, que são medidas por eletrodos amperométricos ou potenciométricos, respectivamente. A maioria dos biossensores descritos na literatura é eletroquímica, o que pode ser explicado pela alta sensibilidade destes eletrodos e as suas compatibilidades com as modernas tecnologias de microfabricação, portabilidade e baixo custo (Rodriguez-Mozaz *et al.*, 2004). Os biossensores eletroquímicos nos permitem trabalhar com amostras turvas e apresentam custos menores, quando comparados com os métodos ópticos. Por outro lado, dependendo das condições experimentais, podem apresentar uma ligeira perda de sensibilidade e seletividade (Lazcka *et al.*, 2007).

2.1.2. BIOSSENSORES ÓPTICOS

Neste grupo de biossensores, a reação entre o receptor biológico e o analito estudado, produz ou absorve luz, que é comumente detectada por tubos fotomultiplicadores. Estes biossensores são os mais utilizados para bioanálise, sendo o segundo grupo mais comum de biossensores. Eles têm sido utilizados para a detecção de contaminantes, drogas, substâncias tóxicas e agentes patogênicos. Os sensores ópticos, além de rápidos, possuem componentes de miniaturização adequados e apresentam a capacidade de analisar mais de um elemento simultaneamente (Rodriguez-Mozaz *et al.*, 2004; Lazcka *et al.*, 2007).

2.1.3. BIOSSENSORES SENSÍVEIS À MASSA (PIEZOELÉTRICOS)

Neste grupo de biossensores, a reação entre o receptor biológico e o analito estudado faz com que a massa do receptor biológico aumente. Para este grupo de biossensores, as quantidades necessárias de receptor e de amostra são extremamente

reduzidas e os limites de detecção alcançados são bastante baixos quando comparados com os métodos clássicos. Além disso, estes biossensores permitem o monitoramento em tempo real no ar, no vácuo ou em amostras ambientais que se encontrem no estado líquido (Rodriguez-Mozaz *et al.*, 2004).

2.1.4. BIOSSENSORES TERMOMÉTRICOS

Estes biossensores são baseados na detecção de alterações de temperatura provenientes de reações biológicas que produzem calor. Suas aplicações são, principalmente, na área clínica e em processos industriais. No campo ambiental, suas aplicações começaram a ser estudadas para a identificação de alguns pesticidas cujas reações produzem calor (Rodriguez-Mozaz *et al.*, 2004).

2.2. CLASSIFICAÇÃO CONFORME O ELEMENTO BIOLÓGICO RECEPTOR

Os biossensores podem ser divididos em dois grupos, de acordo com o elemento biológico receptor: biocatalíticos (ex: enzimas, microorganismos, organelas, células ou tecidos de plantas e animais) e bioligantes (ex: anticorpos, receptores, ácidos nucléicos). Recentemente, alguns elementos artificiais também têm sido considerados como elementos biológicos receptores, tais como os polímeros biomiméticos, que possuem as mesmas características de seletividade e apresentam vantagens em relação à estabilidade química e capacidade de adsorção (Nakamura & Karube, 2003; Tarley, 2005).

2.2.1. BIOSSENSORES IMUNOLÓGICOS

Nestes biossensores, anticorpos são usados como o elemento biológico receptor. A detecção pode ser eletroquímica, quando o anticorpo é previamente imobilizado num eletrodo, ou óptica, quando o anticorpo é imobilizado em um suporte. A imobilização pode ser através de adsorção passiva, interações covalentes ou através de uma matriz de gel (Castillo *et al.*, 2004; Patel, 2002).

2.2.2. BIOSSENSORES DE ÁCIDO NUCLÉICO

Muitos biossensores de ácido nucléico são baseados na capacidade de hibridização das moléculas de DNA e de RNA. Muitos testes de toxicidade são baseados na interação do composto tóxico com a molécula de DNA, imobilizada em um suporte adequado, desenvolvida especificamente para monitoramentos ambientais e testes de triagem (Baeumner, 2003).

2.2.3. BIOSSENSORES ENZIMÁTICOS

O primeiro biossensor descrito na literatura era do tipo enzimático, desenvolvido para a detecção de glicose (Clark & Lions 2006). As enzimas são

substâncias orgânicas de natureza protéica, com atividade intra ou extracelular e que induzem reações químicas que dificilmente aconteceriam sem a sua presença. Este tipo de biossensor utiliza enzimas específicas que interagem com o analito de interesse, gerando produtos que são detectados diretamente pelo conversor. Os biossensores enzimáticos representam um dos maiores grupos de sensores com aplicações em amostras ambientais e de alimentos (Bacumner, 2003; Castillo *et al.*, 2004).

2.2.4. BIOSSENSORES CELULARES

Os biossensores podem ser construídos com componentes biológicos isolados (ex: proteínas, anticorpos, ácido nucléico, etc.) ou com organismos íntegros (ex: células microbianas intactas). Existem algumas questões que devem ser consideradas quanto ao uso de organismos íntegros, tais como: tempo de vida da célula, maiores tempos de resposta e de retorno do sinal a linha de base, possibilidade de obtenção de baixa reprodutibilidade devido à variabilidade entre lotes de células produzidas, provável influência dos mecanismos de transporte e metabolismo celular no sinal do biossensor e etc. Um ponto fundamental para este tipo de biossensor é o controle cuidadoso das condições de cultivo celular. A idade da cultura, a temperatura, a densidade celular, as condições de aeração das culturas (caso isto seja necessário) durante o cultivo e a experimentação podem afetar significativamente a resposta dos biossensores celulares (Ramanathan *et al.*, 1997).

Apesar destas questões, as quais não são insuperáveis, existem várias vantagens no uso de células íntegras em biossensores. Primeiramente, a construção destes biossensores é mais barata, uma vez que, geralmente, as células são produzidas facilmente, em grandes quantidades e não é necessário o isolamento dos componentes celulares receptores, que muitas vezes requerem técnicas analíticas sofisticadas. Em segundo lugar, estes biossensores são geralmente mais tolerantes às condições experimentais (ex: temperatura e pH fora dos limites usuais), uma vez que os componentes biológicos se encontram no ambiente intracelular que é controlado internamente por mecanismos celulares. Portanto, muitas vezes, este tipo de biossensor apresenta maior estabilidade e duração de uso, que os biossensores construídos com componentes biológicos isolados. Por último, com o uso deste tipo de biossensor podemos obter informações sobre o funcionamento do analito dentro da célula, como o efeito estimulante ou inibidor (agonista ou antagonista) ou a toxicidade do analito (causando a morte celular), que dependendo do objetivo do estudo, podem ser muito valiosas. Por estas razões, existe um grande número de biossensores construídos com células íntegras, descritos na literatura. Biossensores baseados neste tipo de elemento biológico são amplamente utilizados no monitoramento de contaminantes químicos no meio ambiente, como

é o caso do monitoramento da demanda bioquímica de oxigênio (DBO) e de metais pesados (Selifonova *et al.*, 1993; Bousse, 1996; Ramanathan *et al.*, 1997).

Um importante subgrupo de biossensores celulares utiliza células microbianas íntegras (biossensores microbianos). Eles apresentam uma configuração um pouco diferente da definição descrita anteriormente. Embora existam uma grande variedade de arranjos, o princípio geralmente utilizado na construção deste tipo de biossensores se baseia na técnica do DNA recombinante (Figura 3). Nesta abordagem, um gene sinalizador é colocado sob o controle de um promotor, muitas vezes proveniente de um gene de resistência à substância que se deseja estudar, o qual é induzido apenas pela presença intracelular desta substância. O material genético manipulado pode ser inserido em um organismo hospedeiro, que por sua vez pode ser imobilizado ou não em um substrato. Enquanto a especificidade do biossensor é determinada pelo promotor, a sua sensibilidade é definida pela efetividade da expressão do gene sinalizador. Fazendo uma analogia com a definição clássica de biossensores, o promotor funciona como o elemento receptor enquanto o gene sinalizador é o elemento conversor. Assim a célula como um todo funciona como um sistema bioanalítico. A detecção da expressão do gene sinalizador pode ocorrer por uma diminuição do consumo de oxigênio, pela degradação e detecção de xenobióticos ou por alterações extracelulares. Estas alterações podem ser mensuradas quantitativamente por detectores eletroquímicos (ex: mudança de pH) ou ópticos (ex: produção de luz), ou mesmo qualitativamente, como no caso de reações bioluminescentes que não necessitem da adição de outros substratos (ex: gene da proteína fluorescente verde). Vários promotores diferentes tem sido utilizados na construção de biossensores microbianos. Entretanto existem poucos genes sinalizadores disponíveis para serem usados na construção de biossensores. Na sua maioria, eles codificam proteínas facilmente detectáveis, muitas delas luminescentes ou fluorescentes. Os biossensores microbianos têm sido usados de duas maneiras: para detecção de analitos específicos (ex: metais e compostos orgânicos) ou para a avaliação de parâmetros mais genéricos como genotoxicidade (Patel, 2002; Köhler *et al.*, 2000).

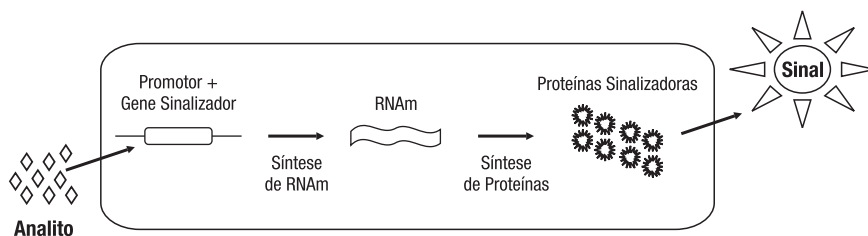


Figura 3

Representação do princípio dos Biossensores Microbianos (adaptado de Köhler *et al.*, 2000).

3. APLICAÇÕES DOS BIOSSENSORES

3.1. APLICAÇÕES EM ALIMENTOS

Para garantir a qualidade dos produtos e o controle das etapas de produção, as indústrias de bebidas e de alimentos necessitam de métodos analíticos para detecção de contaminantes e de patógenos, rápidos e precisos. Embora existam técnicas analíticas tradicionais que atendem a estes requisitos, estas requerem elevado investimento financeiro e geralmente um longo tempo para preparo das amostras. Os biossensores tem se mostrado como uma alternativa promissora neste campo, graças à seletividade, à rapidez e ao baixo custo deste tipo de tecnologia. Embora, nos últimos anos, tenha sido publicado um grande número de trabalhos sobre o uso de biossensores para análise de alimentos, poucos desses sistemas estão disponíveis comercialmente, uma das razões para este fato é a curta vida útil do componente biológico (Harkensee *et al.*, 2006; Carelli *et al.*, 2007; Vermeir *et al.*, 2008).

Para análise de alimentos, a maior parte dos biossensores desenvolvidos tem como princípio a inibição da atividade enzimática. A enzima acetilcolinesterase é usada em 50% das análises, enquanto que a butilcolinesterase é usada em 11% dos casos. As aplicações de biossensores enzimáticos em alimentos restringem-se, preferencialmente, à análise de pesticidas (71%) e de metais pesados (21%). Outros compostos como glicocalcólides, ácido benzóico, cianamida hidrogenada, óxido nítrico e neurotoxinas, representam 8% do uso desta tecnologia (Amine *et al.*, 2006).

Xavier *et al.* (2000) utilizaram um biossensor de fibra ótica para detecção de dois pesticidas da classe carbamato (propoxur e carbaril) em cultivo de vegetais. Enquanto Del Carlo *et al.* (2005) aplicaram um biossensor eletroquímico de inibição enzimática para analisar a presença de carbamatos e organofosforados em amostras de origem animal. Os resultados obtidos nestes estudos demonstraram que os biossensores foram precisos, sensíveis e com baixo tempo de resposta, além de serem simples de manipular.

Outros estudos bem sucedidos, relatados na literatura, com biossensores eletroquímicos são: amostras de plantas em Del Carlo *et al.* (2002); suco de uva em Ivanov *et al.* (2003); extrato de maçã e trigo em Amine *et al.* (2006) e ensaios com amostras de maionese (matriz hidrofóbica) e de refrigerantes contendo cola (matriz hidrofílica) para detecção de ácido benzóico em Morales *et al.* (2002).

3.2. APLICAÇÕES BIOMÉDICAS

Na área biomédica, o biossensor mais utilizado associa sensores amperométricos com receptores enzimáticos. Dentre as suas aplicações, podemos destacar o

monitoramento da glicose no sangue *in situ*. Neste caso, a enzima oxidase reage quando há açúcar no sangue analisado e transmite um sinal, com intensidade proporcional à quantidade de glicose detectada pelo eletrodo (Abel & Von Woedtke, 2002).

O uso de biossensores na medicina apresenta uma série de vantagens como, por exemplo, detecção rápida do analito sem tratamento prévio da amostra, facilidade no manuseio e necessidade de uma quantidade pequena da amostra para análise. Além da glicose, outras substâncias de importância biomédica são detectadas a partir de biossensores amperométricos enzimáticos como o lactato, a uréia, o glutamato, a creatinina, o álcool e o colesterol (Castillo *et al.*, 2004).

Recentemente, Maki *et al.* (2008) desenvolveram o primeiro biossensor capaz de detectar a metilação do DNA celular, alteração capaz de provocar a formação de tumores malignos. Esse sistema tem como alvo o promotor do gene p16^{INK}, gene de supressão tumoral, o qual é capturado e concentrado em pontos magnéticos. A presença de moléculas do DNA alvo provoca alterações na carga elétrica que geram sinais detectáveis pelo sensor. Este sistema teve limite de detecção adequado e não apresentou resultados falsos positivos.

3.3 APLICAÇÕES AMBIENTAIS

Centenas de substâncias químicas têm sido liberadas todos os anos no meio ambiente sem que sejam conhecidos seus possíveis efeitos tóxicos para saúde humana e ambiental. Por esse motivo, é de extrema importância o contínuo desenvolvimento de novas técnicas analíticas capazes de avaliar os riscos relacionados à liberação desses contaminantes no ambiente e à exposição humana (Sorensen *et al.*, 2003). Neste contexto, a tecnologia dos biossensores surge como uma abordagem promissora. Além de possuir diversas características que fazem o seu uso para o monitoramento ambiental de poluentes mais vantajoso em relação a outras técnicas, os biossensores complementam os métodos analíticos tradicionais, gerando novas informações que são fundamentais para avaliação do risco de poluentes (Marco & Barceló, 1996).

3.3.1. DISRUPTORES ENDÓCRINOS

Os disruptores endócrinos formam uma nova categoria de contaminantes ambientais, capazes de mimetizar ou antagonizar os efeitos de hormônios endógenos masculinos e femininos, como o estrógeno e o andrógeno, e de interferir na sua síntese ou metabolismo. Essa classe de poluentes, que inclui estrógenos naturais ou farmacêuticos, fitoestrógenos, alquilfenóis, dioxinas, hidrocarbonetos policíclicos aromáticos e pesticidas organoclorados, não é conhecida por sua natureza química, mas por seus efeitos biológicos. A principal

via de exposição humana a esses compostos é através do contato com águas contaminadas por esgoto doméstico e industrial ou por efluentes de áreas de cultivo vegetal (Marchesini *et al.*, 2007; Pillon *et al.*, 2005; Dempsey *et al.*, 2004).

Os disruptores endócrinos podem ser detectados através de técnicas analíticas clássicas, como a cromatografia líquida de alta performance, cromatografia a gás ou técnicas imunológicas como o teste ELISA (De Melenauer *et al.*, 2002). O principal problema destas técnicas é que a especificidade do método permite a detecção de somente um composto ou um grupo de compostos relacionados estruturalmente (Cliquet *et al.*, 2003). Entretanto, os disruptores endócrinos apresentam uma grande diversidade estrutural. Nesse sentido, os biossensores são a melhor alternativa tecnológica, pois permitem distinguir a fração biodisponível e a toxicidade do contaminante analisado. As duas principais classes de biossensores são os que medem efeitos endócrinos e aqueles que respondem à presença de substâncias específicas baseados no reconhecimento específico de uma molécula biológica. Foi desenvolvida uma série de biossensores específicos para alguns importantes disruptores endócrinos, tais como: resíduos de esteróides, compostos bifenil policlorados, compostos fenólicos, surfactantes, hidrocarbonetos aromáticos policíclicos e pesticidas (Rodríguez-Mozaz *et al.*, 2004). Estudos recentes têm ressaltado a importância da aplicação dos biossensores na detecção de disruptores endócrinos e novos produtos vêm sendo desenvolvidos e patenteados com este objetivo (Pillon *et al.*, 2005; Dittmer *et al.*, 2008; Marchesini *et al.*, 2008).

Os resíduos de esteróides são encontrados na carne de animais, no solo e na água que recebem os excrementos desses animais. Embora sua concentração na água seja freqüentemente baixa, seu uso é amplamente disseminado, o que torna preocupante sua presença no ambiente aquático. Algumas técnicas têm sido empregadas para a análise de esteróides e outros poluentes orgânicos na água, principalmente o uso de imunossensores ópticos (Lopez de Alda & Barcelo, 2001; Lange *et al.*, 2002).

Os compostos bifenil policlorados são reconhecidos como poluentes amplamente distribuídos no ambiente, em decorrência de sua utilização industrial. Sua alta toxicidade representa um risco de saúde pública. Existem na literatura registros sobre a utilização de biossensores de DNA, enzimáticos, celulares e imunossensores para a detecção destes compostos em águas de rios (Del Carlo *et al.*, 1997; Marrazza *et al.*, 1999).

Os surfactantes, um grupo de poluentes orgânicos de larga distribuição no meio ambiente, têm sido detectados a partir da utilização de biossensores microbianos e imunossensores com detecção eletroquímica (Reshetilov *et al.*, 1997; Taranova *et al.*, 2002).

Os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos apresentam-se distribuídos de forma abundante no ambiente e são reconhecidos como carcinogênicos. Podem atuar

como bloqueadores da ativação do receptor de estrogênio ou disparando um largo espectro de respostas antiestrogênicas a partir da indução de genes específicos. Para sua detecção no ambiente, foram desenvolvidos biossensores microbianos com resposta amperométrica e imunossensores fluorescentes (Alarie *et al.*, 1990; Koenig *et al.*, 1997).

Apesar do grande número de biossensores em desenvolvimento e de pesquisas nessa área, poucas soluções práticas voltadas à aplicação ambiental estão disponíveis comercialmente.

3.3.2. PESTICIDAS

Segundo a Organização Mundial de Saúde, dois milhões de pessoas são intoxicadas por pesticidas anualmente e cerca de duzentas mil chegam a óbito (WHO, 1990). A toxicidade de alguns pesticidas está relacionada com a sua capacidade de modificar irreversivelmente a enzima acetilcolinesterase (AChE) (Vakurov *et al.*, 2004). Nas últimas décadas, uma série de estudos demonstrou que as enzimas da classe colinesterase (ChO) são extremamente eficazes para análise de toxicidade de pesticidas em programas de monitoramento ambiental. Conseqüentemente, na maioria dos estudos relatados na literatura para a detecção de pesticidas, utilizou-se biossensores enzimáticos, cujo princípio consiste exatamente na inibição enzimática. Para a construção de biossensores podem ser usados dois tipos de ChO: a acetilcolinesterase (AChE) e a butirilcolinesterase (BuChE), que podem apresentar diferentes níveis de especificidade e de susceptibilidade dependendo da fonte utilizada (Cremisini *et al.*, 1995; Marques *et al.*, 2004; Dzyadevych *et al.*, 2005).

Embora as enzimas ChO possuam sensibilidade adequada, pesticidas com estruturas químicas bastante diferentes entre si (ex: carbamatos e organofosforados) inibem o funcionamento da enzima de forma bastante similar, indicando baixa seletividade. Para atenuar a falta de especificidade, novas enzimas têm sido desenvolvidas em laboratório através de manipulações genéticas, podendo ser usadas para detecção específica de analitos (Andrés & Narayanaswamy, 1997).

Os primeiros biossensores com ChO surgiram na década de 1980, para detecção de pesticidas organofosforados através de alterações de corrente elétrica (Andreescu & Marty, 2006). Até hoje esse tipo de tecnologia é aplicada, mas tem passado por inovações para aumento da sua eficácia. Como por exemplo, no trabalho de Du *et al.* (2007) em que se testou o uso de quitosan como matriz enzimática, visando aumentar a compatibilidade e a estabilidade da enzima AChE no eletrodo. Esse estudo corrobora outros trabalhos (Skladal *et al.*, 1996; Schulze *et al.*, 2005) que apontam a elevada sensibilidade da AChE quando exposta a pesticidas. A sensibilidade da enzima ao pesticida testado é determinada pelas alterações no seu comportamento eletroquímico.

Como alternativa ao uso de enzimas, Natarajan *et al.* (2006) desenvolveram um biossensor para detecção de piretróides através do uso de células cardíacas associadas a microeletrodos. Esse dispositivo demonstrou sensibilidade a todos os piretróides testados (alfa-cipermetrin, tetrametrin e teflutrin) e respostas similares na frequência e na amplitude dos batimentos das células.

Outros estudos apresentaram bons resultados utilizando imunossensores piezelétricos (Yokoyama *et al.*, 1995; Horacek & Skladal, 1997) e amperométricos (Schipper *et al.*, 1998; Mallat *et al.*, 2001) para a análise de alguns pesticidas.

3.3.3. FENOL

Os compostos fenólicos encontrados em ambientes aquáticos podem ser provenientes da degradação natural de substâncias usadas na agricultura e em atividades industriais, destacando-se neste grupo os nitrofenóis e os clorofenóis. Essa classe de contaminantes apresenta elevada toxicidade e pode ser acumulada em compartimentos ambientais (Leejarv *et al.*, 2006; Degiuli & Blum, 2000).

Leejarv *et al.* (2006) aplicaram um biossensor celular bacteriano para detecção de compostos fenólicos em amostras ambientais. Para isso, foi usada como sensor a bactéria *Pseudomonas fluorescens* OS8 contendo o operon *luxCDABE* sob o controle do gene promotor *Po*, proveniente da cepa *Pseudomonas* sp. CF600 e ativado pela presença de fenol.

Biossensores amperométricos utilizando diferentes elementos biológicos receptores foram desenvolvidos para análises de compostos fenólicos em amostras ambientais. Por exemplo, Parellada *et al.* (1998) desenvolveram um biossensor utilizando a enzima tirosinase, imobilizada em matriz de hidrogel e disposta sobre um eletrodo de grafite. Esse dispositivo apresentou resultados analíticos análogos aos obtidos utilizando métodos convencionais. Mais recentemente Kafi *et al.* (2008) detectaram vários tipos de compostos fenólicos utilizando um biossensor composto de hemoglobinas retidas em uma matriz sol-gel e associadas a um eletrodo amperométrico.

3.3.4. NITRITO

Nitritos são amplamente usados para a preservação de alimentos e para a fertilização de solos. Entretanto, a ingestão contínua desses íons pode causar graves implicações na saúde humana, inclusive câncer. Particularmente o nitrito pode reagir irreversivelmente com a hemoglobina, interferindo no transporte de oxigênio no sangue (Mirvish, 1995; Moorcroft, 2001).

Chen *et al.* (2007) desenvolveram um biossensor para determinação amperométrica de nitrito utilizando o citocromo *c* da enzima nitrito redutase (ccNiR), proveniente da bactéria *Desulfotribrio desulfuricans*, imobilizado e conectado

a um eletrodo. O biossensor apresentou um tempo de resposta rápido ao nitrito e um limite de detecção adequado às análises ambientais. Embora não seja específico, o biossensor para nitrito demonstrou ser mais seletivo do que os métodos espectrofotométricos baseados na Reação de Grisses, os quais são susceptíveis a interferências de matrizes complexas. Mais recentemente, Dai e colaboradores (2008) descreveram outro biossensor eletroquímico para determinação de nitrito. Este se baseia na transferência de hemoglobinas imobilizadas em nanoesferas de HS-CdS. Os resultados obtidos no estudo comprovaram a aplicabilidade desta abordagem para atingir os objetivos propostos.

3.3.5. DEMANDA BIOQUÍMICA DE OXIGÊNIO

A demanda bioquímica de oxigênio (DBO) é um método capaz de detectar a presença de substâncias biodegradáveis no ambiente, sendo considerado um dos parâmetros mais importante para determinar a qualidade da água. A longa demora do método tradicional, que requer cinco dias, contribuiu para que em 1977 fosse desenvolvido o primeiro biossensor para DBO. Este consistia em um eletrodo para oxigênio dissolvido associado à levedura *T. cutaneum* (Karube *et al.*, 1977). Embora já tenham sido construídos diversos tipos de biossensores para detecção rápida de DBO que associam eletrodos de oxigênio e microorganismos aeróbicos (Lehmann *et al.*, 1999; Kim & Kwon, 1999), é difícil manter a atividade e a estabilidade da membrana de células sobre o eletrodo de oxigênio por um longo período.

Em 2003, Nakamura e Karube desenvolveram um novo sistema para medição de DBO a partir de células de *Escherichia coli* recombinadas com os genes *lux A-E* de *Vibrio fischeri*. Com este sistema foi possível a análise de múltiplas amostras em tempo real. Esses dispositivos de uso prático têm sido comercializados principalmente para indústrias farmacêuticas e alimentícias. Recentemente, Sakaguchi *et al.* (2007) desenvolveram outro biossensor óptico para monitoramento de DBO, no qual a bactéria luminescente *Photobacterium phosphoreum* IFO 13896 foi imobilizada sobre um bio-chip. Esse sistema foi capaz de detectar valores de DBO inferiores a 16 ppm e os valores apresentaram correlação similar aos obtidos através do método convencional.

3.3.6. METAIS

O perigo associado à poluição por metais pesados é decorrente da presença ubíqua destes elementos na biosfera em formas bioacessíveis, provenientes tanto de fontes naturais quanto antropogênicas, e de sua elevada toxicidade. Assim, existem vários casos descritos na literatura onde a exposição de populações a estes poluentes resultou em danos severos à sua saúde humana, inclusive com números significativos de óbitos. Os contaminantes metálicos mais comumente observados

são: chumbo, cromo, zinco, mercúrio, cádmio e cobre (Maffia & Davis, 2001). A tecnologia dos biossensores tem sido cada vez mais aplicada em estudos para monitoramento de metais tóxicos no ambiente, inclusive várias revisões foram publicadas sobre este tema (Selifonova *et al.*, 1993; Ramanathan *et al.*, 1997; Riether *et al.*, 2001; Stoyanov *et al.*, 2003; Ren & Frymier, 2005).

Muitos dos biossensores desenvolvidos para análises de metais em amostras ambientais se utilizam de genes específicos de resistência bacteriana a estes elementos, como elementos biológicos receptores. Ao longo da evolução, os microorganismos desenvolveram mecanismos que permitem sua sobrevivência na presença de metais. Já foram isoladas cepas bacterianas resistentes a uma série de metais como zinco, cobre, estanho, prata, mercúrio e cobalto. Estes genes de resistência a metais são induzidos apenas quando o elemento atinge o citoplasma bacteriano. A especificidade desse mecanismo de resistência contribuiu para que fossem construídos biossensores celulares para detecção de metais, a partir da fusão desses genes de resistência com genes codificadores de proteínas bioluminescentes, como por exemplo, a luciferina. A produção de luz indica a presença do metal investigado na amostra e pode ser medida por instrumentos como luminômetros e fotômetros (Ramanathan *et al.*, 1997).

Em 1993, Selifonova e colaboradores desenvolveram biossensores para detecção de espécies mercuriais biodisponíveis no meio ambiente. Esses sistemas foram construídos a partir da fusão de genes do operon Tn21, que confere resistência ao mercúrio, com os genes *luxCDABE* da bactéria *Vibrio fischeri*. Os resultados demonstraram a grande eficiência desta abordagem para análise de mercúrio em água doce, de chuva e de estuários. Sendo capaz de detectar concentrações mercuriais na faixa nanomolar. Mais tarde, Omura e colaboradores (2004) desenvolveram um biossensor para mercúrio ainda mais sensível, capaz de ser ativado na concentração de 2 pM de mercúrio em 1 mL de amostra de água contaminada. Esse biossensor foi construído também a partir da fusão do operon de resistência ao mercúrio presente no plasmídeo *pMR26* da cepa *Pseudomonas* K-62 com o gene *luxAB* de *Vibrio harveyi*.

Em 2000, Campbell e colaboradores construíram um biossensor bacteriano luminescente geneticamente modificado para avaliar a relação entre a toxicidade de metais e a presença de íons livres. Neste ensaio, uma cepa de *Escherichia coli* HB101, contendo os genes *lux* no plasmídeo *pUCD607* foi exposta a Cd, Cu e Zn na presença de substâncias quelantes (EDTA e ácido fúlvico) posteriormente, foram feitas medições das respostas biológicas aos metais tóxicos. Os resultados do trabalho mostraram que nem sempre é possível estabelecer uma relação direta entre biodisponibilidade e toxicidade, indicando que células vivas competem ativamente pelos metais com as substâncias de caráter ligante.

4. PERSPECTIVAS FUTURAS PARA A TECNOLOGIA DOS BIOCENSORES

Os avanços nas áreas de bioquímica, química analítica, bioeletrônica e ciências dos materiais determinarão os próximos passos da tecnologia dos biossensores. O progresso dos biossensores depende principalmente da evolução em dois campos: melhoria na tecnologia dos elementos conversores e o aumento de elementos biológicos receptores disponíveis. Espera-se em um futuro próximo, a significativa melhora nos sistemas de conversão e detecção utilizados nos biossensores a partir das pesquisas em micro-eletrônica e nano-eletrônica, ou mesmo, o desenvolvimento de novos materiais ópticos. Da mesma forma, a criação de novos elementos biológicos receptores como resultado de pesquisas nas áreas de biotecnologia e engenharia genética, influenciarão grandemente a produção dos novos biossensores. A nossa capacidade de projetar e construir elementos biológicos com propriedades físico-químicas específicas desejadas tem crescido bastante nas últimas décadas, inclusive com a criação de moléculas sintéticas (ex: ácidos nucleicos sintéticos) e a manipulação gênica de células (ex: produção de células bioluminescentes) e será determinante para o desenvolvimento do campo dos biossensores. Por fim, apesar dos resultados e avanços já obtidos por esta nova tecnologia, existe ainda a necessidade de melhorar os métodos de construção empregados. Uma questão crucial para o desenvolvimento de novos e melhores biossensores é a eficiente imobilização dos elementos biológicos receptores em matrizes adequadas. Isto garante a sua efetiva conexão com elemento conversor, aumentando a estabilidade, a reprodutibilidade e o tempo de vida útil do biossensor. Para isso novas técnicas têm sido desenvolvidas ou adaptadas de outras áreas (ex: eletropolimerização) e acredita-se que avanços nestas áreas terão um impacto importante na tecnologia dos biossensores.

Outra tendência que deve se confirmar no campo dos biossensores é o aumento da disponibilidade e a conseqüente comercialização de sistemas patenteados por grandes empresas para análise de vários analitos (ex: metais, pesticidas, etc.), resultado do investimento maciço que os países desenvolvidos têm aplicado nesta área nas últimas décadas. De maneira análoga, espera-se o crescimento no número de substâncias analisadas por biossensores, sobretudo já observar-se um esforço dos pesquisadores para o desenvolvimento de biossensores para o estudo de novas classes de contaminantes (ex: disruptores endócrinos).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABEL, P. U.; VON WOEDTKE, T. Biosensors for in vivo glucose measurement: can we cross the experimental stage. *Biosensor & Bioelectronics*. v. 17, n. 11, p. 1059 - 1070, 2002.

- ALARIE, J. P.; BOWYER, J. R.; SEPANIAK, M. J.; HOYT, A. M.; VO-DINH, T. Fluorescence monitoring of a benzo[a]pyrene metabolite using a regenerable immunochemical-based fiber-optic sensor. *Analytica Chimica Acta*. v. 236, p. 237 - 244, 1990.
- ALFAYA, A. A. S.; KUBOTA, L. T. A utilização de materiais obtidos pelo processo de Sol-Gel na construção de biossensores. *Química Nova*. v. 25, n. 5, p. 835 - 841, 2002.
- AMINE, A.; MOHAMMADI, H.; BOURAIS, I.; PALLESCHI, G. Enzyme inhibition-based biosensors for food safety and environmental monitoring. *Biosensors & Bioelectronics*. v. 21, n. 8, p. 1405 - 1423, 2006.
- ANDREESCU, S.; MARTY, J. L. Twenty years research in cholinesterase biosensors: From basic research to practical applications. *Biomolecular Engineering*. v. 23, n. 1, p. 1 - 15, 2006.
- ANDRES, R. T.; NARAYANASWAMY, R. Fiber-optic pesticide biosensor based on covalently immobilized acetylcholinesterase and thymol blue. *Talanta*. v. 44, p. 1335 - 1352, 1997.
- BATZIAS, F.; SIONTOROU, C. G. A novel system for environmental monitoring through a cooperative/synergistic scheme between biondicators and biosensors. *Journal of Environmental Management*. v. 82, n. 2, p. 221 - 239, 2007.
- BAEUMNER, A. J. Biosensors for environmental pollutants and food contaminants. *Analytical & Bioanalytical Chemistry*. v. 377, n. 3, 434 - 445, 2003.
- Bousse, L. Whole cell biosensors. *Sensors and Actuators B: Chemical*. v. 34, n. 1, p. 270 - 275, 1996.
- CAMPBELL, C. D.; HIRD, M.; LUMSDON, D. G.; MEEUSSEN, J. C. L. The effect of EDTA and fulvic acid on Cd, Zn, and Cu toxicity to a bioluminescent construct (pUCD607) of Escherichia coli. *Chemosphere*. v. 40, n. 3, p. 319 - 325, 2000.
- CARELLI, D.; CENTONZE, D.; PALERMO, C.; QUINTO, M.; ROTUNNO, T. An interference free amperometric biosensor for detection of biogenic amines in food products. *Biosensor & Bioelectronics*. v. 23, n. 5, p. 640 - 647, 2007.
- CASTILLO, J.; GASPAS, S.; LET, S.; NICULESCU, M.; MORTARI, A.; BONTIDEAN, I.; SOUKHAREV, V.; DORNEANU, S. A.; RYABOV, A. D.; CSÖREGI, G. Biosensors for life quality – Design, development and applications. *Sensors and Actuators B: Chemical*. v. 102, n. 2, p. 179 - 184, 2004.

CHEN, H.; MOUSTY, C.; COSNIER, S.; SILVEIRA, C.; MOURA, J. J. G.; ALMEIDA, M. G. Highly sensitive nitrite biosensor based on the electrical wiring of nitrite reductase by [ZnCr-AQS] LDH. *Electrochemistry Communications*. v. 9, n. 9, p. 2240 - 2245, 2007.

CLARK, L. C.; LYONS, C. Electrode systems for monitoring in cardiovascular surgery. In: ANDREESCU, S.; MARTY, J. L. Twenty years research in cholinesterase biosensors: From basic research to practical applications. *Biomolecular Engineering*. v. 23, n. 1, p. 1 - 15, 2006.

CLIQUET, P.; COX, E.; HAASNOOT, W.; SCHACHT, E.; GODDEERIS, B. M. Extraction procedure for sulfachloropyridazine in porcine tissues and detection in a sulfonamide-specific enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Analytica Chimica Acta*. v. 494, n. 1/2, p. 21 - 28, 2003.

CREMISINI, C.; DI SARIO, S.; MELA, J.; PILLOTON, R.; PALLESCHI, G. Evaluation of the use of free and immobilised acetylcholinesterase for paraoxon detection with an amperometric choline oxidase based biosensor. *Analytical Chimica Acta*. v. 311, p. 273 - 280, 1995.

DAI, M.; GOU, L.; RAN, J. Effect of surface charges of nanoparticles on response current of enzyme electrode for single use. *Sensors and Actuators B: Chemical*. v. 133, n. 2, p. 565 - 570, 2008.

DE MEULENAER, B.; BAERT, K.; LANCKRIET, H.; VAN HOED, V.; HUYGHEBAERT, A. Development of an enzyme-linked immunosorbent assay for bisphenol a using chicken immunoglobulins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. v. 50, n. 19, p. 5273 - 5282, 2002.

DEGIULI, A.; BLUM, L. J. Flow injection chemiluminiscence: detection of chlorophenols with a fibre optic biosensor. *Journal of Medical Biochemistry*. v. 4, p. 32 - 42, 2000.

DEL CARLO, M.; LIONTI, I.; TACCINI, M.; CAGNINI, A.; MASCINI, M. Disposable screen-printed electrodes for the immunochemical detection of polychlorinated biphenyls. *Analytica Chimica Acta*. v. 342, n. 2-3, p. 189 - 197, 1997.

DEL CARLO, M.; MASCINI, M.; PEPE, A.; COMPAGNONE, D.; MASCINI, M.; Electrochemical bioassay for the investigation of chlorpyrifos-methyl in wine sample. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. v. 25, p. 7206 - 7210, 2002.

DEL CARLO, M.; PEPE, A.; MASCINI, M.; GREGORIO, M.; VISCONTI, A.; COMPAGNONE, D. Determining pirimiphos-methyl in durum wheat sample using

an acetylcholinesterase inhibition assay. *Analytical & Bioanalytical Chemistry*. v. 381, n. 7, p. 1367 - 1372, 2005.

DEMPSEY, E.; DIAMOND, D.; COLLIER, A. Development of a biosensor for endocrine disrupting compounds based on tyrosinase entrapped within a poly(thionine) film. *Biosensors and Bioelectronics*. v. 20, n. 2, p. 367 - 377, 2004.

DITTMER, W. U.; KIEVIT, P.; PRINS, M. W. J.; VISSERS, J. L. M.; MERSCH, M. E. C.; MARTENS, M. F. W. C. Sensitive and rapid immunoassay for parathyroid hormone using magnetic particle labels and magnetic actuation. *Journal of Immunological Methods*. v. 338, n. 1-2, p. 40 - 46, 2008.

DU, P.; LIU, S.; WU, P.; CAI, C. Single-walled carbon nanotubes functionalized with poly(nile blue A) and their application to dehydrogenase-based biosensors. *Electrochimica Acta*. v. 53, n. 4, p. 1811-1823, 2007.

DZYADEVYCH, S. V.; SOLDATKIN, A. P.; ARKHYPOVA, V. N.; EL'SKAYA, A. V.; CHOVELON, J. M.; GEORGIU, C. A.; MARTELET, C.; JAFFREZIC-RENAULT, N. Early-warning electrochemical biosensor system for environmental monitoring based on enzyme inhibition. *Sensors and Actuators B: Chemical*. v. 105, n. 1, p. 81 - 87, 2005.

HARKENSEE, D.; BEUTEL, S.; YOUNG, M.; ULBER, R. Development of a fast spectroscopic enzyme assay for on-site measurement of total polyphenol content in grapes and wine. *Journal Analytical and Bioanalytical Chemistry*. v. 384, n. 4, p. 1013 - 1018, 2006.

Horacek, J.; Skladal, P. Improved direct piezoelectric biosensors operating in liquid solution for the competitive label-free immunoassay of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid. *Analytica Chimica Acta*. v. 347, n. 1-2, p. 43 - 50, 1997.

IEEE-EMBS. Preview of Abstracts Symposium on Biosensors. *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*. v. BME-31, n. 8, 1984. Disponível em: <<http://ieeexplore.ieee.org/iel5/10/4121889/04121899.pdf?isnumber=4121889&prod=JNL&arnumber=4121899&arSt=580&ared=584&arAuthor=>>>. Acesso em: 27 abr. 2008.

IVANOV, A.; EVTGYN, G.; BUDNIKOV, H.; RICCI, F.; MOSCONE, D.; PALLESCHI, G. Cholinesterase sensors based on screen-printed electrodes for detection of organophosphorus and carbamic pesticides. *Analytical & Bioanalytical Chemistry*. v. 377, n. 7, p. 624 - 631, 2003.

KAFI, A. K. M.; LEE, D-Y.; PARK, S-H.; KWON, Y-S. Potential application of hemoglobin as an alternative to peroxidase in a phenol biosensor. *Thin Solid Films*. v. 516, n. 9, p. 2816 - 2821, 2008.

- KARUBE, I.; MATSUNAGA, T.; MITSUDA, S.; SUZUKI, S. Microbial electrode BOD sensors. *Biotechnology and Bioengineering*. v. 19, p. 1535 - 1547, 1977.
- KIM, M. N.; KWON, H. S. Biochemical oxygen demand sensor using *Serratia marcescens* LSY 4. *Biosensors & Bioelectronics*. v. 14, n. 1, p. 1 - 7, 1999.
- KOENIG, A.; ZABOROSCH, C.; SPENER, F. Microbial sensors for PAH in aqueous solution using solubilizers. In: GOTTLIEB, J.; HOTZL, H.; HUCK, K.; NIESSNER, R. (eds.). *Field screening Europe*. Dordrecht: Kluwer Academic, 1997. p. 203 - 206.
- KÖHLER, S.; BELKIN, S.; SCHMID, R. D. Reporter gene bioassays in environmental analysis. *Fresenius Journal of Analytical Chemistry*. v. 366, n. 6-7, p. 769 - 779, 2000.
- LANGE, I. G.; DAXENBERGER, A.; SCHIFFER, B.; WITERS, H.; IBARRETA, D.; MEYER, H. H. D. Sex hormones originating from different livestock production systems: fate and potential disrupting activity in the environment. *Analytica Chimica Acta*. v. 473, n. 1-2, p. 27 - 37, 2002.
- LAZCKA, O.; DEL CAMPO, F. J.; MUNOZ, F. X. Pathogen detection: a perspective of traditional methods and biosensors. *Biosensors & Bioelectronics*. v. 22, n. 7, p. 1205 - 1217, 2007.
- LEEJARV, A.; IVASK, A.; VÍRTA, M.; KAHRU, A. Analysis of bioavailable phenols from natural samples by recombinant luminescent bacterial sensors. *Chemosphere*. v. 64, n. 11, p. 1910 - 1919, 2006.
- LEHMANN, M.; CHAN, C.; LO, A. G. M.; TAG, K.; KUNZE, G.; RIEDEL, K.; GRUENDIG, B.; RENNEBERG, R. Measurement of biodegradable substances using the salt-tolerant yeast *Arxula adenivorans* for a microbial sensor immobilized with poly(carbamoyl)sulfonate (PCS) Part II: application of the novel biosensor to real samples from coastal and island regions. *Biosensors & Bioelectronics*. v. 14, n. 3, p. 295 - 302, 1999.
- LEVIN, G. V.; HEIM, A. H. Gulliver and Diogenes – exobiological antitheses. *Life Sciences and Space Research*. v. 3, p. 105 - 119, 1965.
- LÓPEZ-DE-ALDA, M. J.; BARCELÓ, D. Determination of steroid sex hormones and related synthetic compounds considered as endocrine disrupters in water by fully automated on-line solid-phase extraction–liquid chromatography–diode array detection. *Journal of Chromatography A*. v. 911, n. 2, p. 203 - 210, 2001.
- MAFFIA, G. M.; DAVIS, J. *Bi-phasic collagen for the extraction of metals from contaminated waters*. 2001. Disponível em: <<http://muse.widener.edu/soengr/srprojects2001.htm>>. Acesso em: 15 mar. 2008.

- MALLAT, E.; BARCELÓ, D.; BARZEN, C.; GAUGLITZ, G.; ABUKNESA, R. Immunosensors for pesticide determination in natural waters. *Trends in Analytical Chemistry*. v. 20, n. 3, p. 124 - 132, 2001.
- MAKI, W. C.; MISHRA, N. N.; CAMERON, E. G.; FILANOSKI, B.; RASTOGI, S. K.; MAKI, G. K. Nanowire-transistor based ultra-sensitive DNA methylation detection. *Biosensors and Bioelectronics*. v. 23, n. 6, p. 780 - 787, 2008.
- MARCHESINI, G. R.; KOOPAL, K.; MEULENBERG, E.; HAASNOOT, W.; IRTH, H. Spreeta-based biosensor assays for endocrine disruptors. *Biosensors and Bioelectronics*. v. 22, n. 9-10, p. 1908 - 1915, 2007.
- MARCHESINI, G. R.; MEIMARIDOU, A.; HAASNOOT, W.; MEULENBERG, E.; ALBERTUS, F.; MIZUGUCHI, M.; TAKEUCHI, M.; IRTH, M.; MURK, A. J. Biosensor discovery of thyroxine transport disrupting chemicals. *Toxicology and Applied Pharmacology*. v. 232, n. 1, p. 150 - 160, 2008.
- MARCO, M. P.; BARCELÓ, D. Environmental applications of analytical biosensors: Environmental applications. *Measurement Science & Technology*. v. 7, n. 11, p. 1547 - 1562, 1996.
- MARQUES, P. R. B. O.; NUNES, G. S.; SANTOS, T. C. R.; ANDREESCU, S.; MARTY, J. L. Comparative investigation between acetylcholinesterase obtained from commercial sources and genetically modified *Drosophila melanogaster*. Application in amperometric biosensors for methamidophos pesticide detection. *Biosensors and Bioelectronics*. v. 20, n. 4, p. 825 - 832, 2004.
- MARRAZZA, G.; CHIANELLA, I.; MASCINI, M. Disposable DNA electrochemical biosensors for environmental monitoring. *Analytica Chimica Acta*. v. 387, n. 3, p. 297 - 307, 1999.
- MIRVISH, S. S. Role of N-nitroso compounds (NOC) and N-nitrosation in etiology of gastric, esophageal, nasopharyngeal and bladder cancer and contribution to cancer of known exposures to NOC. *Cancer Letters*. v. 93, n. 1, p. 17 - 48, 1995.
- MOORCROFT, M. J.; DAVIS, J.; COMPTON, R. G. Detection and determination of nitrate and nitrite: a review. *Talanta*. v. 54, n. 5, p. 785 - 803, 2001.
- MORALES, M. D.; MORANTE, S.; ESCARPA, A.; GONZÁLEZ, M. C.; REVIEJO, A. J.; PINGARRÓN, J. M. Design of composite amperometric enzyme electrode for the control of the benzoic acid content in food. *Talanta*. v. 57, n. 6, p. 1189 - 1198, 2002.

NAKAMURA, H.; KARUBE, I. Current research activity in biosensors. *Analytical & Bioanalytical Chemistry*. v. 377, n. 3, p. 446 - 468, 2003.

NATARAJAN, A.; MOLNAR, P.; SIEVERDES, K.; JAMSHIDI, A.; HICKMAN, J. J. Microelectrode array recordings of cardiac action potentials as a high throughput method to evaluate pesticide toxicity. *Toxicology in Vitro*. v. 20, n. 3, p. 375 - 381, 2006.

OMURA, T.; KYIONO, M.; PAN-HOU, H. Development of a specific and sensitive bacteria sensor for detection of mercury at picomolar levels in environment. *Journal of Health Science*. v. 50, n. 4, p. 379 - 383, 2004.

PARELLADA, J.; NARVÁEZ, A.; LÓPEZ, M. A.; DOMÍNGUEZ, E.; FERNÁNDEZ, J. J.; PAVLOV, V.; KATAKIS, I. Amperometric immunosensors and enzyme electrodes for environmental applications. *Analytica Chimica Acta*. v. 362, n. 1, p. 47 - 57, 1998.

PATEL, P. D. (Bio)sensors for measurement of analytes implicated in food safety: a review. *Trends Analytical Chemistry*. v. 21, n. 2, p. 96 - 115, 2002.

PILLON, A.; SERVANT, N.; VIGNON, F.; Balaguer, P.; NICOLAS, J. C. In vivo bioluminescence imaging to evaluate estrogenic activities of endocrine disrupters. *Analytical Biochemistry*. v. 340, n. 2, p. 295 - 302, 2005.

RAMANATHAN, S.; ENSOR, M.; DAUNERT, S. Bacterial biosensors for monitoring toxic metals. *Trends in Biotechnology*. v. 15, n. 12, p. 500 - 506, 1997.

REN, S.; FRYMIER, P. D. Toxicity of metals and organic chemicals evaluated with bioluminescence assays. *Chemosphere*. v. 58, n. 5, p. 543 - 550, 2005.

RESHETILOV, A. N.; SEMENCHUK, I. N.; ILIASOV, P. V.; TARANOVA, L. A. The amperometric biosensor for detection of sodium dodecyl sulfate. *Analytica Chimica Acta*. v. 347, n. 1-2, p. 19 - 26, 1997.

RIETHER, K. B.; DOLLARD, M-A.; BILLARD, P. Assessment of heavy metal bioavailability using *Escherichia coli* zntAp::lux and copAp::lux-based biosensors. *Applied Microbiology Biotechnology*. v. 57, n. 5-6, p. 712 - 716, 2001.

RODRIGUEZ-MOZAZ, S.; MARCO, M. P.; ALDA, M. J. L.; BARCELÓ, D. Biosensors for environmental monitoring of endocrine disruptors: a review article. *Analytical & Bioanalytical Chemistry*. v. 378, n. 3, p. 588 - 598, 2004.

_____. Biosensors for environmental monitoring – A global perspective. *Talanta*. v. 65, n. 2, p. 291 - 297, 2005.

_____. Biosensors as useful tools for environmental analysis and monitoring. *Analytical & Bioanalytical Chemistry*. v. 386, n. 4, p. 1025 - 1041, 2006.

RON, E. Z. Biosensing environmental pollution. *Current Opinion in Biotechnology*. v. 18, n. 3, p. 252 - 256, 2007.

SAKAGUCHI, T.; MORIOKA, Y.; YAMASAKI, M.; IWANAGA, J.; BEPPU, K.; MAEDA, H.; MORITA, Y.; TAMIYA, E. Rapid and onsite BOD sensing system using luminous bacterial cells-immobilized chip. *Biosensors and Bioelectronics*. v. 22, n. 7, p. 1345 - 1350, 2007.

SCHIPPER, E. F.; RAUCHALLES, S.; KOOYMAN, R. P. H.; HOCK, B.; GREVE, J. The waveguide Mach-Zender interferometer as atrazine sensor. *Analytical Chemistry*. v. 70, n. 6, p. 1192 - 1197, 1998.

SCHULZE, H.; MUENCH, S. B.; VILLATTE, F.; SCHMID, R. D.; BACHMANN, T. T. Insecticide detection through protein engineering of *Nippostrongylus brasiliensis* acetylcholinesterase B. *Analytical Chemistry*. v. 77, n. 18, p. 5823 - 5830, 2005.

SELIFONOVA, O.; BURLAGE, R.; BARKAY, T. Bioluminescent sensors for detection of bioavailable Hg (II) in the environment. *Applied and Environmental Microbiology*. v. 59, n. 9, p. 3083 - 3090, 1993.

SKLADAL, P.; FIALA, M.; KREJCI, J. Detection of pesticides in the environment using biosensors based on cholinesterases. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*. v. 65, n. 1-4, p. 139 - 148, 1996.

SORENSEN, M.; AUTRUP, H.; MOLLER, P.; HERTEL, O.; JENSEN, S. S.; VINZENTS, P.; KNUDSEN, L. E.; LOFT, S. Linking exposure to environmental pollutants with biological effects. *Mutation Research*. v. 544, n. 2-3, p. 255 - 271, 2003.

STOYANOV, J. V.; MAGNANI, D.; SOLIOZ, M. Measurement of cytoplasmatic copper, silver, and gold with a lux biosensor shows copper and silver, but not gold, efflux by the CopA ATPase of *Escherichia coli*. *FEBS Letters*. v. 546, n. 2, p. 391 - 394, 2003.

TARANOVA, L.; SEMENCHUKA, I.; MANOLOVA, T.; ILIASOV, P.; RESHETILOV, A. Bacteria-degraders as the base of an amperometric biosensor for detection of anionic surfactants. *Biosensors & Bioelectronics*. v. 17, n. 8, p. 635 - 640, 2002.

TARLEY, C. R. T.; SOTOMAYOR, M. D. T.; KUBOTA, L. T. Polímeros biomiméticos em química analítica. Parte 1: preparo e aplicações de MIP (“Molecularly Imprinted Polymers”) em técnicas de extração e separação. *Química Nova*. v. 28, n. 6, p. 1076 - 1086, 2005.

- VAKUROV, A.; SIMPSON, C. E.; DALY, C. L.; GIBSON, T. D.; MILLNER, P. A. Acetylcholinesterase-based biosensor electrodes for organophosphate pesticide detection: I. Modification of carbon surface for immobilization of acetylcholinesterase. *Biosensors and Bioelectronics*. v. 20, n. 6, p. 1118 - 1125, 2004.
- VERMEIR, S.; HERTOOG, M. L. A. T. M.; SCHENK, A.; BEULLENSA, K.; NICOLAI, B.; LAMMERTYNA, J. Evaluation and optimization of high-throughput enzymatic assays for fast L-ascorbic acid quantification in fruit and vegetables. *Analytica Chimica Acta*. v. 618, n. 1, p. 94 - 101, 2008.
- WHO. *Public health impact of pesticides used in agriculture*. Geneve: The World Health Organization, 1990. 128p.
- XAVIER, M. P.; VALLEJO, B.; MARAZUELA, M. D.; MORENO-BONDI, M. C.; BALDINI, F.; FALAI, A. Fiber optic monitoring of carbamate pesticides using porous glass with covalently bound chlorophenol red. *Biosensors & Bioelectronics*. v. 14, n. 12, p. 895 - 905, 2000.
- YOKOYAMA, K.; IKEBUKURO, K.; TAMIYA, E.; KARUBE, I.; ICHIKI, N.; ARIKAWA, Y. Highly sensitive quartz-crystal immunosensors for multisample detection of herbicides. *Analytica Chimica Acta*. v. 304, n. 2, p. 139 - 145, 1995.

Recebido em: 19/08/2008

Aprovado em: 08/12/2008