



**CAPTAR**  
ciência e ambiente para todos

volume 4 • número 1 • p 1-12

## **Biossensores com nanotubos de carbono para aplicações clínicas: avanços tecnológicos**

A associação entre nanotecnologia e cuidados de saúde tem vindo a proporcionar o desenvolvimento de novas tecnologias mais eficientes, rápidas e úteis no diagnóstico, tratamento e prevenção de qualquer doença. Nesta gama de tecnologias, os biossensores com nanotubos de carbono são dispositivos que têm sido desenvolvidos e utilizados nos últimos anos, nomeadamente devido à sua alta sensibilidade, especificidade molecular, rapidez de análise, baixo custo e facilidade de utilização. Este trabalho pretende divulgar, numa visão geral e atualizada, algumas tecnologias emergentes sob a forma de biossensores com nanotubos de carbono que são implementadas na área clínica, principalmente para a deteção de marcadores tumorais e de glucose (analitos associados a duas das doenças mais comuns no mundo, cancro e diabetes). Para além disso, conceitos associados ao tema discutido são esclarecidos com enquadramento na síntese, propriedades e áreas de aplicação dos nanotubos de carbono.

### **Palavras-chave**

biossensores  
nanotecnologia  
nanotubos de carbono  
saúde

Celine IL Justino<sup>1\*</sup>

Teresa AP Rocha-Santos<sup>1,2</sup>

Armando C Duarte<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Química e CESAM,  
Universidade de Aveiro, Aveiro, Portugal

<sup>2</sup> ISEIT/Viseu, Instituto Piaget, Viseu,  
Portugal

\* celinejustino@ua.pt

**ISSN 1647-323X**

## INTRODUÇÃO

A investigação em nanotecnologia pretende estudar e desenvolver materiais e dispositivos à nano-escala, ou seja, em dimensões entre 1 e 100 nm, sendo que 1 nm é igual a  $1 \times 10^{-9}$  m, ou seja um milionésimo de milímetro ou um bilionésimo do metro.

Em associação com a nanotecnologia, as tecnologias microeletrónicas desenvolvidas pela nanofabricação proporcionam a miniaturização de circuitos e sistemas eletrónicos que levam ao desenvolvimento de novos e avançados dispositivos para deteção molecular (Carrara, 2010), como por exemplo, biossensores implantáveis para o controlo de glucose no sangue (Cash e Clark, 2010) e biochips para deteção do ADN em amostras sintéticas (Stagni et al., 2007). Tratam-se por biossensores, dispositivos à nano-escala que convertem um evento biológico (tal como a resposta molecular a uma infeção viral ou bacteriana) num sinal detetável e mensurável.

Num biossensor<sup>1</sup>, tal como está exemplificado na Figura 1, existe um componente recetor, como enzimas, ácidos nucleicos ou anticorpos, que é responsável por reconhecer a molécula que se pretende detetar (analito). Quando o recetor se liga à molécula de interesse, ocorre uma reação que é convertida por um terceiro componente (o transdutor) num sinal mensurável, uma vez que surge uma perturbação bioquímica através da reação ocorrida tal como transferência de calor, mudança de distribuição de cargas elétricas, movimento de eletrões, emissão de luz. O sinal é usado para interpretar os dados obtidos por um biossensor.

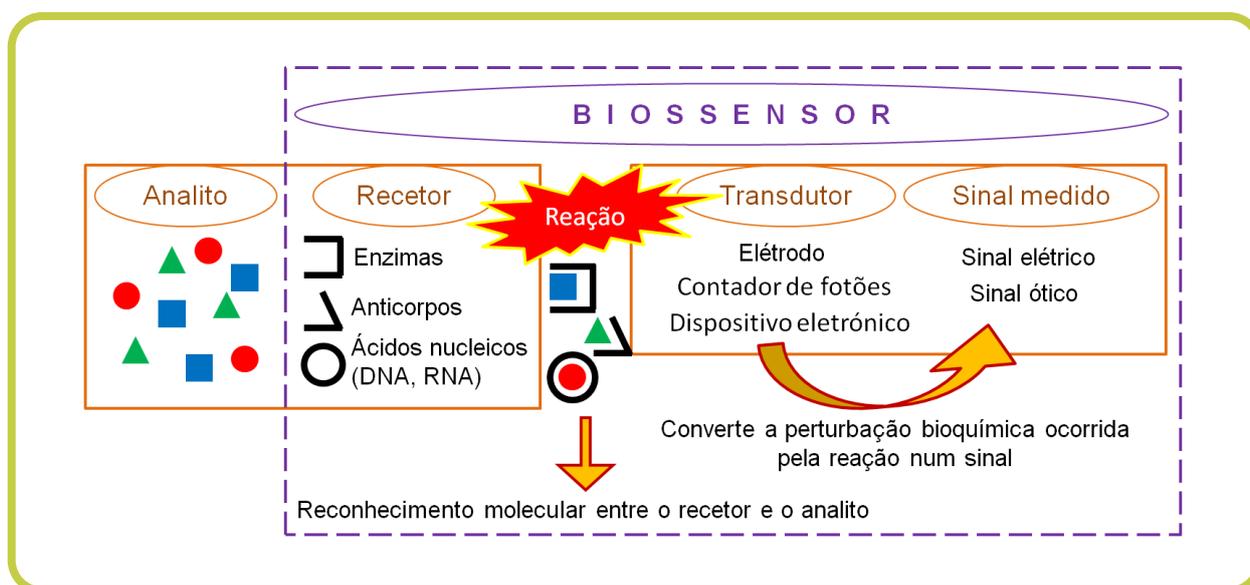


FIGURA 1: Esquema geral do funcionamento de um biossensor.

Na família dos nanomateriais, os nanotubos de carbono (CNT, do inglês *carbon nanotubes*), representados na Figura 2c, são os mais utilizados em diversas tecnologias e dispositivos como transdutores para a melhoria dos sistemas analíticos, devido à sua grande área superficial, elevada condutividade elétrica e excelentes propriedades de transferência de eletrões. Além disso, os CNT podem ser funcionalizados com

<sup>1</sup> Biossensor – é um dispositivo usado para a deteção de analitos e que combina um componente biológico (por exemplo, enzimas ou anticorpos) para reconhecimento dos analitos e um componente físico-químico.

grupos funcionais específicos tais como a hidroxila (-OH) ou a carboxila (-COOH), alargando a gama das suas aplicações, devido à melhoria das propriedades pela incorporação desses grupos funcionais (Katz e Wilner, 2004). Exemplos podem ser dados quanto à importância dos CNT funcionalizados a aplicações medicinais, como por exemplo no diagnóstico e tratamento de cancro, doenças infecciosas e distúrbios nervosos centrais (Zhang et al., 2010) e, para além disso, em aplicações biológicas, por exemplo, na distribuição controlada de agentes terapêuticos, devido à elevada capacidade dos CNT em penetrar em membranas biológicas com uma toxicidade relativamente baixa (Elhissi et al., 2012). Quando aplicados a dispositivos eletrónicos, os CNT também promovem uma melhoria importante na sensibilidade do sensor, por exemplo, quando aplicados à terapia de doenças virais e ao diagnóstico viral, contribuindo para a rápida deteção de agentes patogénicos humanos e animais.

Segundo o último relatório de mercado global sobre os CNT (Patel, 2011), verificou-se um aumento da produção de CNT devida sobretudo ao crescente desenvolvimento de dispositivos associados à saúde. Entre eles, encontram-se os sensores eletroquímicos<sup>2</sup> que têm sido cada vez mais usados com incorporação de vários tipos de nanomateriais, principalmente CNT. Além disso, melhorias na automação, miniaturização e análise multiplexada, assim como melhorias no seu desempenho analítico têm sido tomadas em conta para o progresso dos sistemas de saúde. Por exemplo, a deteção de doenças numa fase precoce é um dos objetivos no desenvolvimento e aperfeiçoamento dos sensores com CNT, visando melhorar a sua sensibilidade, rapidez de resposta, redução do volume de amostra, apostando também em sistemas não-invasivos. Por outro lado, estas nanotecnologias podem permitir a deteção de marcadores específicos em baixas concentrações e em amostras complexas, tais como o soro humano.

Desta forma, com este artigo pretende-se discutir o modo como os biossensores com CNT contribuem para os avanços dos cuidados de saúde, identificando as aplicações e desempenho analítico dos vários sensores na deteção dos analitos de interesse clínico. O desenvolvimento de biossensores será mais discutido para diagnóstico das doenças como cancro e diabetes, com alguns exemplos práticos, uma vez que são as duas doenças que mais vítimas mortais fazem no mundo. Conceitos-base associados às propriedades e caracterização dos CNT assim como aplicações e importância clínica dos sensores fabricados também serão abordados.



## PROPRIEDADES, SÍNTESE E ÁREAS DE APLICAÇÃO DOS CNT

Os CNT, representados na Figura 2c, caracterizam-se pelo enrolamento de uma folha de grafeno (Figura 2a), que é um material constituído apenas por átomos de carbono arranjados hexagonalmente. Para comparação, a grafite (Figura 2b), que é o constituinte dos clássicos lápis, é um material constituído por várias folhas de grafeno empilhadas.

Os CNT têm propriedades químicas, físicas, mecânicas e eletrónicas muito interessantes tais como:

- uma configuração tubular, que permite o isolamento de eletrões em torno da circunferência do CNT, proporcionando uma condutividade elétrica notável;

<sup>2</sup> Sensores eletroquímicos – são dispositivos capazes de detetar uma substância através de um mecanismo eletroquímico sendo o sinal elétrico obtido proporcional à concentração da substância detetada.

- um diâmetro pequeno e comprimento elevado, que proporcionam uma superfície muito grande em relação ao volume, conduzindo a excelentes propriedades eletrônicas;
- a satisfação de todas as ligações C-C covalentes, promovendo a estabilidade mecânica, térmica e química; e
- uma elevada resistência mecânica e resistência à rutura.

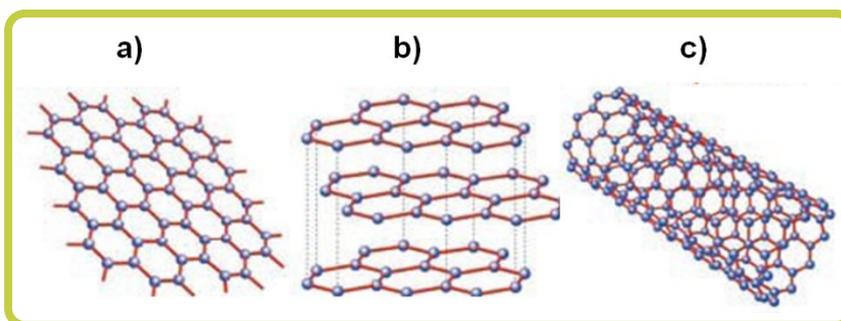


FIGURA 2: Representação esquemática da estrutura a) do grafeno, b) da grafite, e c) dos CNT (<http://www.infoescola.com/compostos-quimicos/grafeno/>).

Uma vez que a nanotecnologia é um domínio da ciência multidisciplinar, isto é, que evolui em associação com várias outras áreas de investigação, tais como Ciência dos Materiais, Química, Física e Engenharia, as propriedades dos CNT são responsáveis por inúmeras aplicações nessas áreas, tais como dispositivos eletrônicos (biossensores e biochips), emissores de elétrons para televisões, dispositivos de armazenamento de energia (baterias avançadas e células fotovoltaicas), dispositivos de distribuição controlada de agentes terapêuticos tais como péptidos, proteínas, ácidos nucleicos e fármacos (devido à capacidade dos CNT para penetrar nas células) e como reforço de compósitos de natureza cerâmica (devido à rigidez dos CNT). No entanto, todas estas propriedades, assim como a qualidade dos CNT são afetadas pelas condições experimentais utilizadas no processo de fabricação dos CNT. Geralmente, todos os métodos de produção requerem nanopartículas de metais de transição, tais como ferro (Fe), cobalto (Co) e níquel (Ni), para funcionar como “sementes”, também conhecidas como catalisadores. Quando os catalisadores estão em contacto com carbono gasoso ou uma fonte de hidrocarbonetos, o carbono resultante deposita-se na superfície da partícula catalisadora. Depois, a difusão de átomos de carbono ocorre rapidamente a partir da superfície do catalisador, iniciando o crescimento dos CNT.

O diâmetro das nanopartículas catalisadoras define a natureza do CNT, sendo os tubos individuais denominados CNT de parede única (SWCNT, do inglês *single-walled carbon nanotubes*) com diâmetros entre 0.4 e 3 nm ou, um grupo concêntrico de CNT com um eixo comum que constitui os CNT de paredes múltiplas CNT (MWCNT, do inglês *multi-walled carbon nanotubes*) com diâmetros entre 1.4 e 100 nm. Por sua vez, o diâmetro dos CNT pode ser controlado em função da temperatura de reação. Além disso, outros parâmetros de tecnologias de processamento, tais como a concentração de metal, a pressão de gás, e do tipo de gás podem afetar a qualidade e quantidade de nanotubos sintetizados.

Atualmente, os SWCNT e MWCNT são sintetizados por processos de alta temperatura que são métodos físicos para a conversão de carbono em CNT, e por deposição química em fase de vapor (CVD) que é realizada a temperaturas mais baixas e pressão atmosférica. Os processos de alta temperatura (descarga de arco elétrico e ablação por laser) fornecem CNT com estrutura mais perfeita, mas com presença de grandes quantidades de impurezas; estes CNT têm de ser dispersos, purificados e funcionalizados antes de serem utilizados. Além disso, e dependendo das suas potenciais aplicações, os CNT podem ser separados por tamanho, pelo diâmetro ou em nanotubos metálicos e semicondutores para dar ênfase às suas propriedades. No entanto, a CVD é o processo preferido para a produção de CNT em larga escala (Patel,

2011) pois é um processo de baixa temperatura o que permite fácil operação, controlo do crescimento, eficiência energética e elevado rendimento e pureza.

A produção de CNT tem aumentado nos últimos anos sendo que 28% do mercado em nanomateriais está associada a CNT (Patel, 2011). O mercado global de CNT em 2010 sugere que a capacidade de produção anual foi de cerca de 2500 t para os 10 maiores produtores mundiais de SWCNT e MWCNT, onde 44%, 29% e 24% dessa produção foi contabilizada na Ásia-Pacífico, América do Norte e União Europeia, respetivamente (Patel, 2011). De acordo com o mesmo relatório, essa produção deverá chegar a 12800 t em 2016, demonstrando a relevância dos CNT em várias aplicações.



## **BIOSENSORES COM CNT PARA APLICAÇÕES CLÍNICAS: AVANÇOS TECNOLÓGICOS**

Atualmente, a evolução dos dispositivos eletrónicos para aplicações clínicas está direcionada para a miniaturização e análise multiplexada através dos avanços contínuos das tecnologias de nanofabricação. A miniaturização permite a utilização de pequenos volumes de amostra em sensores contribuindo para reduzir a quantidade de reagentes e tempos de análise. Por sua vez, a análise multiplexada permite que medições de múltiplos parâmetros sejam fornecidas pelos chips/sensores; no entanto, a desvantagem é a interpretação complicada dos grandes conjuntos de dados resultantes. A fim de facilitar estas abordagens, a incorporação de nanomateriais em vários biossensores eletroquímicos tem sido uma das possibilidades para o progresso tecnológico na área da saúde; por sua vez, as técnicas de microfabricação permitem a aplicação de dispositivos de baixo custo.

A aplicação de CNT em dispositivos na área da saúde tem sido considerado para a análise de analitos biológicos tais como ADN, glucose, proteínas e vírus. Esta área de investigação tem-se expandido devido ao aumento da procura de dispositivos para diagnósticos rápidos. No entanto, melhorias analíticas nos biossensores são ainda necessárias na deteção de marcadores tumorais para o diagnóstico de doenças cancerígenas e a deteção da glucose para o diagnóstico da diabetes, as quais constituem duas das grandes áreas de investigação na área da saúde.

Nas subseções seguintes, serão identificadas as aplicações dos biossensores com CNT para a monitorização de glucose, através de dispositivos implantáveis e descartáveis, e para a determinação de marcadores tumorais através de tecnologias diversas, isto é, dispositivos de microfluidos e imunossensores. Alguns biossensores para a deteção de vírus também serão discutidos.

### **Dispositivos implantáveis e descartáveis como biossensores para a determinação de glucose**

A diabetes *mellitus* é uma doença que tem origem num metabolismo de desordem e que provoca níveis de glucose anormais no sangue, afetando cerca de 346 milhões de pessoas em todo o mundo segundo estatísticas da Organização Mundial de Saúde (OMS, 2011). Desta forma, os dispositivos para determinação precisa e rápida de glucose têm desempenhado um papel essencial na auto-monitorização dos níveis de glucose em pacientes. Como a doença de diabetes não tem tratamento, torna-se importante o desenvolvimento das tecnologias de monitorização de glucose para o controlo dos níveis sanguíneos, de forma a reduzir possíveis complicações associadas a esta doença. Desta forma, a monitorização contínua de glucose tem muito interesse no diagnóstico clínico, uma vez que contribui para o melhor controlo

glicémico e identificação precoce de hipoglicemia ou hiperglicemia. Atualmente, os sistemas de monitorização contínua de glucose fornecem uma determinação de glucose intersticial, sendo sistemas de sensores descartáveis baseados em eléctrodos revestidos com enzimas e inseridos no tecido subcutâneo (Heo e Takeuchi, 2013). Através da correlação entre a corrente eléctrica produzida e o nível de glucose, os dispositivos são capazes de indicar as tendências da variação de glucose (sinal). A Figura 3 mostra um sensor subcutâneo para monitorização contínua de glucose, cujos níveis são registados continuamente.

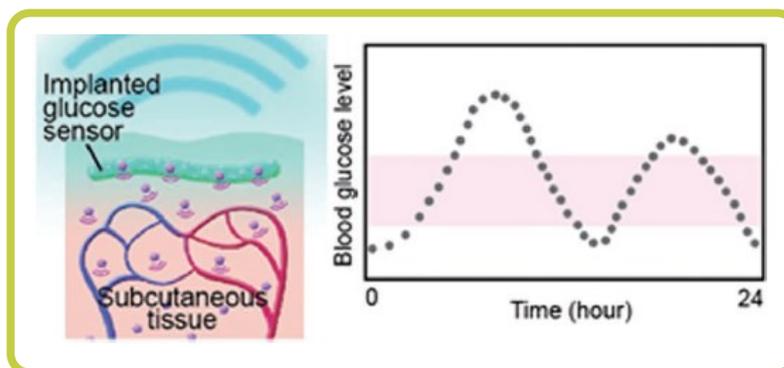


FIGURA 3: Representação esquemática de um sensor subcutâneo para monitorização de glucose, e um tipo de registo de sinal, que representa os níveis de glucose ao longo do tempo (Heo e Takeuchi, 2013).

Apesar das suas inúmeras vantagens, os custos de cada dispositivo é elevado, uma vez que cobre o custo inicial de cada dispositivo individual (constituído por um sensor descartável, um transmissor e um recetor) e os custos adicionais dos sensores descartáveis. Por outro lado, uma outra limitação está relacionada com a restrição do uso dos sistemas de monitorização contínua de glucose a adultos pois podem ser encontradas dificuldades no controlo glicémico por crianças pequenas (principalmente com idades entre os 4 e 9 anos) como demonstrado recentemente por Mauras et al. (2012).

O desenvolvimento de biossensores implantáveis, com base em princípios eletroquímicos, para a monitorização contínua de glucose em pacientes tem sido identificada como um avanço na área da saúde. Nesta classe de biossensores, os dispositivos implantáveis para distribuição de agentes terapêuticos têm constituído um profundo interesse médico. A investigação tem cada vez mais seguido os processos de incorporação de SWCNT e MWCNT como eléctrodos miniaturizados para funcionar como biossensores implantáveis, devido às suas elevadas áreas superficiais e ideais propriedades electrocatalíticas. O trabalho que iniciou esta crescente investigação foi desenvolvido pela equipa do Professor Strano que desenvolveu o primeiro biossensor implantável com SWCNT para permitir aos diabéticos a monitorização contínua dos níveis de glucose, sem terem que tirar a gota de sangue, como normalmente se procede (Barone et al., 2005). A Figura 4a

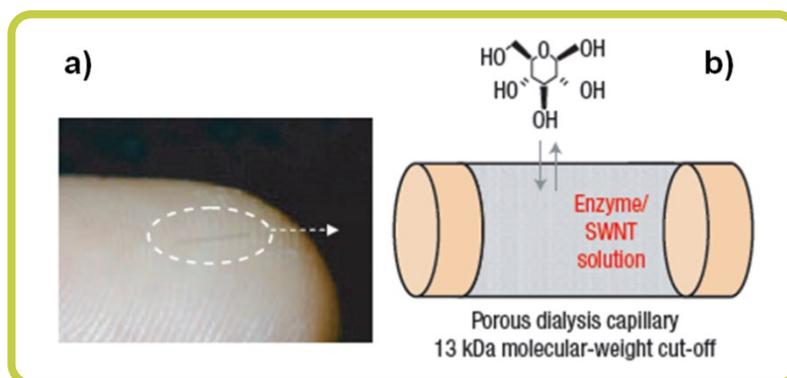


FIGURA 4: Detecção de glucose com um biossensor ótico com CNT. a) Biossensor microcapilar dentro de um dedo de paciente; b) Representação da reacção entre os SWCNT funcionalizados com enzima e a glucose ([http://www.nature.com/nmat/journal/v4/n1/fig\\_tab/nmat1276\\_F5.html](http://www.nature.com/nmat/journal/v4/n1/fig_tab/nmat1276_F5.html)).

mostra o biossensor implantado no dedo de um paciente, e a Figura 4b mostra o princípio de detecção da glucose. O biossensor é um microtubo de vidro que é coberto por uma película de SWCNT com enzima glucose oxidase. Quando a reacção entre a enzima e a glucose se dá, ocorre uma alteração no brilho do

sensor, ou seja, a fluorescência dos CNT é alterada, e é proporcional à concentração de glucose (Barone et al., 2005).

Por sua vez, Xie et al. (2007) desenvolveu um biossensor amperométrico revestido com MWCNT e nanopartículas de platina, que proporciona um elevado desempenho analítico, ou seja, elevadas sensibilidade e seletividade. No entanto, o desafio associado ao uso de dispositivos implantáveis é como evitar problemas de toxicidade quando os CNT estão em contacto com os pacientes. Embora a toxicidade dos nanomateriais já tenha sido avaliada (Dhawan e Sharma, 2010), provando que os CNT funcionalizados não apresentam efeitos tóxicos quando são testados em células primárias do sistema imune (Dumortier et al. 2006), esta área de investigação está ainda em fase de desenvolvimento, devido à grande variedade de nanomateriais e suas características particulares e devido à atual ausência de normas internacionais sobre a avaliação toxicológica dos CNT. Neste domínio, os dispositivos implantáveis com revestimentos de nanocompósitos (isto é, nanomateriais embebidos numa matriz de polímero<sup>3</sup>) estão a começar a ter sucesso como biossensores para reduzir a adsorção de outros componentes do sangue na superfície do sensor. Estes componentes podem contribuir para a biodegradação do sensor, afetando também a sua estabilidade a longo prazo. Recentemente, foi desenvolvido um biossensor ótico para a deteção de glucose baseado em hidrogel (Barone et al., 2009). O sensor ótico combina os SWCNT com o álcool polivinílico formando uma matriz hidrogel para deteção de glucose. Os hidrogéis são matrizes de polímeros caracterizados por biocompatibilidade, ausência de citotoxicidade e imunogenicidade. Uma vez que os hidrogéis são muito semelhantes aos ambientes fisiológicos, eles tornam-se adequados para incorporação em biossensores *in vivo*, tal como se mostra no trabalho de Lahiff et al. (2010), onde a importância dos CNT e nanoestruturas de polímeros condutores em biossensores foi recentemente estudada. Os materiais compósitos baseados em CNT têm sido sintetizados para combinar as melhores propriedades de cada material como composto individual.

### **Tecnologias para a deteção de marcadores tumorais**

O cancro é considerado como um grupo de doenças que pode afetar vários órgãos, onde uma proliferação anormal e descontrolada das células ocorreu, sendo a principal causa de mortes nos países desenvolvidos (Jemal et al., 2011). O número de casos de cancro cresce continuamente, principalmente devido ao aumento da população mundial e da esperança de vida. Além disso, existe também um aumento da dependência a comportamentos que podem causar cancro (por exemplo, tabaco) principalmente nos países em desenvolvimento (Jemal et al., 2011).

Os marcadores tumorais são indicadores valiosos para o diagnóstico precoce de doenças cancerígenas, que se tornam cruciais para tratamentos iniciais, tornando-se assim ferramentas precisas para o acompanhamento de uma resposta ao tratamento e progressão da doença. Os marcadores tumorais são moléculas biológicas com diversas origens tais como ADN e ARN e proteínas (isto é, hormonas, anticorpos, etc.) que são encontrados em fluídos corporais, por exemplo no sangue, e nos tecidos do corpo (Rasooly e Jacobson, 2006).

---

<sup>3</sup> Polímero – é um composto químico com uma elevada massa molecular que resulta da agregação de unidades estruturais repetidas.

Um diagnóstico preciso de doenças cancerígenas tem de avaliar um grande número de marcadores tumorais. Infelizmente, na investigação, a determinação multiplexada, ou seja, a deteção de vários marcadores ainda tem obstáculos tecnológicos, os quais ainda não foram completamente resolvidos uma vez que muitas proteínas marcadoras são indicativas de mais de uma doença, tal como a interleucina-6 (IL-6) que está associada à próstata, ao pulmão e a tumores renais, entre outros (Soper et al., 2006).

O diagnóstico do cancro com base em sistemas biossensores fornece um rastreio mais fácil para a deteção precoce de cancro e melhor prognóstico (Rasooly e Jacobson, 2006) através de procedimentos automatizados e integrados. Nesta área, a nanotecnologia apresenta novas perspectivas para a deteção do cancro com vantagens associadas aos biossensores com nanomateriais.

No entanto, a aplicação dos biossensores em análise de rotina do cancro tem requisitos particulares: um biossensor para a deteção de marcadores tumorais deve não só proporcionar informação sobre a presença de um tumor ou cancro, mas também deve ser capaz de prever o estado de desenvolvimento do tumor, tornando-se uma das questões mais complexas e desafiantes nessa área de investigação. A partir destas considerações, dois tipos de tecnologias através de biossensores com CNT para a deteção de marcadores tumorais podem ser identificadas, isto é, as tecnologias baseadas no princípio de microfluidos, e outras com base em imunossensores, que serão discutidas nas subsecções seguintes.

• **Tecnologias de microfluidos**

Ao longo de vários anos, a integração de tecnologias de microfluidos como biossensores foi considerado um dos desafios na área da saúde, mas atualmente, os dispositivos de microfluidos são considerados estratégias promissoras para o diagnóstico de doenças virais, como estudado por Gervais et al. (2011) devido à sua portabilidade, baixo tempo de processamento da amostra e flexibilidade. Estes autores definiram o dispositivo ideal como um sistema que "quantitativamente deteta vários analitos, em poucos minutos, com uma sensibilidade femtomolar e 1 µL de fluido corporal e que enviam os resultados para um serviço eletrónico".

Exemplos de chips com princípio de microfluidos são apresentados na Figura 5, nos quais gotas de sangue são colocadas numa das extremidades do sensor (Figura 5a) ou introduzidas por um canal (Figura 5b), e através de um fluxo, o fluido é encaminhado para a zona de deteção;

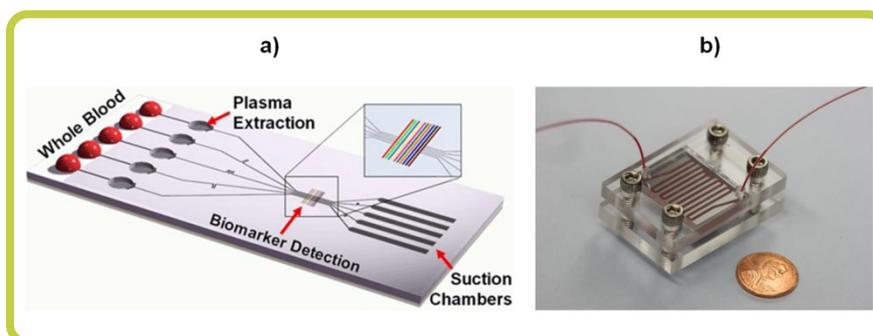


FIGURA 5: Chips com tecnologia de microfluidos ([http://www.medgadget.com/2011/03/new\\_microfluidic\\_technology\\_may\\_lead\\_to\\_miniaturized\\_diagnostic\\_devices.html](http://www.medgadget.com/2011/03/new_microfluidic_technology_may_lead_to_miniaturized_diagnostic_devices.html); <http://www.sciencedaily.com/releases/2011/03/110307151924.htm>).

no caso do sensor da Figura 5b, os resíduos são extraídos por um segundo canal. Para além disso, a introdução de CNT em sistemas de microfluidos tem recebido uma atenção significativa devido às suas propriedades físicas, elétricas e químicas, como foi estudado por Choong et al. (2008).

As novas tecnologias baseadas em µPAD, isto é, à base de papel com dispositivos de microfluidos incorporados e com MWCNT, foram recentemente propostos para a deteção de marcadores tumorais,

tais como o CA-125 e o CA (Wang et al., 2012). A Figura 6 mostra essa tecnologia tal como é usada (Figura 6a) e com pormenores técnicos do seu interior (Figura 6b).

Neste exemplo, os MWCNT foram modificados por carboxilação e revestidos de quitosano (um polissacarídeo) e através da sua integração com circuitos eletrónicos em papel específico proporcionam um

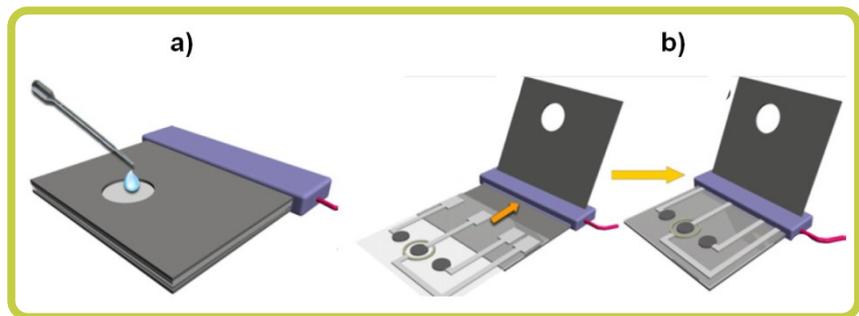


FIGURA 6: Representação esquemática de um  $\mu$ PAD (a) fechado e (b) aberto (Wang et al., 2012).

dispositivo simples de baixo custo, descartável e portátil. Wang et al. (2012) obteve uma gama de valores bastante alargada, o que torna estes dispositivos úteis para a deteção de marcadores tumorais, ou seja, os dispositivos são capazes de detetar o marcador CA125 entre 0.001 e 75 unid./mL e o marcador CA entre 0.05 e 50 ng/ml, sabendo que os níveis normais em amostras de soro humano destes dois marcadores tumorais são 1.7-32 unid./mL e 0-10 ng/mL, respetivamente.

#### • **Imunosensores**

Os imunosensores foram desenvolvidos para a monitorização contínua dos analitos através de dispositivos de baixo custo, automatização completa, portabilidade, reutilização, resposta rápida, alta sensibilidade, exatidão e precisão (Holford et al., 2012). Eles constituem um avanço na investigação dos imunoenaios típicos, tais como o ensaio imunoenzimático clássico (ELISA), que é um teste utilizado nos laboratórios clínicos para quantificar uma determinada substância no sangue através da reação entre essa substância e os recetores (enzimas) que estão imobilizados numa placa, comumente denominada de microplaca de ELISA. Embora a técnica de ELISA seja utilizada para a comparação e validação das técnicas desenvolvidas com base no princípio de imunoreacção, proporcionando bons valores para os limites de deteção, esta técnica apresenta limitações quanto ao elevado tempo de análise, baixa sensibilidade quando os marcadores tumorais estão presentes na gama dos pg/mL, necessidade de grande volume de amostra e dificuldades na medição de diversos marcadores ao mesmo tempo (Rusling et al., 2009). Portanto, os imunosensores são fortemente estudados na investigação do cancro, mais precisamente para a deteção e monitorização de marcadores tumorais.

O antigene<sup>4</sup> específico da próstata (PSA) é um exemplo bem conhecido de marcador tumoral que tem sido utilizado para o diagnóstico e monitorização do cancro da próstata. A Sociedade Americana de Cancro refere que o PSA é o único marcador no soro (com níveis normais entre 0.5 e 2 ng/mL) que é capaz de proporcionar um diagnóstico precoce do cancro da próstata (Smith et al., 2008). O cancro da próstata é cancro mais diagnosticado em homens europeus (Ferlay et al., 2010) correspondendo a 22.2% de todos os casos de cancro, sendo também considerado como uma doença complexa e multifatorial. Yu et al. (2006) foi um dos primeiros a sugerir um imunosensor eletroquímico para a deteção de PSA no soro com base num imunosensor com MWCNT com vários marcadores enzimáticos.

<sup>4</sup> Antigene – é uma molécula estranha ao corpo humano, e que é capaz de iniciar uma reação imunológica, fazendo com que o corpo humano se autodefenda produzindo anticorpos de forma a eliminar esse antigene.

A detecção de PSA com este sensor, em amostras de soro humano, foi comparada com a técnica clássica de ELISA demonstrando a alta precisão dos imunossensores, com uma concentração mínima detetável de 4 pg/mL.

A medição de diversos marcadores num mesmo dispositivo (Figura 7) foi atualmente utilizada para obter uma previsão estatística mais precisa da doença, constituindo um avanço nesta área. Além disso, a detecção múltipla de marcadores contribui para o diagnóstico precoce de cancros, uma vez que as estatísticas de previsão são melhoradas. Um trabalho recente propõe um conjunto de sensores agrupados com SWCNT para medir, simultaneamente, quatro marcadores tumorais responsáveis pelo cancro da próstata: PSA, antigene de membrana específico da próstata (PSMA), plaquetas de factor-4 (PF-4) e IL- 6 (Chikkaveeraiah et al., 2009). Estes sistemas fornecem sensibilidades adequadas dentro dos níveis normais clinicamente relevantes para cada marcador, para além de que a sua medição é em tempo real, o que contribui para a aplicação apropriada como utensilio de diagnóstico. A aplicação de tais imunossensores em amostras de soro humano mostrou uma boa correlação com a metodologia padrão de ELISA.

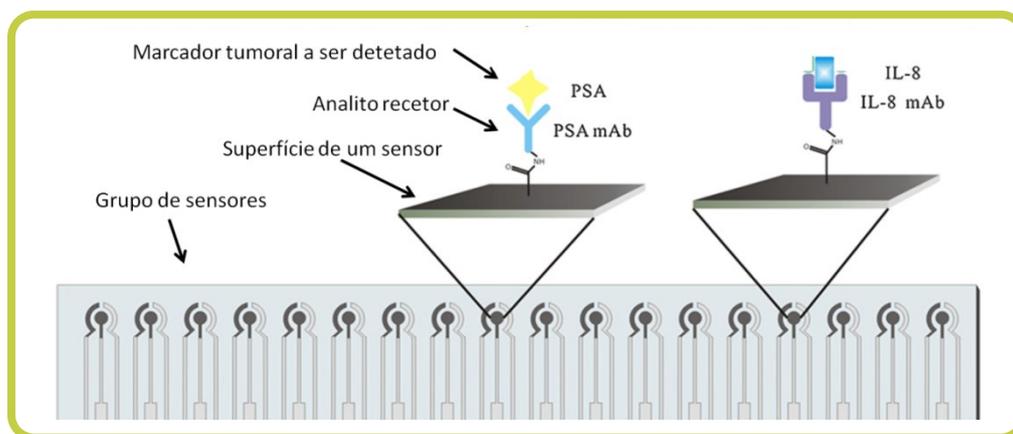


FIGURA 7: Representação esquemática de um conjunto de sensores para a detecção dos marcadores tumorais PSA e IL-8 (Wan et al., 2011).

Outro marcador tumoral, a metaloproteinase de matriz-3 (MMP-3), também foi recentemente detetada em amostras de soro com imunossensores eletroquímicos com base em SWCNT (Munge et al., 2010). Estes marcadores tumorais pertencem a uma família de metaloproteases de zinco que estão associadas à invasão e metástase de células. Munge et al. (2010) obtiveram uma concentração mínima detetável de 7.7 pM com este dispositivo que deteta MMP-3 através de um princípio multi-enzimático, cujas vantagens são o tempo curto de detecção, simplicidade de análise assim como elevada sensibilidade e seletividade para a detecção de MMP-3.

### Biossensores para detecção de vírus

A combinação entre SWCNT e biossensores contribuíram também para a melhoria dos cuidados de saúde no diagnóstico de vírus, ou seja, contribuíram para a detecção rápida e precisa de agentes patogénicos virais humanos e animais.

Nesta área, o teste comum comercialmente disponível para *Haemophilus influenza* (vírus da gripe) consiste em imunotiras (também conhecidas como tiras de membrana imunocromatográficas). Usando a detecção eletroquímica, os limites de detecção podem aumentar até três ordens de grandeza, como foi recentemente referido por Lee et al. (2011), que desenvolveram um biossensor eletroquímico para a detecção de vírus da gripe suína H1N1. O vírus da gripe suína H1N1 é um tipo do vírus que tem sido observado desde meados de 2009 e que foi responsável por doenças respiratórias causando corrimento nasal, falta de ar e letargia. Desta forma, tecnologias avançadas e otimizadas devem ser desenvolvidas para promover o diagnóstico rápido e fiável de tal doença, que tem consequências drásticas para a saúde humana.



## CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPETIVAS FUTURAS

Os biossensores com CNT foram desenvolvidos em muitas áreas de investigação e para uma larga variedade de aplicações, por exemplo, em áreas clínicas e ambientais. Atualmente, a investigação em nanomedicina tem sido desenvolvida com a necessidade de instrumentos mais precisos, eficientes e rápidos para o diagnóstico precoce de qualquer doença.

Os biossensores com CNT para a detecção de marcadores tumorais e de glucose estão no centro de interesse da investigação clínica, de forma a proporcionar melhorias analíticas na detecção do cancro e na monitorização da diabetes. O carácter multidisciplinar da nanomedicina tem proporcionado muitos desafios para a construção de biossensores ideais, uma vez que os biossensores comerciais disponíveis requerem conceitos de eletrónica, química, física, ciência dos materiais e áreas de biologia molecular, entre outros. Por exemplo, a portabilidade de dispositivos e a determinação múltipla são algumas características que devem ser levadas em conta para a comercialização de biossensores na área clínica.

O desenvolvimento crescente das áreas de microfabricação e tecnologias de microfluidos contribuiu para a construção de protótipos interessantes e inovadores em termos de sistemas integrados e automatizados. Uma atenção especial deve ser dada aos novos nanodispositivos, por exemplo, baseados em microfluidos e conhecidos por  $\mu$ PAD, atualmente propostos e otimizados, uma vez que fornecem a análise quantitativa de análise a um baixo custo, abrindo novos horizontes para a melhoria dos biossensores.

---

**agradecimentos** • Este trabalho foi financiado pelo Fundo Europeu de Desenvolvimento Regional (FEDER) no âmbito do Programa Operacional Factores de Competitividade (COMPETE) e por fundos nacionais pela Fundação para a Ciência e a Tecnologia (FCT, Portugal) no âmbito do projeto de investigação CARDIOSENSOR (referências FCOMP-01-0124-FEDER-010902 e PTDC/SAU-BEB/099042/2008). Os autores também agradecem à FCT a atribuição de bolsas de Doutoramento (SFRH/BD/60429/2009) e pós-Doutoramento (SFRH/BPD/65410/2009) através dos fundos atribuídos pelo Quadro de Referência Estratégico Nacional-Programa Operacional Potencial Humano (QREN-POPH) co-financiados pelo Fundo Social Europeu e por fundos nacionais do Ministério da Ciência, Tecnologia e Ensino Superior (MCTES).

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Barone PW, Baik S, Heller DA, Strano MS (2005). Near-infrared optical sensors based on single-walled carbon nanotubes. *Nature Materials* 4: 86-92.
- Barone PW, Yoon H, Ortiz-García R, Zhang J, Ahn J-H, Kim JH, Strano MS (2009). Modulation of single-walled carbon nanotube photoluminescence by hydrogel swelling. *ACS Nano* 3: 3869-3877.
- Carrara S (2010). Nano-bio-technology and sensing chips: new systems for detection in personalized therapies and cell biology. *Sensors* 10: 526-543.
- Cash KJ, Clark HA (2010). Nanosensors and nanomaterials for monitoring glucose in diabetes. *Trends in Molecular Medicine* 16: 584-593.
- Chikkaveeraiah BV, Bhirde A, Malhotra R, Patel V, Gutkind JS, Rusling JF (2009). Single-wall carbon nanotube forest arrays for immunoelectrochemical measurement of four protein biomarkers for prostate cancer. *Analytical Chemistry* 81: 9129-9134.
- Choong C-L, Milne WI, Teo KBK (2008). Review: carbon nanotube for microfluidic lab-on-a-chip application. *The International Journal of Material Forming* 1: 117-125.
- Dhawan A, Sharma V (2010). Toxicity assessment of nanomaterials: methods and challenges. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 398: 589-605.
- Dumortier H, Lacotte S, Pastorin G, Marega R, Wu W, Bonifazi D, Briand J-P, Prato M, Muller S, Bianco A (2006). Functionalized carbon nanotubes are non-cytotoxic and preserve the functionality of primary immune cells. *Nano Letters* 6: 1522-1528.
- Elhissi AMA, Ahmed W, Hassan IU, Dhanak VR, D'Emanuele A (2012). Carbon nanotubes in cancer therapy and drug delivery. *Journal of Drug Delivery* 2012: 837327.
- Ferlay J, Parkin DM, Steliarova-Foucher E (2010). Estimates of cancer incidence and mortality in Europe in 2008. *European Journal of Cancer* 46: 765-781.
- Gervais L, De Rooij N, Delamarche E (2011). Microfluidic chips for point-of-care immunodiagnostics. *Advanced Materials* 23: 151-176.
- Heo YJ, Takeuchi S (2013). Towards smart tattoos: implantable biosensors for continuous glucose monitoring. *Advanced Healthcare Materials* 2: 43-56.
- Holford TR, Davis F, Higson SPJ (2012). Recent trends in antibody based sensors. *Biosensors and Bioelectronics* 34: 12-24.
- Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D (2011). Global cancer statistics. *CA: A Cancer Journal for Clinicians* 61: 69-90.
- Katz E, Wilner I (2004). Biomolecule-functionalized carbon nanotubes: applications in nanobioelectronics. *A European Journal of Chemical Physics and Physical Chemistry* 5: 1084-1104.
- Lahiff E, Lynam C, Gilmartin N, O'Kennedy R, Diamond D (2010). The increasing importance of carbon nanotubes and nanostructured conducting polymers in biosensors. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 398: 1575-1589.
- Lee D, Chander Y, Goyal SM, Cui T (2011). Carbon nanotube electric immunoassay for the detection of swine influenza virus H1N1. *Biosensors and Bioelectronics* 26: 3482-3487.
- Mauras N, Beck R, Xing D, Ruedy K, Buckingham B, Tansey M, White NH, Weinzimer SA, Tamborlane W, Kollman C (2012). A randomized clinical trial to assess the efficacy and safety of real-time continuous glucose monitoring in the management of type 1 diabetes in young children aged 4 to <10 years. *Diabetes Care* 35: 204-210.
- Munge BS, Fisher J, Millord LN, Krause CE, Dowd RS, Rusling JF (2010). Sensitive electrochemical immunosensor for Matrix metalloproteinase-3 based on single-wall carbon nanotubes. *Analyst* 135 (2010) 1345-1350.
- OMS, Estatísticas da Organização Mundial de Saúde, Fact Sheet n°312, World Health Organization, 2011.
- Patel V (2011). Global carbon nanotubes market outlook: industry beckons. *Nanotech Insights* 2: 31-35.
- Rasooly A, Jacobson J (2006). Development of biosensors for cancer clinical testing. *Biosensors and Bioelectronics* 21: 1851-1858.
- Rusling JF, Sotzing G, Papadimitrakopoulos F (2009). Designing nanomaterial-enhanced electrochemical immunosensors for cancer biomarker proteins. *Bioelectrochemistry* 76: 189-194.
- Smith RA, Cokkinides V, Brawley OW (2008). Cancer screening in the United States, 2008: a review of current American Cancer Society guidelines and cancer screening issues. *CA: A Cancer Journal for Clinicians* 58: 161-179.
- Soper SA, Brown K, Ellington A, Frazier B, Garcia-Manero G, Gau V, Gutman SI, Hayes DF, Korte B, Landers JL, Larson D, Ligler F, Majumdar A, Mascini M, Nolte D, Rosenzweig Z, Wang J, Wilson D (2006). Point-of-care biosensor systems for cancer diagnostics/prognostics. *Biosensors and Bioelectronics* 21: 1932-1942.

- Stagni C, Guiducci C, Benini L, Ricco B, Carrara S, Paulus C, Schienle M, Thewes R (2007). A fully electronic label-free dna sensor chip. *Sensors* 7: 577-585.
- Wan Y, Deng W, Su Y, Zhu X, Peng C, Hu H, Peng H, Song S, Fan C (2011). Carbon nanotube-based ultrasensitive multiplexing electrochemical immunosensor for cancer biomarkers. *Biosensors and Bioelectronics* 30: 93-99.
- Wang P, Ge L, Yan M, Song X, Ge S, Yu J (2012). Paper-based three-dimensional electrochemical immunodevice based on multi-walled carbon nanotubes functionalized paper for sensitive point-of-care testing. *Biosensors and Bioelectronics* 32: 238-243.
- Xie J, Wang S, Aryasomayajula L, Varadan VK (2007). Material and electrochemical studies of platinum nanoparticle-coated carbon nanotubes for biosensing. *IEEE-NANO* 2007: 1077-1080.
- Yu X, Munge B, Patel V, Jensen G, Bhirde A, Gong JD, Kim SN, Gillespie J, Gutkind JS, Papadimitrakopoulos F, Rusling JF (2006). Carbon nanotube amplification strategies for highly sensitive immunodetection of cancer biomarkers. *Journal of American Chemistry Society* 128: 11199-11205.
- Zhang Y, Bai Y, Yan B (2010). Functionalized carbon nanotubes for potential medicinal applications. *Drug Discovery Today* 15: 428-435.