

David Silva Melo

USO DE NANOTUBOS DE CARBONO NO DESENVOLVIMENTO DE BIOSSENSORES DE GLICOSE

Monografia realizada no âmbito da unidade Estágio Curricular do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, orientada pelo Professor Doutor Rui Manuel da Silva Gomes Barbosa e apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Setembro 2015



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

David Silva Melo

USO DE NANOTUBOS DE CARBONO NO DESENVOLVIMENTO DE BIOSSENSORES DE GLICOSE

Monografia realizada no âmbito da unidade Estágio Curricular do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas,
Orientada pelo Professor Doutor Rui Manuel da Silva Gomes Barbosa e apresentada à
Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra

Setembro 2015



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Eu, David Silva Melo, estudante do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, com o nº 2010124753, declaro assumir toda a responsabilidade pelo conteúdo da Monografia apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, no âmbito da unidade de Estágio Curricular.

Mais declaro que este é um documento original e que toda e qualquer afirmação ou expressão, por mim utilizada, está referenciada na Bibliografia desta Monografia, seguindo os critérios bibliográficos legalmente estabelecidos, salvaguardando sempre os Direitos de Autor, à exceção das minhas opiniões pessoais.

Coimbra, 11 de Setembro de 2015.

(David Silva Melo)

ÍNDICE

LISTA ACRÓNIMOS E DE ABREVIATURAS.....	5
RESUMO/ABSTRACT.....	6
1- INTRODUÇÃO.....	7
1.1 Point-of-Care Testing.....	8
2- NOÇÕES BÁSICAS SOBRE BIOSSENSORES.....	8
2.1 Princípios fundamentais de um biossensor de glicose.....	9
2.2 Requisitos para um biossensor de glicose.....	11
3- NANOTUBOS DE CARBONO.....	13
4- TÉCNICAS DE CONSTRUÇÃO DE BIOSSENSORES DE GLUCOSE BASEADOS EM NANOTUBOS DE CARBONO.....	15
4.1 Eléttodos baseados em Pasta de Nanotubos de Carbono.....	15
4.2 Eléttodos Modificados com Nanotubos de Carbono.....	16
4.3 Eléttodos baseados em Nanotubos de Carbono modificados com Nanopartículas Metálicas.....	17
4.4 Eléttodos baseados em Nanotubos de Carbono com Enzimas Imobilizadas.....	19
4.5 Microeléttodos baseados em Fibras de Nanotubos de Carbono.....	21
4.6 Eléttodos de Nanotubos de Carbono à Nanoescala.....	22
5- BIOSSENSORES DE GLICOSE NÃO-ENZIMÁTICOS BASEADOS EM NANOTUBOS DE CARBONO	23
6- BIOSSENSORES DE GLICOSE ÓTICOS.....	24
7- NOVAS TECNOLOGIAS DE POINT-OF-CARE PARA MEDIÇÃO DA GLICOSE.....	25
8- BIOSSENSORES DE GLICOSE NÃO-INVASIVOS.....	26
9- CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	27
10- BIBLIOGRAFIA CONSULTADA.....	28

LISTA DE ACRÓNIMOS E DE ABREVIATURAS

CNT(s) – nanotubo(s) de carbono

CNTPE – elétrodos de pasta de nanotubos de carbono

CPE – elétrodos de pasta de carbono

FDA – *Food and Drug Administration*

FED – *Display* emissor de campo

FET – transistor de efeito de campo

GCE – eletrodo de carbono vítreo

ISO – *International Organization for Standardization*

MWCNT(s) – nanotubo(s) de carbono de múltiplas paredes

NP(s) – nanopartícula(s)

POC – *point-of-care*

POCT – *point-of-care testing*

RSD – desvio padrão relativo

SWCNT(s) – nanotubo(s) de parede única

RESUMO

Durante a última década, uma panóplia de diferentes áreas de investigação foram conjugadas para o desenvolvimento de biossensores para monitorização de glicose com o objetivo de ultrapassar desafios relacionados com o desempenho analítico inteligente de forma a obter relevância comercial. Neste sentido, os biossensores baseados em nanotubos de carbono emergiram como possível solução devido à sua elevada sensibilidade, especificidade, rapidez de análise, baixo custo e fácil uso. Esta monografia pretende dar uma visão geral sobre o desempenho analítico de tecnologias que incorporam nanomateriais, nomeadamente, nanotubos de carbono, sob a forma biossensores de glicose que poderão vir a ser aplicados clinicamente. A monografia tenta também abordar a síntese, propriedades, diferentes áreas de aplicação e as características dos nanotubos de carbono e a sua importância para testes de diagnóstico descentralizado.

ABSTRACT

During the last decade, a multitude of different research areas have been combined for the development of biosensors for glucose monitoring with the aim of overcoming challenges associated with smart analytical performance to obtain commercial relevance. In this way, biosensors based on carbon nanotubes emerged as a possible solution due to its high sensitivity, specificity, fast analysis, low cost and ease of use. This paper aims to give an overview of the analytical performance of technologies that incorporate nanomaterials, in particular carbon nanotubes, in the form of glucose biosensors which are likely to be applied clinically. The paper also attempts to address the synthesis, properties, different application areas and characteristics of carbon nanotubes and their importance to point-of-care testing.

I- INTRODUÇÃO

A *diabetes mellitus* é definida como um grupo de desordens metabólicas caracterizada por altos níveis de glicose no sangue, hiperglicemia, resultando no déficit da secreção de insulina, defeito da ação de insula, ou ambos (AMA, 2014). A incidência da diabetes tipo I e II continua a aumentar e prevê-se que número de doentes afetados mundialmente suba de aproximadamente 280 milhões de adultos para mais de 400 milhões em 2030 (SHAW *et al.*, 2010). A diabetes não tem tratamento sendo necessária a monitorização de glicose para controlo dos níveis sanguíneos, de forma a reduzir possíveis complicações associadas. A medição periódica da glicose sanguínea pode falhar na deteção de variações de glicémia entre os momentos da medição. Assim, sistemas que melhorem a monitorização da glicose sanguínea e que encurtem o tempo entre medição de glicose e a medicação são altamente desejáveis.

A nanotecnologia é um ramo da ciência e engenharia dedicada ao desenvolvimento, produção e utilização de estruturas, dispositivos, e sistemas manipulando átomos e moléculas à nano-escala, i.e., dimensões entre 1 e 100 nm (SAINI *et al.*, 2010). A união da investigação em nanotecnologia com as tecnologias microeletrónicas proporcionou a miniaturização de circuitos e sistemas eletrónicos que levam ao desenvolvimento de novos dispositivos para deteção molecular, como por exemplo os biossensores (CARRARA, 2010).

Os avanços em nanotecnologia, imagiologia molecular, imagiologia biomédica possuem um enorme potencial para melhorar os cuidados de doentes diabéticos, permitindo o diagnóstico precoce, determinação da fase e monitorização da progressão da doença para diabéticos tipo I e 2 (NAESENS *et al.*, 2010). Apesar das técnicas de diagnóstico molecular serem altamente específicas e sensíveis são caras por necessitarem de muito tempo e de mão-de-obra especializada. Os biossensores surgem como uma alternativa portátil, mais barata, de simples utilização, mantendo a elevada sensibilidade e especificidade.

A utilização de materiais nano-estruturados em biossensores de glicose tem sido estudado como uma maneira de suporte da deteção da glicose (CASH *et al.*, 2003). Os nanotubos de carbono (CNTs, do inglês *carbon nanotubes*) são materiais atrativos e interessantes para a investigação de novos biossensores aperfeiçoados com maior sua sensibilidade, rapidez de resposta e redução do volume de amostra. A sua aplicação em biossensores de glicose foi reportada pela primeira vez por BESTMAN *et al.* (2003). O objetivo deste trabalho é fazer a contextualização da importância de dispositivos de

medição da glicose e o levantamento dos mais recentes avanços que nos últimos anos contribuíram para a otimização das plataformas de biossensores de glicose recorrendo ao uso de nanotubos de carbono.

1.1- Point-of-care testing

O *point-of-care testing* (POCT), em português conhecido como “ testes realizados junto ao paciente” ou testes diagnóstico de descentralizado. Regra geral, os testes são realizados perto do paciente, seja à cabeceira da cama, no consultório do médico, sala de emergência, unidade de terapia intensiva, sala de cirurgia ou onde quer que seja necessário assistência médica, sem a necessidade do equipamento sofisticado existente apenas em laboratórios centralizados (UIC, 2011).

Os glicosímetros estão dentro desse tipo de instrumentos. O POCT combina múltiplas funções analíticas em dispositivos portáteis que podem ser utilizados tanto por pessoas especializadas como pelos próprios doentes. A utilização do POCT é particularmente importante no caso dos países em desenvolvimento, onde é frequente não haver a possibilidade de suportar os custos de infraestruturas especializadas e de testes relativamente caros (MARTINEZ *et al.*, 2010).

2- NOÇÕES BÁSICAS SOBRE BIOSSENSORES

Um biossensor é um dispositivo analítico que converte um sinal bioanalítico num sinal, geralmente elétrico, detetável e mensurável. Consiste em três componentes: elementos de reconhecimento biológico, transdutor e um sistema de processamento (Fig. 1). Quando o recetor se liga à molécula de interesse, analito alvo, ocorre uma reação que é convertida pelo transdutor num sinal mensurável, uma vez que surge uma perturbação bioquímica através da reação ocorrida tal como transferência de calor, alteração de distribuição de cargas elétricas, movimento de eletrões, emissão de luz. O sinal é usado para interpretar os dados obtidos por um biossensor (JUSTINO *et al.*, 2013).

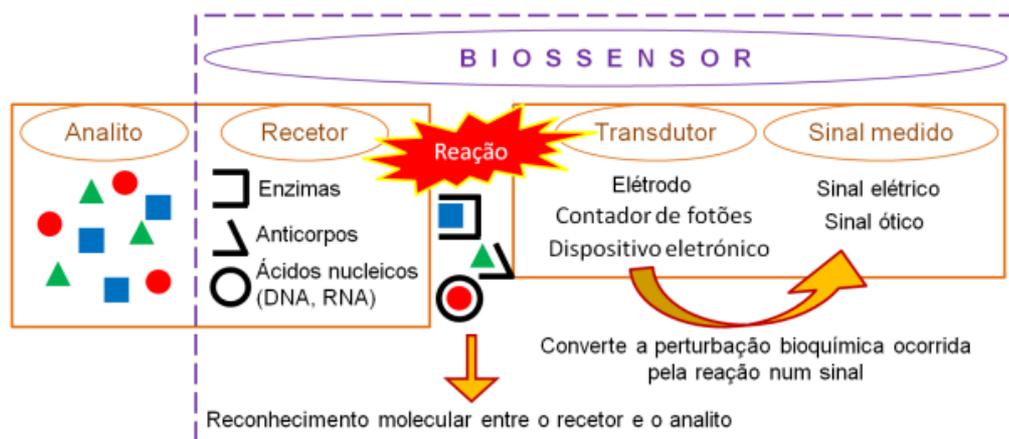


Figura 1 - Esquema geral do funcionamento de um biossensor (JUSTINO Consultado a: 2013).

Os biossensores podem ser classificados de acordo com a natureza do elemento de bioreconhecimento: imunobiossensores, biossensores enzimáticos, genobiossensores; e com modo de transdução do sinal: biossensores óticos, piezoelétricos, eletroquímicos e térmicos (GONÇALVES, 2014).

A particularidade do biossensor encontra-se na integração dos três componentes num único sensor e a combinação permite a medição do analito alvo sem o uso de reagentes. A simplicidade e a rapidez são as maiores vantagens dos biossensores (LEE, 2015).

Os biossensores de glicose surgiram pela primeira vez graças a CLARK e LYONS (1962), e desde então que o desenvolvimento de novos biossensores de glicose nunca parou de crescer.

2.1- Princípios fundamentais de um biossensor de glicose

Podemos dividir o desenvolvimento de biossensores de glicose em quatro gerações. A primeira geração de sensores baseia-se na imobilização de um enzima, como a hexocinase, glicose oxidase (GOx) ou glicose-1-desidrogenase (GDH), num eléctrodo (WEIBEL *et al.*, 1971). A enzima atua como catalisador da reação entre a glicose e oxigénio, formando gluconolactona e peróxido de hidrogénio (H_2O_2). Desta forma, a concentração de glicose da amostra pode ser determinada pela deteção da quantidade de H_2O_2 gerado.

Na segunda geração foi proposto o uso de um mediador artificial para servir como substituto do mediador da primeira geração, oxigénio, e para melhorar o processo de transporte de electrões. Assim, a segunda geração de sensores consistiu numa enzima

catalisadora – GOx – imobilizada conjuntamente com um mediador artificial - derivados de ferroceno e ferricianeto, por exemplo.

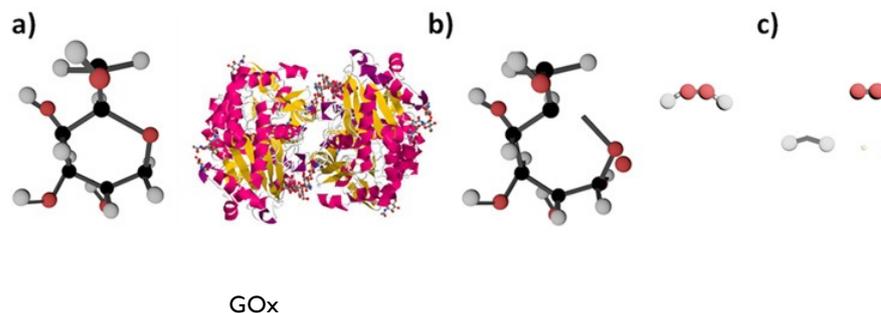


Figura 2- Princípio básico para biossensores de glicose. (a) a glicose liga-se à GOx. (b) que cataliza a oxidação da glicose a gluconolactona e peróxido de hidrogênio, (c) o peróxido de hidrogênio é oxidado à superfície do eletrodo a oxigênio (O₂), fluxo de elétrons gera uma corrente que é medida (corrente redox ou faradáica (TAGUCHI et al., 2014).

Com a terceira geração de sensores a enzima foi imobilizada no eletrodo. Alguns materiais nano- ou micro-porosos foram escolhidos como substratos para a imobilização da GOx, uma vez que quanto maior for a área de superfície do eletrodo maior é velocidade de transferência de elétrons. De seguida encontra-se uma síntese das vantagens e desvantagens associadas às três gerações de biossensores (WEIBEL et al., 1971; GUILBAULT et al., 1973).

Tabela 1- Sumário das primeiras três gerações de biossensores de glicose indicando as suas vantagens e desvantagens.

Biossensor	Fundamento	Vantagens	Desvantagens
Primeira Geração	-Uso de substrato natural de oxigênio e na deteção do H ₂ O ₂ produzido.	-A medição do H ₂ O ₂ é simples sendo fácil a miniaturizar o dispositivo.	-A medição amperométrica do H ₂ O ₂ requer elevado potencial. -Solubilidade do O ₂ restrita nos fluidos biológicos: déficit de oxigênio. -Interferência de espécies eletroativas endógenas.
Segunda Geração	-Uso de mediadores redox capazes de transportar e da enzima para a superfície do eletrodo de trabalho.	-Gera um sinal amperométrico regenerando a forma oxidada do mediador. -Melhoria da sensibilidade e seletividade.	-Bioincompatibilidade dos materiais usados como mediadores de elétrons. A toxicidade <i>in vivo</i> dos materiais levou ao foque do uso de polímeros redox como mediadores. -Sensibilidade dependente do pH do meio.
Terceira Geração	-Não precisa de reagentes.	-Evita o uso de materiais tóxicos	-Apenas está provado que algumas enzimas, incluindo

-Transferência direta entre enzima e o eletrodo sem mediadores.	recorrendo a materiais orgânicos. -Elevada seletividade.	peroxidases, exibem transferência direta de elétrons em superfícies de eletrodos normais. -Atividade enzimática dependente da temperatura e umidade.
---	---	---

As desvantagens associadas às primeiras gerações de biossensores enzimáticos de glicose motivou a investigação no sentido de explorar a detecção não-enzimática de glicose. Foram desenvolvidos sensores não enzimáticos, permitindo que a glicose seja oxidada diretamente na superfície do eletrodo, criando a mais recente geração de biossensores de glicose (Fig. 3).

2.2- Requisitos para um biossensor de glicose

O sensor ideal de glicose deverá ser capaz de fazer uma medição contínua em tempo-real de maneira a detectar alterações bruscas na concentração da glicose sanguínea. Deve ser idealmente não-invasivo, ter longa duração e não necessitar de calibração pelo utilizador. Na literatura são indicados os seguintes critérios para os biossensores glicose:

Tabela 2 - Requisitos para biossensores de glicose (adaptado de KNOLL, 2012).

	Critério	Descrição
1	Disponibilidade de medição imediata que use um algoritmo simples.	Importante nas técnicas de diagnóstico descentralizado quando um clínico não está presente. O biossensor eletroquímico é o mais vantajoso.
2	Elevada frequência de medição.	A monitorização contínua é ideal, mas inconveniente se for invasiva. Aspeto clínico mais crítico.
3	Resposta rápida estabilizada rapidamente após aplicação.	Se o tempo de resposta for demasiado longo afetará a eficácia do sensor em análises de rotina.
4	Estabilidade a longo prazo.	A vida do sensor deve ser relativamente longa quando armazenado e no seu uso frequente. Maior desafio porque a atividade da enzima usada como elemento de reconhecimento diminui com o tempo.

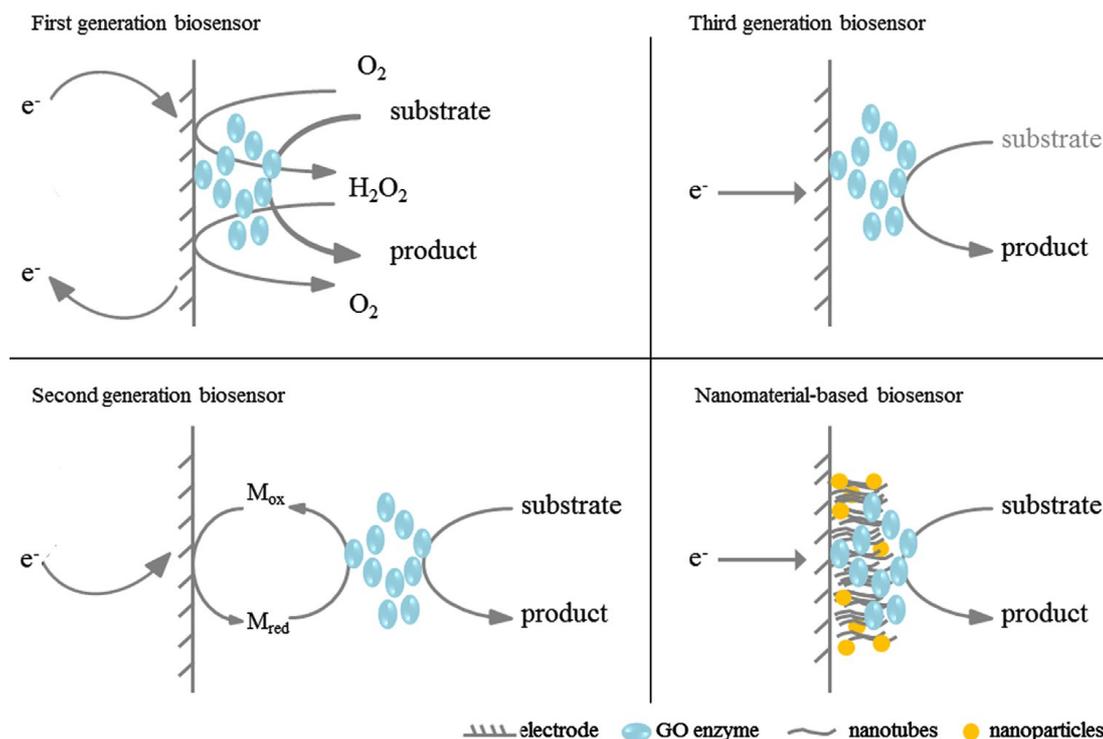


Figura 3 - Esquema representativo das três gerações de biossensores amperométricos de glicose e a última geração de biossensores usando nano-materiais para a imobilização direta do biocomponente (SCOGNAMIGLIO, 2013).

A maioria das tecnologias disponíveis no mercado satisfazem apenas alguns dos critérios acima indicados uma vez que se baseiam em amostras de sangue ou urina. Tais sensores compreendem um eletrodo impresso numa tela (*screen printed electrode*) (Fig. 4) – com PVC ou cerâmica como substrato e carbono com tinta condutora, frequentemente misturado com um mediador – em que a enzima (GOx ou GDH) é depositada e protegida com uma camada externa (ex.: Nafion que também evita interferências). A maior desvantagem destes sensores é que eles não permitem monitorização contínua, podendo levar a erros no ajuste dos níveis de glicose com insulina. Contudo, são os mais populares entre os doentes diabéticos (KNOLL, 2012).

A *Food and Drug Administration* (FDA) recomenda que os glicosímetros tenham um erro <20% para níveis de glicose entre 1.65 e 22 mmol L⁻¹ (30 e 396 mg/dL) quando comparados com o valor de referência do laboratório (2011). A *International Organization for Standardization* (ISO) 15197:2003 estipula que 95% dos resultados individuais de glicose devem estar compreendidos entre ±0.83 mmol L⁻¹ (15 mg/dL) para concentrações de glicose <4.2 mmol L⁻¹ (<75 mg/dL) e entre ±20% com concentrações ≥4.2 mmol L⁻¹ (≥75 mg/dL).

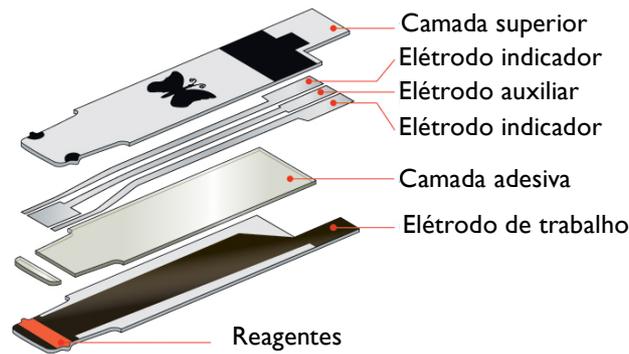


Figura 4 - Esquema de uma tira teste de um biossensor amperométrico de glicose impresso comercializado (Freestyle Lite Blood Glucose Test Strips).

3- NANOTUBOS DE CARBONO

O aperfeiçoamento da detecção é um desafio constante na fabricação de novos biossensores e a incorporação de nano-materiais tem tido um elevado interesse (CASH *et al.*, 2010). Os nanotubos de carbono (CNTs) pertencem à família dos nanomateriais. A primeira síntese foi feita no Japão por IJIMA (1991). Desde 1996, foram publicados mais de 1300 artigos sobre biossensores baseados em CNTs, e 65 artigos de revisão desde 2003 (YAMASHITA *et al.*, 2013). A NANOWERK SPOTLIGHT (2011) indicou que a produção de CNTs aumentou nos últimos anos e que 28% do mercado dos nanomateriais pertence aos CNTs e, de acordo com o estudo da GRAND VIEW RESEARCH (2015), prevê-se que o mercado atinja os 305 mil milhões de euros até 2022.

Caracterizam-se pelo enrolamento de uma folha de grafeno. Características como grandes áreas de superfície, capacidade de facilitar reações redox de diversas substâncias, o aumento do alcance dinâmico e da sensibilidade e limite de detecção justificam o uso de CNTs como materiais essenciais para produzir eletrodos (TAURINO *et al.*, 2012).

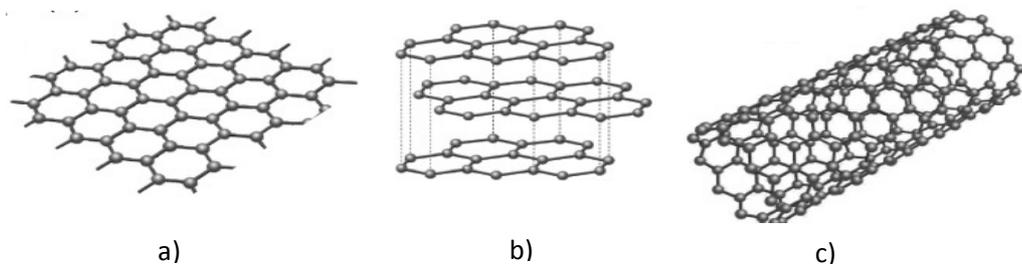


Figura 5 - Representação esquemática do grafeno a)- átomos de carbono arranjados hexagonalmente, grafite b)- folhas de grafeno empilhadas, e do CNT c)- folhas de grafeno enroladas. Imagem retirada de SCARSELLI *et al.*, 2012.

Tipicamente os CNTs têm diâmetros de <1 a 50 nm e podem ter vários micrómetros de comprimento. Avanços recentes permitem que sejam mais compridos, na escala do centímetro, e já foram construídos CNTs com rácio comprimento-diâmetro até 132.000.000:1 (WANG et. al., 2009). A força das ligações sp² C-C está na origem das extraordinárias propriedades mecânicas dos CNTs (MISHRA et al., 2013). JUSTINO et al. (2013) lista seguintes características dos CNTs como as mais relevantes:

- Configuração tubular, que permite isolamento de eletrões em torno da circunferência do CNT, proporcionando uma condutividade elétrica notável;
- Um diâmetro pequeno e comprimento elevado, que proporcionam uma superfície muito grande em relação ao volume, conduzindo a excelentes propriedades eletrónicas a satisfação de todas as ligações covalentes carbono-carbono (C-C), promovendo a estabilidade mecânica, térmica e química;
- Elevada resistência mecânica e resistência à rutura.

Os nanotubos de carbono são caracterizados pelas suas diferentes estruturas e podem ser funcionalizados com grupos funcionais específicos tais como o hidroxilo (-OH) ou o carboxilo (-COOH) permitindo uma enorme variedade de aplicações por terem as suas propriedades melhoradas (PARK et al., 2013).

Tabela 3 - Principais áreas de investigação com CNTs e respetiva quota de mercado, principais áreas de aplicação dos CNTs e as características de interesse dos CNTs aplicados. Adaptado de NANOWERK SPOTLIGHT, 2011.

Área de investigação e quota de mercado	Área de aplicação	Características de interesse
Ciência de materiais (69%)	Materiais compostos por CNTs. Ex: polímeros e cerâmicas para aparelhos fotovoltaicos e díodos emissores de luz orgânica.	- Elevada razão superfície/volume. -Elevada condutividade.
Química (outros 13%)	Sistemas de libertação de fármacos.	-Elevada razão superfície/volume. -Alta capacidade de armazenamento de agentes terapêuticos.
Física (outros 13%)	Displays emissores de campo (FED): desenvolvimento de televisores de tela plana.	-Elevada razão superfície/volume. -Elevada condutividade térmica.
Ciência e	Dispositivos eletrónicos: sensores.	-Dimensões na nano-escala.

tecnologia (10%)		-Alta densidade de corrente. -Alta sensibilidade.
Engenharia (8%)	Dispositivos de armazenamento de energia: células solares, baterias de lítio.	-Grande área superficial. -Baixa resistência. -Boa estabilidade química. -Elevada condutividade elétrica.

BESTERMAN *et al.* (2003) foram os primeiros a relatar o uso de nanotubos de parede única, do inglês *single-walled CNTs* (SWCNTs) criando um biossensor de glicose em que a detecção é baseada na modulação da condutividade do CNT. A enzima GOx foi imobilizada num CNT semiconductor via éster ácido succinimidil-1-pirenobutírico, e foi descoberto que a condutividade do nanotubo estava correlacionada com a resposta da GOx imobilizada à adição de glicose. Com um tempo de resposta de 20 segundos, a adição de 0.1 mM de glicose resultou num aumento de 10% de condutividade do complexo GOx-nanotubo. No entanto o sistema exibiu grande sensibilidade ao pH da solução envolvente.

4- TÉCNICAS DE CONSTRUÇÃO DE BIOCENSORES DE GLUCOSE BASEADOS EM NANOTUBOS DE CARBONO

4.1- Eléttodos baseados em Pasta de Nanotubos de Carbono

Eléttodos de pasta de carbono (*carbon paste electrodes* – CPE) são fabricados misturando pó de carbono com óleo mineral. Os eléctodos de pasta de CNT (CNTPE) são produzidos de maneira similar ao misturar pó de CNT com água desionizada (DAVIS *et al.*, 1997), bromofórmio ou óleo mineral (Fig. 6). Uma enzima é adicionada à mistura para obter o CNTPE com enzimas imobilizadas.

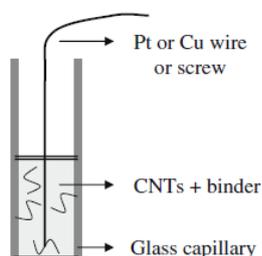


Figura 6 - Desenho esquemático de um eléctodo de pasta de nanotubos de carbono (CNTPE) DAVIS *et al.* (1997).

ANTIOCHIAA e GORTON (2007) desenvolveram um sensor amperométrico com base na atividade da GDH e diaforase (DI) co-imobilizado com nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzida (NAD^+) num CNTPE modificado com um polímero funcionalizado

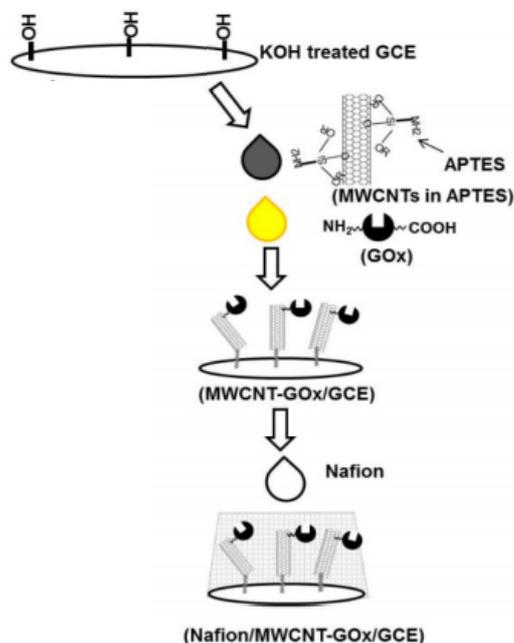
de ósmio. Verificaram que o mediador transporta elétrons entre a transferência da DI imobilizada e o eletrodo. O biossensor exibiu um limite de detecção de $10 \mu\text{mol L}^{-1}$, linearidade até $8 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, sensibilidade de $13.4 \mu\text{A cm}^{-2} \text{ mmol}^{-1} \text{ L}^{-1}$, boa reprodutibilidade com desvio padrão relativo (RSD) de 2.1%, $n=6$ e um prazo de 1 semana armazenado sem humidade a 4°C .

4.2- Eletrodos Modificados com Nanotubos de Carbono

A maneira mais simples para obter eletrodos modificados com CNTs é colocar a solução de CNTs num eletrodo de carbono vítreo (*glassy carbon electrodes* – GCE). Uma vez que os CNTs são insolúveis na maior parte dos solventes, é necessário fazer ultrasonificação durante a preparação de maneira a dispersar eficientemente os tubos (WANG *et al.*, 2003). A dispersão dos tubos na solução aquosa pode ser auxiliada com um surfatante adequado usando hidrogenofosfato de dihexadecilo (WU *et al.*, 2003) ou fosfato de dicetilo (LÜ, 2003) para obter CNTs homogêneos e estáveis através de evaporação de solvente. Como exemplo, JANEGITZ *et al.* (2011) criaram um sensor de glicose baseado na transferência direta de elétrons através da modificação de GCE com CNTs funcionalizados imobilizados por 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida/N-hidroxisuccinamida (EDC/NHS) num filme de hidrogenofosfato de dihexadecilo. Foi usado como suporte à imobilização da flavina-adenina dinucleótido (FAD) ou GOx com agentes de ligação cruzada de EDC/NHS. O sensor apresentou linearidade 0.020-15.0 mM, e um limite de detecção de $9 \mu\text{M}$.

Um material muito usado já referido é o Nafion, útil para fortalecer a ligação mecânica dos nanotubos ao GCE subjacente. Este composto é um fluoropolímero sulfonado baseado em tetrafluoroetileno com boas propriedades de troca de cátions e biocompatibilidade, especialmente eficaz como camada protetora revestindo biossensores de glicose (TURNER *et al.*, 1991). Um biossensor de transferência de elétrons baseado em Nafion/ CNT de múltiplas paredes (*multi-walled carbon nanotube* MWCNT) -GOx/GCE criado por ZHENG *et al.* (2013) apresentou linearidade 0.5–4 mM (Fig. 7).

Outro método de fabrico de elérodos modificados por CNTs é o crescimento direto dos nanotubos no GCE ou substratos metálicos. Esta abordagem melhora o contato



elétrico entre o material sensorial ativo, os CNTs, e o substrato condutor (TAN *et al.*, 2004) e assegura que o sensor fica livre de impurezas oriundas do surfatante ou ligante (FEI *et al.*, 2005). Outra vantagem do crescimento direto é a capacidade de produzir matrizes de elérodos de CNT (LI *et al.*, 2003). Uma vez que as extremidades dos nanotubos estão expostas, elérodos com matrizes de CNT alinhados verticalmente exibem a mais elevada atividade eletrocatalítica acoplada com uma rápida transferência de eletrões (GAO *et al.*, 2003).

Figura 7 - Preparação de um biossensor de glicose baseado em nanotubos de carbono de múltiplas paredes (MWCNTs.) APTES: 3-aminopropiltriétoxissilano (ZHENG *et al.*, 2013).

4.3- Elérodos baseados em Nanotubos de Carbono modificados com Nanopartículas Metálicas.

Metais de transição como o ouro (Au), platina (Pt), paládio (Pd), cobre (Cu), prata (Ag) e níquel (Ni) são bem conhecidos pela sua elevada atividade catalítica. Estas nanopartículas têm vindo a ser largamente utilizadas para melhorar o desempenho de elérodos feitos a partir de materiais de carbono e, em particular, para melhorar a sua sensibilidade para um analito específico (ACTON, 2012). Contudo, superfícies construídas com finos filmes metálicos são desvantajosos devido à reciprocidade entre a espessura do filme e a resposta do sensor. Para além disto, tais elérodos são mais suscetíveis a corrosão e a envenenamento.

Elérodos para biossensores compostos por CNTs têm sido modificados com nanopartículas metálicas via adsorção das nanopartículas pré-formadas, ou via eletrodeposição de soluções preparadas a partir de sais de metais (BALASUBRAMANIAN *et al.*, 2004). O método da eletrodeposição é mais aliciante por permitir controlo preciso

sobre o grau da modificação de maneira eficaz. Ao controlar a duração e a magnitude do potencial aplicado, combinando com a concentração do sal usado, podem-se obter partículas de diferentes tamanhos e densidades (DAY *et al.*, 2005). Vários elétrodos para biossensores contendo CNTs revestidos homogeneamente com Pt foram construídos usando a técnica de eletrodeposição (FEI *et al.*, 2005). A Pt oxida rapidamente H_2O_2 e elétrodos baseados em CNT modificados com nanopartículas têm sido investigados e verificou-se que elétrodos deste tipo possuem excelente detecção amperométrica de H_2O_2 a várias concentrações. Por exemplo, CHU *et al.* (2007) desenvolveram um biossensor enzimático amperométrico baseado na adsorção da GOx num elétrodo de CNT modificado com nanopartículas (NPs) de Au e Pt (GOx/AuNPs/PtNPs/CNT) revestido com Nafion. O sensor apresentou linearidade entre 0.5-17.5 mM com coeficiente de correlação, R, de 0.996, usando um potencial aplicado de ± 0.6 V. Este sensor ainda mostrou ter boa reprodutibilidade (RSD=4.5%) e estabilidade (depois de 25 dias mantém 75% da atividade enzimática) e ainda sem interferência de compostos eletroativos (ácido ascórbico, ácido úrico).

GCEs modificados com cobre também têm sido investigados. LUO *et al.* (1991) reportaram que para detecção amperométrica de vários hidrocarbonatos e aminoácidos o

cobre é superior aos outros metais de transição. Um sensor de glicose não-enzimático foi fabricado por eletrodeposição potencioestática de nanocubos metálicos de cobre (Cu) de uma solução precursora em matrizes de MWCNTs bem alinhados verticalmente (YANGA *et al.*, 2010). O sensor mostrou melhor atividade electrocatalítica da glicose em solução alcalina 0.1M NaOH depois da modificação com os nanocubos de Cu, apresentando uma resposta rápida, <1 segundo; elevada sensibilidade, $1096 \mu A mM^{-1} cm^{-2}$; linearidade até 7.5 mM; baixo limite de detecção, $1.0 \mu M$ (com razão

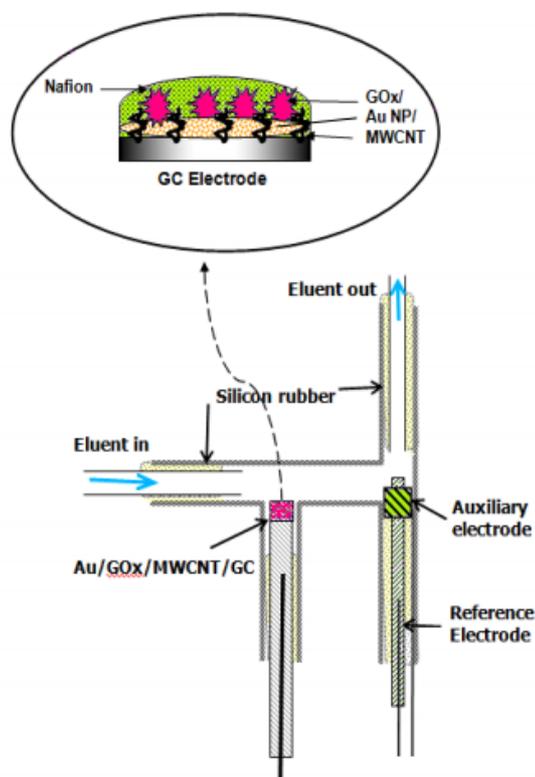


Figura 8 - Diagrama do biossensor de glicose e célula eletroquímica e no sistema de injeção em fluxo (NOROUZI *et al.*, 2010).

sinal/ruído=3). Segundo os autores, o sensor exibe elevada estabilidade e especificidade para a glicose e funciona muito bem na detecção da glicose sanguínea. Além disto, coloides de Au têm sido usados em elétrodos de Au modificados com MWCNTs (WU *et al.*, 2005). Mais recentemente, NOROUZI *et al.* (2010) fizeram um biossensor eletroquímico recorrendo a este método. Desenharam um biossensor enzimático usando um sistema de injeção em fluxo. A GOx foi imobilizada na superfície modificada GCE usando uma matriz polimérica de nafion (AuNPs/MWCNTs/GOx/GCE), ver Fig. 8. Os resultados mostraram uma linearidade de 0.1-10 μM e um limite de detecção de 0.03 μM com razão sinal/ruído=3.

4.4- Elétrodos baseados em Nanotubos de Carbono com Enzimas Imobilizadas

Quando se faz a imobilização de enzimas em elétrodos, a função principal dos CNTs é, transmitirem eficazmente o sinal do centro enzimático ativo para o substrato. Para este fim existem várias técnicas que se baseiam na ligação covalente e não-covalente da enzima. A abordagem não-covalente tem um efeito residual na atividade da enzima e pode ser subdividido em:

- **Adsorção:** com a ajuda de um ligante ou uma resina trocadora de iões, a enzima é adsorvida à superfície de um elétrodo modificado com CNTs. Como alternativa, a enzima pode ser imobilizada usando grupos funcionais de superfície ou monocamadas auto-montadas (*self-assembled*) ou filmes de Langmuir-Blodgett. Um exemplo da aplicação deste método é a construção de um sensor amperométrico recorrendo à técnica camada-por-camada (*layer-by-layer*) por TSAI *et al.* (2009). As camadas dispostas de maneira a ficarem com cargas opostas, carregadas com polieletrólitos e enzimas, são depois depositadas no elétrodo. Neste estudo é descrito o uso de um método suspensão-díalise com quelato de sódio para adsorver a GOx. Segundo os autores, a incorporação dos conjugados enzimáticos de CNT de parede única (*single wall carbon nanotube*, SWCNT) nas camadas resultou em densidades de corrente de 440 $\mu\text{A cm}^{-2}$, com o dobro do valor de resposta comparado com modelos sem SWCNTs.
- **Aprisionamento:** neste método a reação de eletropolimerização incorpora a enzima na matriz polimérica resultante. Um biossensor implantável, sem fios, com aplicação hospitalar na monitorização contínua de lactato e glucose foi desenvolvido usando eletropolimerização de pirrole para a imobilização da GOx e lactato oxidase (LOx) (KOTANEN *et al.*, 2014). Neste trabalho foram testados vários modelos, com a

imobilização da GOx no GCE verificaram um aumento de linearidade até 50 mM, o máximo obtido sem recorrer aos CNTs foi de 25.6 ± 5.6 mM, apesar de ter uma sensibilidade comprometida de 2.3 nA/mM.

- **Encapsulação:** faz uso de hidrogéis ou sol-géis para imobilizar a enzima (Fig. 9). A principal vantagem do processo de encapsulação é que as espécies aprisionadas preservam a sua bioatividade intrínseca. Um estudo mostrou que a modificação de elétrodos baseados em CNTs com hidrogel redox pode ser aplicada para desenvolver sensores amperométricos com elevada sensibilidade, especificidade e rapidez (CUI *et al.*, 2009).

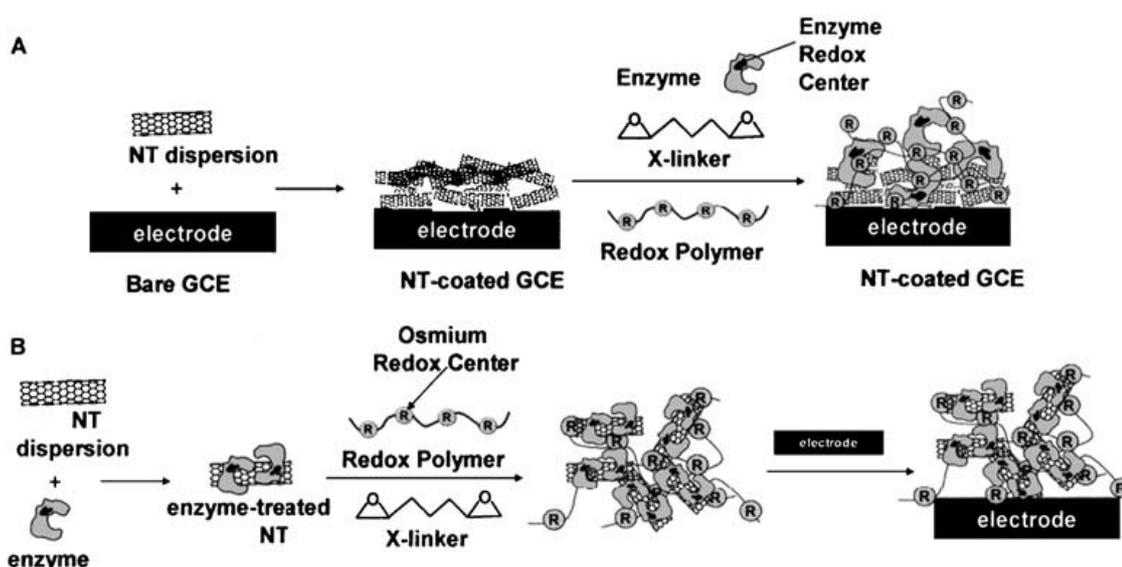


Figura 9 - Esquema mostrando os dois métodos de imobilização enzimática numa matriz de CNT de hidrogel ou sol-gel. (a) – Os sensores são fabricados depositando um filme de CNT num GCE antes da deposição do hidrogel redox ou do composto de sol-gel, que contém as enzimas, na superfície do elétrodo revestido por CNT. (b) – Este sensor é preparado por incubação de CNTs com uma solução enzimática, seguindo-se a incorporação na matriz do hidrogel ou sol-gel, que são depois expostas ao substrato (JOSHI *et al.*, 2005).

A fixação direta de enzimas à estrutura de carbono torna-se viável se for feita uma imobilização por ligação covalente. Esta abordagem tem sido usada para imobilizar GOx às extremidades das matrizes de SWCNTs que cresceram num substrato de Au (LIU *et al.*, 2005). Para atingir uma transferência eletrónica direta para o centro redox enzimático a FAD é primeiramente ligada às extremidades dos SWCNTs. Depois, a GOx é reconstituída na FAD imobilizada, ver Fig. 10 (LIU *et al.*, 2005; PATOLSKY *et al.*, 2004).

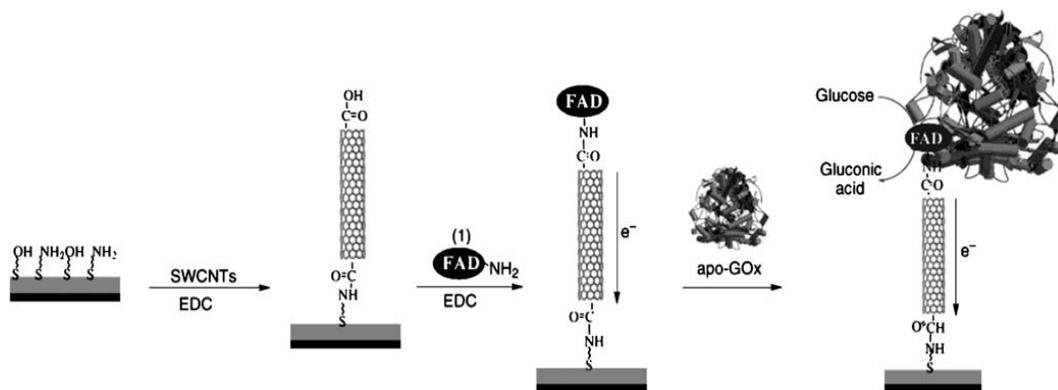
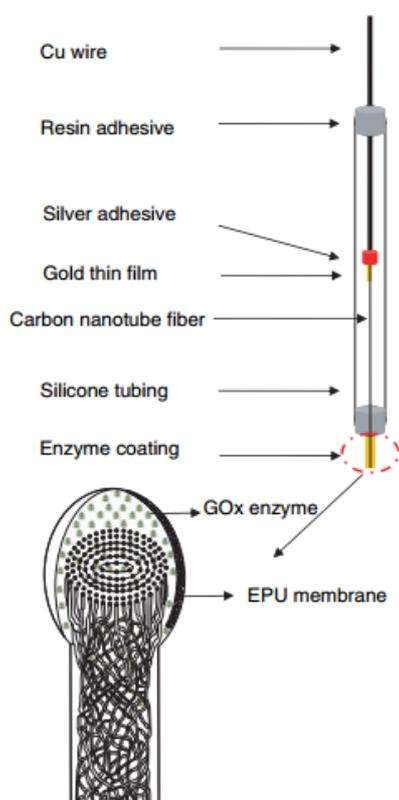


Figura 10 - Montagem de um eletrodo GOx baseado em SWCNTs. Uma monocamada de 2-tioetanoll/cistamina (rácio 3:1) foi montada num eletrodo de Au, seguindo-se pelo acoplamento de SWCNTs na superfície na presença de hidrocloreto de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC). O derivado amidado co-fator do FAD (1) foi depois ligado covalentemente aos grupos carboxilo nas pontas do SWCNTs. No último passo, a apo-glucose-oxidase (apo-GOx) foi reconstituída em unidades FAD (PATOLSKY et al., 2004).

4.5- Microel trodos baseados em Fibras de Nanotubos de Carbono

Um dos problemas do uso de CNTs de parede múltipla (MWCNTs) reportados foi a irrita o cutânea (MONTEIRO-RIVIERE et al., 2005), estando também descrito na literatura que os SWCNTs podem ser tóxicos para células de mamíferos quando em concentra es acima dos $10\mu\text{mol L}^{-1}$ (PANTAROTTO et al., 2004).



CNT fiber glucose biosensor

Figura 11 - Esquema de montagem do microel trodos baseado em fibras de nanotubos de carbono (CNT) proposto por ZHU et al. (2011). Mostra um fio de cobre com revestimento de ouro para melhorar a liga o. A GOx está imobilizada na ponta da fibra de CNT e a camada enzimática está encapsulada pela membrana semi-permeável de epoxi-poliuretano (EPU).

velocidade de transferência de elétrons.

ZHU *et al.* (2011) estudaram este problema tentando melhorar a resposta do sensor e montaram um modelo (Fig. 11) para estudar a influência do esquema de montagem do sensor na transferência de elétrons e a sua influência na sensibilidade e limite de detecção. Verificaram um alcance de linearidade nas concentrações entre 2-30 mmol L⁻¹ e um baixo limite de detecção na ordem dos 25µmol L⁻¹, mostrando que este tipo de sensor pode ter aplicações futuras.

4.6- Eléttodos de Nanotubos de Carbono à Nanoescala

Graças às suas reduzidas dimensões, é possível utilizar nanotubos de carbono individuais como nanoeléttodos em sensores. Esta possibilidade foi realizada ao juntar SWCNTs semicondutores a um transístor de efeito de campo (*field-effect transistor* – FET) (ZHENG *et al.*, 2013; RAZUMIENE *et al.*, 2013).

POURAS *et al.* (2014) propuseram um novo modelo analítico para um biossensor de glicose baseado no sistema SWCNT-FET com o objetivo de prever a fuga de corrente (*drain*) versus voltagem usada no desempenho (Fig.12). Os autores estudaram pela primeira vez, os efeitos da adsorção da glicose nas propriedades elétricas dos CNTs em várias concentrações de glicose. Este novo modelo mostrou ter uma sensibilidade de 18.75 A mM⁻¹, um alcance de linearidade de 2-10 mM com um potencial aplicado de 0.7V. Neste caso, a elevada sensibilidade deve-se a um eléttro extra por molécula de glicose oriundo da oxidação de H₂O₂, e da qualidade do polímero usado como substrato para manter a GOx imobilizada.

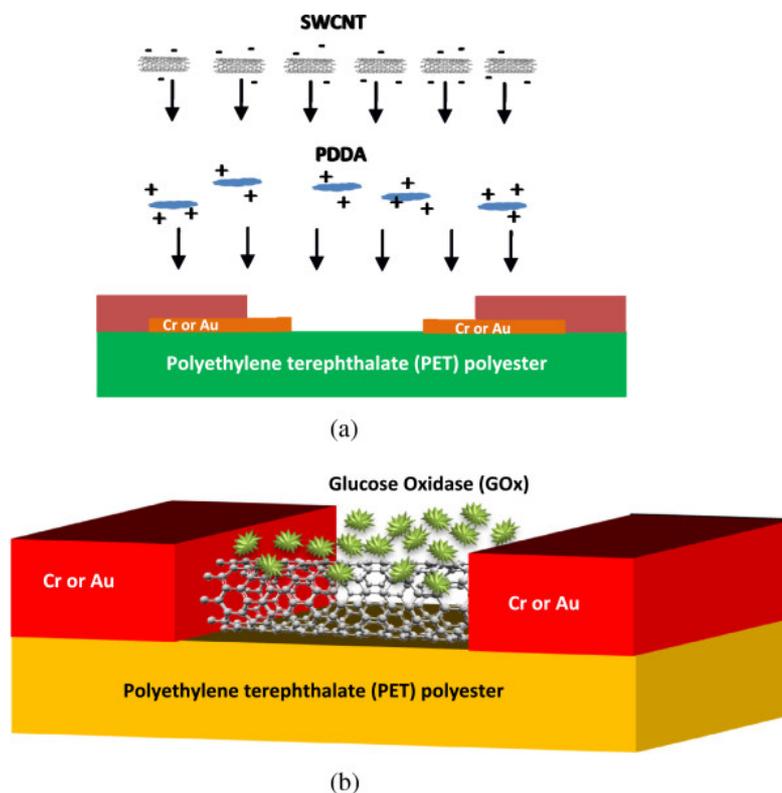


Figura 12 - Esquema de fabrico de um sensor de glicose baseado num transístor de efeito campo. (a) esquema geral de fabrico de um sensor de glicose (LEE et.al. 2010. (b) Modelo analítico que combina elétrodos de crómio (Cr) ou Au, uma camada biomolecular de GOx, e um canal de SWCNT na forma de transístor de campo (FET). PDDA - poli (cloreto de dialildimetilamónio) (POURAS et al., 2014).

5- BIOSSENSORES DE GLICOSE NÃO-ENZIMÁTICOS BASEADOS EM NANOTUBOS DE CARBONO

Até agora foram referenciados exemplos de biossensores enzimáticos. No entanto, a abordagem enzimática tem limitações como a instabilidade e baixa reprodutibilidade graças à natureza intrínseca das enzimas (PARK et al., 2006). Na investigação não-enzimática, as nanopartículas são associadas aos CNTs de forma a melhorar o desempenho analítico.

O uso de metais de transição associados com MWCNTs nos sensores não-enzimáticos permite o melhoramento das capacidades analíticas, em termos de baixos limites de deteção, sendo apropriados para a monitorização de glicose sob condições fisiológicas normais, onde a concentração de plasma é cerca de 6.5 ± 0.4 mM, e em termos de grande alcance de linearidade na determinação dos níveis de glicose. Para além disto, elevadas sensibilidades são obtidas com sensores não-enzimáticos uma vez os elétrodos baseados em CNTs oxidam diretamente a glicose. Este problema dos sensores enzimáticos pode ser evitado se a GOx for aprisionada, como já foi aqui referido no estudo feito por KOTANEN et al., havendo outros exemplos usando nanohíbridos de polímeros de

quitosano (WANG *et al.*, 2009; LIN *et al.*, 2009) ou baseados em nanocompostos de sílica (GOPALAN *et al.*, 2009). Testes realizados em amostras reais mostraram ter bons resultados analíticos na presença de espécies eletroativas interferentes, como o ácido ascórbico e ácido úrico. Isto significa que este tipo de sensores são apropriados no contexto clínico.

Um novo sensor foi contruído tirando partido das propriedades magnéticas de nanocompostos sem recorrer à utilização de um polímero ligante. A aplicação do sensor foi bem-sucedida na determinação de glicose em soro humano com boa exatidão e precisão, indicando que pode vir a ser usado com uma plataforma futura na determinação de glicose (ZHANGA *et al.*, 2015). A seguinte tabela sumaria alguns exemplos de biossensores não-enzimáticos de glicose:

Tabela 4 - Exemplos de biossensores não-enzimáticos de glicose baseados em nanotubos de carbono indicando o princípio de deteção e outras características analíticas. V- voltametria; A- amperometria; L.O.D - limite de deteção; N.D- não determinado; Ni-níquel; Pd- paládio; CuO - óxido de cobre (II), NP- nanopartícula.

Eléctrodo	Princípio	Amostra	Linearidade	L.O.D	Sensibilidade
CuONP/MWCNT (JIANG <i>et al.</i> , 2010)	V/A	Soro	0.4-1.2mM	0.2 µM	2.6 mA/mM.cm ²
PdNP/MWCNT (CHEN <i>et al.</i> , 2010)	V/A	Urina	0-46 mM	N.D	11 µA/mM.cm ²
NiNP/MWCNT (SHAMSIPUR <i>et al.</i> , 2010)	V/A	Soro	0.2-12mM	0.16 mM	N.D
NiNP/MWCNT (NIE <i>et al.</i> , 2011)	A	Soro	1 µM-1 mM	0.5 µM	1.4 mA/mM.cm ²
CuFe ₂ O ₄ -MWCNTs (ZHANGA <i>et al.</i> , 2015)	V/A	Soro	0.5-1400 µM	0.2 µM	N.D

6- BIOSSENSORES DE GLICOSE ÓTICOS

A medição de glicose por técnicas óticas envolve tipicamente um aumento da intensidade da fluorescência ou um desvio do comprimento de onda da luz produzida pelo composto fluorescente acoplado com material sensível à glicose. A deteção de glicose baseada na fluorescência é extremamente sensível sendo capaz de detetar glicose até ao nível molecular (WEISS, 1999). A aplicação de sensores óticos reversíveis levou à criação do conceito de “tatuagem inteligente” (“*smart tattoo*”), descrito por BROWN *et al.* (2006), em que a glicose sanguínea é medida continuamente modulando o comprimento de onda ótico da tatuagem em resposta à concentração de glicose. Os sensores óticos têm como vantagens baixa interferência a campos eletromagnéticos, capacidade de serem

miniaturizados para esquemas de detecção de moléculas únicas, e podem ainda ser usados na monitorização em tempo real da glicose (YETISEN *et al.*, 2014).

Os CNTs exibem propriedades que os tornam bons candidatos na detecção por fluorescência usando radiação de infra-vermelho (IV), radiação a que a pele é particularmente transparente (BARONE *et al.*, 2005). Os SWCNTs absorvem luz na energia de fóton E_{22} e emitem fluorescência em E_{11} em comprimentos de onda perto do infra-vermelho (900-1600nm) (BACHILO *et al.*, 2002).

YETISEN *et al.* (2014) construiu um sensor de glicose ótico baseado na difração de Bragg mediada por um hidrogel. Fabricou um hidrogel de poli(acrilamida) (pAAM) funcionalizado com ácido 3-(acrilamida)fenilborónico (3-PBA) e nanopartículas de prata (Fig. 13). O sensor mostrou ser mais preciso que as tiras de teste comercializadas, e consegue detetar um excepcional leque de concentrações de glicose (0.1-375 mM). O sensor também foi desenhado para detetar a concentração de glicose na urina, que está correlacionada com a glicose sanguínea.

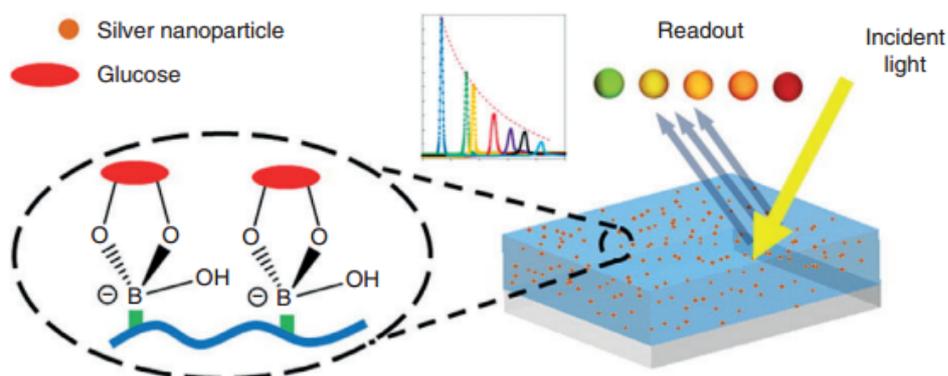


Figura 13 - O hidrogel funcionalizado aumentou de volume e contraiu proporcionalmente à concentração de glicose, como resultado da ligação entre a glicose e o ácido borónico. À medida que o hidrogel aumenta de volume, a distância entre as nanopartículas altera em resposta à concentração de glicose, causando um desvio no comprimento de onda da luz refratada. Foi reportado um desvio de 350nm ao longo do espectro visível para concentrações de glicose de 0-10mM (YETISEN *et al.*, 2014).

7- NOVAS TECNOLOGIAS DE POINT-OF-CARE PARA MEDIÇÃO DA GLICOSE

As novas tecnologias para medição da glicose em amostras sanguíneas compreendem biossensores descartáveis que requerem pequenos volumes de amostra (0.6µL) e permitem a medição de glicose de amostras de sangue de locais alternativos, i.e., evitando

pontas de dedos, palmas da mão ou braços (WU *et al.*, 2008). Wu *et al.* desenvolveu um biossensor amperométrico com um alcance dinâmico 0.6-33.3 mM. Era esperado que o sensor fosse introduzido em testes de POC da glicémia, uma vez que possui baixo custo de fabrico.

NICHOLS *et al.* (2008) montaram um sensor descartável em formato cartucho como dispositivo POC para medição da glicose sanguínea. O biossensor foi introduzido no mercado de POC como um sistema portátil usado por clínicos e pessoal não-especializado. As características técnicas foram melhoradas com cartão de leitura sem fios, contribuindo para o acompanhamento dos doentes tanto no laboratório como no hospital, incluindo o armazenamento da informação médica em suporte eletrónico. O desempenho analítico do sensor desenvolvido mostrou excelente precisão analítica e resultados que podem ser comparados a sistemas i-STAT, analisadores de sangue comercialmente disponibilizados pela *Abbott Laboratories*.

8- BIOSSENSORES DE GLICOSE NÃO-INVASIVOS

Apesar de existirem vários tipos de glicosímetros no mercado, todos implicam lancetar o dedo várias vezes ao dia para recolher amostras de sangue. Técnicas minimamente invasivas ou não-invasivas para monitorização de glicose têm sido trabalhadas, contudo os resultados ainda têm de ser correlacionados com a medição direta da glicose, e a sensibilidade e confiabilidade estão limitadas pelo ruído de fundo e espessura da pele (TIERNEY *et al.*, 2000). A correlação entre glicose sanguínea e glicose salivar foi revelada em vários estudos (JURYSTA *et al.*, 2009; ABIKSHYEET *et al.*, 2012), podendo ser usado como método de diagnóstico alternativo na diabetes, assim como no rastreio da pré-diabetes ou diabetes não diagnosticada.

Recentemente, ZHANG *et al.* (2015) propuseram um nano-biossensor em *chip* descartável utilizando novo método indolor e com boa sensibilidade. O facto de ser descartável elimina a necessidade de limpeza ou pré tratamento do eléctrodo entre medições. Neste estudo, o eléctrodo de trabalho foi funcionalizado com SWCNT e multicamadas de quitosano, nanopartículas de Au e GOx, usando uma técnica de montagem de camada-por-camada. O sensor consegue detetar glicose até 0.1mg/dL, tem elevada resolução, elevada reprodutibilidade, elevada rapidez e permite uma monitorização da glicose salivar contínua ao nível do POC e para o próprio doente. Um aspeto muito importante é a colheita da amostra que está bem detalhada por ZHANG *et al.*

Outras amostras têm sido estudadas para se fazer a medição da glicose como o suor (OLARTE *et al.*, 2013), lágrimas (CLAUSSEN *et al.*, 2012), urina (ZHANG *et al.*, 2004), respiração (WANG *et al.*, 2013). Apesar de estes estudos não conterem nanotubos de carbono aplicados, não deixam de ser interessantes para investigar os esforços que estão a ser feitos no desenvolvimento de sensores não-invasivos.

9- CONSIDERAÇÕES FINAIS

Biossensores baseados em CNTs têm sido desenvolvidos em várias áreas de investigação para uma panóplia de aplicações, para além da prática clínica. Atualmente, a investigação em nanomedicina está crescer a um passo rápido havendo cada vez mais a necessidade desenvolver ferramentas médicas para diagnóstico precoce das doenças.

Materiais baseados em CNTs foram, e continuarão a ser, sintetizados para combinar as melhores propriedades de cada material. Exemplos referidos são as associações possíveis de polímeros condutores, mediadores redox e de nanopartículas de metal com SWCNTs e MWCNTs para a determinação de glicose. Novos métodos de fabrico de biossensores de glicose continuam a aparecer na literatura e, apesar e muitos destes elétrodos exibirem resultados promissores, por vezes é difícil estabelecer uma comparação entre as diferentes variedades de elétrodos baseados em CNTs. Se os diferentes métodos de fabrico conseguirem ser complementares entre si poderá ser possível integrar um conjunto de novos métodos num único eléctrodo de forma a explorar a vantagens de cada modificação sinergicamente.

O carácter multidisciplinar da nanomedicina impõe grandes desafios na construção de biossensores de glicose ideal ao nível de POCT. Um biossensor disponível comercialmente necessita de conceitos das áreas de eletrónica, química, física, ciência de materiais, biologia molecular, entre outros. O mercado global para biossensores de glicose ao nível do point-of-care, não só para os baseados em CNTs, vai certamente aumentar nos próximos anos à medida que o campo de investigação dos biossensores maturar.

Apesar do enorme potencial dos biossensores, a acesso ao mercado dos dispositivos para deteção parece estar limitado. Os biossensores para monitorização de glicose apresentam limitações respeitantes à monitorização não-contínua, ao tempo de resposta, e ao tempo de vida do elemento de reconhecimento biológico. Uma questão que ainda se impõe é a toxicidade dos CNTs, particularmente em testes *in vivo*. Ainda não se sabe bem

o grau, ou risco, da separação dos CNTs do biossensor, nem os seus efeitos a longo termo em sistemas biológicos.

Contudo, os nanobiossensores estão a revolucionar as tecnologias de detecção de glicose, criando cenários atrativos para o desenvolvimento de dispositivos com aplicação hospitalar e para o próprio doente em casa, mostrando ótima linearidade, precisão e resistência a compostos interferentes.

10- BIBLIOGRAFIA CONSULTADA

ABIKSHYEET, P.; RAMESH, V.; OZA, N. - Glucose estimation in the salivary secretion of diabetes mellitus patients, *Diabetes Metab Syndr Obes* (2012), 5:149-54.

ACTON, Q., A. - *Transition Elements: Advances in Research and Application*. Scholarly Editions. Atlanta, Georgia. 2012. ISBN: 9781464990540.

AMA - AMERICAN DIABETES ASSOCIATION - Standards of Medical Care in Diabetes, *Diabetes Care*, Vol. 37 (2014).

ANTIOCHIAA, R.; GORTON, L. - Development of a carbon nanotube paste electrode osmium polymer-mediated biosensor for determination of glucose in alcoholic beverages, *Biosensors and Bioelectronics* (2007), 22(11): 2611–2617.

BALASUBRAMANIAN, K.; BURGHARD, M.; KERN, K. - Carbon nanotubes: electrochemical modification. *Dekker encyclopedia of nanoscience and nanotechnology*. Schwarz, J., A.; Contescu, C., I.; Putyera, K. 2004. Marcel Dekker, New York.

BARONE, P., W., I; BAIK, S.; HELLER, D, A.; STRANO, M, S. - Near-infrared optical sensors based on single-walled carbon nanotubes, *Nat Mater.* (2005), 4(1):86-92.

BESTEMAN, K; LEE, J-O; WIERTZ, F., G., M.; HERRING, H., A., DEKKER, C. - Enzyme coated carbon nanotubes, *Nano Letters* (2003), 3:727-730.

BROWN, J., Q.; MCSHANE, M., J. - Modeling of spherical fluorescent glucose microsensor systems: design of enzymatic smart tattoos, *Biosens Bioelectron* (2006), 21(9):1760-9.

CARRARA, S. - Nano-Bio-Technology and Sensing Chips: New Systems for Detection in Personalized Therapies and Cell Biology, *Sensors* (2010), 10(1):526-543.

CASH, K., J.; CLARK, H., A. - Nanosensors and nanomaterials for monitoring glucose in diabetes, *Trends in Molecular Medicine* (2010), 16(12):584-93.

CHEN, X., M.; LIN, Z., J.; CHEN, D., J.; JIA, T., T.; CAI, Z., M.; WANG, X., R.; CHEN, X.; CHEN, G., N.; OYAMA, M. - Nonenzymatic amperometric sensing of glucose by using palladium nanoparticles supported on functional carbon nanotubes, *Biosens Bioelectron* (2010),25(7):1803-8.

CHOI, H.; HAN, J.; PARK, J.; LEE, J.; LEE, W. - Amperometric Glucose Biosensor Based on Glucose Oxidase Encapsulated in Carbon Nanotube – Titania – Nafion Composite Film on Platinized Glassy Carbon Electrode, *Electroanalysis* (2007), 19 (17):1757 – 1763.

CHU, X; DUAN, D.; SHEN, G.; YU, R. - Amperometric glucose biosensor based on electrodeposition of platinum nanoparticles onto covalently immobilized carbon nanotube electrode, *Talanta* (2007), 71(5): 2040–2047.

CLARK, L., C.; LYONS C. - Electrode systems for continuous monitoring in cardiovascular surgery, *Annals of the New York Academy of Sciences* (1962), 102:29-45.

CLAUSSEN, J.C.; KUMAR, A.; JAROCH, D.B.; KHAWAJA, M.H.; HIBBARD, A.B.; PORTERFIELD, D.M.; FISHER, T.S. - Nanostructuring Platinum Nanoparticles on Multilayered Graphene Petal Nanosheets for Electrochemical Biosensing, *Adv. Funct. Mater.* (2012), 22:3399–3405.

CUI, H.; YE, J.; ZHANG, W.; SHEU, F. - Modification of carbon nanotubes with redox hydrogel: improvement of amperometric sensing sensitivity for redox enzymes, *Biosensors and Bioelectronics* (2009), 24(6):1723-9.

DAVIS, J., J.; COLES, R., J.; HILL, A., O. - Protein electrochemistry at carbon nanotube electrodes, *Journal of Electroanalytical Chemistry* (1997), 440:279-282.

FEI, S.; CHEN, J.; YAO, S.; DENG, G.; HE, D.; KUANG, Y. - Electrochemical behavior of L-cysteine and its detection at carbon nanotube electrode modified with platinum, *Anal Biochem* (2005), 339:29–35.

GAO, M.; DAI, L.; WALLACE, G., G. - Biosensors Based on Aligned Carbon Nanotubes Coated with Inherently Conducting Polymer, *Electroanalysis* (2003), 15:1089–1094.

GONÇALVES, ALM. - Design e fabrico de novos eléctrodos impressos em papel para desenvolvimento de biossensores enzimáticos com aplicações biomédicas, *Faculdade de Ciências e Tecnologia – Universidade Nova de Lisboa* (2014).

GOPALAN, A., I.; LEE, K., P.; RAGUPATHY, D.; LEE, S.H.; LEE, J., W. - An electrochemical glucose biosensor exploiting a polyaniline grafted multiwalled carbon nanotube/perfluorosulfonate ionomer-silica nanocomposite, *Biomaterials* (2009), 30:5999-6005.

GRAND VIEW RESEARCH - Carbon Nanotubes (CNT) Market Analysis By Product (Single Walled Carbon Nanotubes (SWCNT), Multi Walled Carbon Nanotubes (MWCNT)), By Application (Polymers, Energy, Electrical & Electronics) And Segment Forecasts To 2022. Market Research and Counseling. San Francisco. 2015. ISBN Code: 9781680383935.

GUILBAULT, G., G., LUBRANO, G., J. - An enzyme electrode for the amperometric determination of glucose, *Analytica Chimica Acta* (1973), 64(3): 439-455.

IJIMA, S. - Helical microtubules of graphitic carbon, *Nature* (1991), 354:56 – 58.

JANEGITZ, B.; PAULIUKAITE, R.; GHICA, M.; BRETT, C.; FATIBELLO-FILHO, O. - Direct electron transfer of glucose oxidase at glassy carbon electrode modified with functionalized carbon nanotubes within a dihexadecylphosphate film, *Sensors and Actuators B: Chemical* (2011), 158(1):411–417.

JIANG, L., C.; ZHANG, W., D. - A highly sensitive nonenzymatic glucose sensor based on CuO nanoparticles-modified carbon nanotube electrode, *Biosens Bioelectron* (2010), 25(6):1402-7.

JOSHI, P., P.; MERCHANT, S., A.; WANG, Y; SCHMIDTKE, D., W. - Amperometric Biosensors Based on Redox Polymer–Carbon Nanotube–Enzyme Composites *AnalChem* (2005), 77:3183–3188.

JUSTINO, L.; ROCHA-SANTOS, T.; DUARTE, A.- Biosensores com nanotubos de carbono para aplicações clínicas: avanços tecnológicos, *Captar Ambiente e Ciências Para Todos* (2013), 4 (1): 1-12.

KNOLL, W. - Handbook of Biofunctional Surfaces. Cap. 32: Glucose Biosensors: Transduction Methods, Redox Materials, and Biointerfaces, pág. 1077. New York: CRC Press, 2012. ISBN: 9789814364188

KOTANEN, C.; KARUNWI, O.; GUISEPPI-ELIE, A. – Biofabrication Using Pyrrole Electropolymerization for the Immobilization of Glucose Oxidase and Lactate Oxidase on Implanted Microfabricated Biotransducers, *Bioengineering* (2014), 1:85-110.

LEE, D.; CUI, T. - Low-cost, transparent, and flexible single-walled carbon nanotube nanocomposite based ion-sensitive field-effect transistors for pH/glucose sensing, *Biosens Bioelectron* (2010), 9:2259–2264.

LEE, Y., H. – Biosensors, Engineering Biotechnology Gateway Project - Drexel University, Cap. 1.2. Disponível na Internet: http://www.gatewaycoalition.org/files/Engineering_Biotechnology%5CHtmls/biosensors.pdf [Acedido em 11-07-2015]

LI, J.; NG, H., T.; CASSEL, A.; FAN, W.; CHEN, H.; YE, Q.; KOEHNE, J.; HAN, J.; MEYYAPPAN M. - Carbon Nanotube Nanoelectrode Array for Ultrasensitive DNA Detection, *Nano Lett* (2003), 3:597–602.

LI, X.; ZHU, Q.; TONG, S.; WANG, W.; SONG, W. - Self-assembled microstructure of carbon nanotubes for enzymeless glucose sensor, *Sensors and Actuators B: Chemical* (2009), 136(2):444–450.

LIN, J.; HE, C.; ZHAO, Y.; ZHANG, S. - One-step synthesis of silver nanoparticles/carbon nanotubes/chitosan film and its application in glucose biosensor, *Sens. Actuators* (2009), 137: 768–773.

LIU, J.; CHOU, A.; RAHMAT, W.; PADDON-ROW, M., N.; GOODING, J., J. - Achieving Direct Electrical Connection to Glucose Oxidase Using Aligned Single Walled Carbon Nanotube Arrays, *Electroanalysis* (2005), 17:38–46.

LÜ, S. - A Multi-Wall Carbon Nanotubes-Dicetyl Phosphate Electrode for the Determination of Hypoxanthine in Fish, *Analytical Sciences*, (2003), 19(9):1309-1312.

LUO, P.; ZHANG, F.; BALDWIN, R., P. - Comparison of metallic electrodes for constant-potential amperometric detection of carbohydrates, amino acids and related compounds in flow systems, *Anal Chim Acta* (1991), 244:169–178.

MARTINEZ, W.; PHILLIPS, S; WHITESIDES, G.; CARRILHO, E. - Diagnostics for the developing world: microfluidic paper-based analytical devices, *Journal of Analytical Chemistry* (2010), 82(1):3–10.

MISHRA, R.; MISHRA, A. - Review on potential applications of carbon nanotubes and nanofibers, *International Journal of Pharmacy Review & Research* (2013), 3(1):12-17.

MONTEIRO-RIVIERE, N., A.; NEMANICH, R., J.; INMAN, A., O.; WANG, Y., Y., Y.; RIVIERE, J., E.- Multi-walled carbon nanotube interactions with human epidermal keratinocytes, *Toxicol Lett* (2005), 155:377–384.

NAESENS, M.; SARWAL, M. - Molecular diagnostics in transplantation, *Nature Reviews Nephrology* (2010), 6(10):614-28.

NANOWERK SPOTLIGHT - Global carbon nanotubes market - industry beckons, (2011). Disponível na internet: <http://www.nanowerk.com/spotlight/spotid=23118.php>

NICHOLS, J.; RAJADHYAKSHA, A.; RODRIGUEZ, M. - Evaluation of the Enterprise Point-of-Care (EPOC) System for Blood Gas and Electrolyte Analysis, *Point-of-Care* (2008), 7(1):7-11.

NIE, H.; YAO, Z.; ZHOU, X.; YANG, Z.; HUANG, S. - Nonenzymatic electrochemical detection of glucose using well-distributed nickel nanoparticles on straight multi-walled carbon nanotubes, *Biosens Bioelectron* (2011), 30(1):28-34.

NOROUZII, P.; FARIDBOD, F.; LARIJANI, B.; GANJALI, M. - Glucose Biosensor Based on MWCNTs-Gold Nanoparticles in a Nafion Film on the Glassy Carbon Electrode Using Flow Injection FFT Continuous Cyclic Voltammetry, *International Journal Of Electrochemical Science* (2010), 5:1213 – 1224.

OLARTE, O.; CHILO, J.; PELEGRI-SEBASTIA, J.; BARBE, K.; VAN MOER, W. - Glucose detection in human sweat using an electronic nose. Proceedings of 35th Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society. Osaka, Japan, 3–7 July, 2013. 1462–1465.

PANTAROTTO, D.; BRIAND, J., P.; PRATO, M.; BIANCO, A. - Translocation of bioactive peptides across cell membranes by carbon nanotubes, *Chem Commun* (2004), 7:16–17.

PARK, S.; BOO, H.; CHUNG, T., D. - Electrochemical non-enzymatic glucose sensors, *Anal Chim Acta* (2006), 556(1):46-57.

PARK, S.; MAHMOOD, Q.; PARK, H. - Surface functional groups of carbon nanotubes to manipulate capacitive behaviors, *Nanoscale* (2013), 24 (5), 12304-12309.

PATOLSKY, F.; WEIZMANN, Y.; WILLNER, I. - Long-range electrical contacting of redox enzymes by SWCNT connectors, *Angew Chem Int Ed* (2004), 43:2113–2117

POURAS, A; AHMADI, M.; RAHMANI, M.; CHIN, H.; LIM, C.; ISMAIL, R.; TAN, M. - Analytical modeling of glucose biosensors based on carbon nanotubes, *Nanoscale Res Lett* (2014), 9(1):33.

RAZUMIENE, J.; GUREVICIENE, V.; SAKINYTE, I.; BARKAUSKAS, J.; PETRAUSKAS, K.; BARONAS, R. - Modified SWCNTs for reagentless glucose biosensor: electrochemical and mathematical characterization, *Electroanalysis* (2013), 9:166–173.

SAINI, R.; SAINI, S.; SHARMA, S. - Nanotechnology: The Future Medicine, *Journal of Cutaneous and Aesthetic Surgery* (2010), 3(1): 32–33.

SCARSELLI, M.; CASTRUCCI, P.; CRESCENZI, M. - Electronic and optoelectronic nano-devices based on carbon nanotubes, *Journal of Physics: Condensed Matter* (2012), 24(31).

SCOGNAMIGLIO, V. - Nanotechnology in glucose monitoring: Advances and challenges in the last 10 years, *Biosensors and Bioelectronics* (2013), 47:12–25.

SHAMSIPUR, M.; NAJAFI, M.; HOSSEINI, M., R., M. - Highly improved electrooxidation of glucose at a nickel(II) oxide/multi-walled carbon nanotube modified glassy carbon electrode, *Bioelectrochemistry* (2010), 77(2):120-124.

SHAW, J. E.; SICREE, R. A.; ZIMMET, P. Z. - Global estimates of the prevalence of diabetes for 2010 and 2030, *Diabetes Research and Clinical Practice* (2010), 1:4-14.

TAGUCHI M.; PTITSYN A.; MCLAMORE E., S.; CLAUSSEN J., C. - Nanomaterial-mediated Biosensors for Monitoring Glucose, *Journal of Diabetes Science and Technology* (2014), 8(2):403-411.

TANG, H.; CHEN, J.; YAO, S.; NIE, L.; DENG, G.; KUANG, Y. - Amperometric glucose biosensor based on adsorption of glucose oxidase at platinum nanoparticle-modified carbon nanotube electrode, *Anal Biochem* (2004), 331(1):89–97.

TAURINO, I.; MICHELI, G.; CARRARA, S. - Multiwalled Carbon Nanotubes for Amperometric Array-Based Biosensors, *BioNanoScience* (2012), 2(4):185-195.

TIERNEY, M., J.; KIM, H., L.; BURNS, M., D.; TAMADA, J., A.; POTTS, R., O. - Electroanalysis of Glucose in Transcutaneously Extracted Samples, *Electroanalysis* (2000), 12(9):666.

TSAI, T.; HECKERT, G.; NEVES, L.; TAN, Y.; DER-YOU KAO, D.; HARRISON, R.; RESASCO, D.; SCHMIDTKE, D. - Adsorption of Glucose Oxidase onto Single-Walled Carbon Nanotubes and Its Application in Layer-By-Layer Biosensors, *Analytical Chemistry* (2009), 81:7917-7925.

TURNER, R., F., B.; HARRISON D. J.; RAJOTTE, R., V. - Preliminary in vivo biocompatibility studies on prefluorosulphonic acid polymer membranes for biosensor applications, *Biomaterials* (1991), 12:361–368.

UIC- University of Illinois at Chicago, College of Medicine Department of Pathology (2012). Disponível em: http://pathology.uic.edu/clinical_pathology/POCTesting.asp. [Acedido em 20-06-2015]

VIRY, L.; DERRE, A.; GARRIGUE, P.; SOJIC, N.; POULIN, P.; KUHN, A. – Carbon nanotube fiber microelectrodes: design, characterization, and optimization, *J Nanosci Nanotechnol* (2007), 7:3373–3377.

WANG, J.; DEO, R., P.; MUSAMEH, M. - Stable and Sensitive Electrochemical Detection of Phenolic Compounds at Carbon Nanotube Modified Glassy Carbon Electrodes, *Electroanalysis* (2003), 15:1830–1834.

WANG, J.; DEO, R., P.; POULIN, P.; MANGEY, M. - Carbon nanotube fiber microelectrodes, *J AmChemSoc* (2003), 125(48):14706–14707.

WANG, X.; LI, Q.; XIE, J.; JIN, Z.; WANG, J.; LI, Y.; JIANG, K.; FAN, S. - Fabrications of Ultralong and Electrically Uniform Single-Walled Carbon nanotubes on Clean Substrates, *Nano Letters* (2009), 9(9):3137-3141.

WANG, Y.; WEI, W.; LIU, X.; ZENG, X. - Carbon nanotube/chitosan/gold nanoparticles based glucose biosensor prepared by a layer-by-layer technique, *Mater. Sci. Eng.* (2009), 29:50–54.

WANG, Z.; WANG, C. - Is breath acetone a biomarker of diabetes? A historical review on breath acetone measurements, *J. Breath Res.* (2013), 7:037109.

WEISS, S. - Fluorescence spectroscopy of single biomolecules, *Science* (1999), 283(5408):1676-83.

WILSON, G., S.; GIFFORD, R. - Biosensors for Real-Time in vivo Measurements, *Biosensors & Bioelectronics* (2005), 20(12):2388-403.

- WU, K.; SUN, Y.; HU, S. - Development of an amperometric indole-3-acetic acid sensor based on carbon nanotubes film coated glassy carbon electrode, *Sens Actuators B* (2003), 96:658–662.
- WU, M., H.; FANG, M., Y.; JEN, L., N.; HSIAO, H., C.; MÜLLER, A.; HSU, C., T. - Clinical evaluation of bionime rightest GM310 biosensors with a simplified electrode fabrication for alternative-site blood glucose tests, *Clin Chem* (2008), 54(10):1689-95.
- WU, Y.; HU, S. - The fabrication of a colloidal gold-carbon nanotubes composite film on a gold electrode and its application for the determination of cytochrome c, *Colloids Surf B* (2005), 41:299–304.
- YAMASHITA, S.; SAITO, Y.; J CHOI, J., H. - Carbon Nanotubes and Graphene for Photonic Applications. 1ª edição. Woodhead Publishing Series in Electronic and Optical Materials. 2013. ISBN: 0857094173
- YANGA, J.; ZHANG, W.; GUNASEKARAN, S. - An amperometric non-enzymatic glucose sensor by electrodepositing copper nanocubes onto vertically well-aligned multi-walled carbon nanotube arrays, *Biosensors and Bioelectronics* (2010), 26(1):279-84.
- YETISEN, A., K.; MONTELONGO, Y.; DA CRUZ VASCONCELLOS, F.; MARTINEZ-HURTADO, J., L.; NEUPANE ,S.; BUTT, H.; QASIM, M., M.; BLYTH, J.; BURLING, K.; CARMODY, J., B.; EVANS, M.; WILKINSON, T., D.; KUBOTA, L., T.; MONTEIRO, M., J.; LOWE, C., R. - Reusable, robust, and accurate laser-generated photonic nanosensor, *Nano Lett* (2014), 14(6):3587-93.
- ZHANG, M.; SMITH, A.; GORSKI, W. - Carbon nanotube-chitosan system for electrochemical sensing based on dehydrogenase enzymes, *Anal. Chem.* (2004), 76: 5045–5050.
- ZHANGA, Y.; ZHOUA, E.; LIA,, Y.; HEA, X. - A novel nonenzymatic glucose sensor based on magnetic copper ferrite immobilized on multiwalled carbon nanotubes, *Anal. Methods* (2015),7: 2360-2366
- ZHENG, D.; VASHIST, S.; DYKAS, M.; SAHA, S.; AL-RUBEAN K.; LAM E.; LUONG, J.; SHEU, F-S. -Graphene versus multi-walled carbon nanotubes for electrochemical glucose biosensing, *Materials* (2013), 9:1011–1027.

ZHU, Z.; GARCIA-GANCEDO, L.; FLEWITT, A.; MOUSSY, F.; LIC, Y.; MILNE, W.-
Design of carbon nanotube fiber microelectrode for glucose biosensing, *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* (2011), 87(2): 256–262.

ZHU, Z.; SONG, W.; BURUGAPALLI, K.; MOUSSY, F.; LI, Y., L.; ZHONG, X., H. -
Nanoyarncarbon nanotube fiber based enzymatic glucose biosensor, *Nanotechnol*
(2010), 21(16):165501.