

Artigo

Encapsulação de Biomoléculas em Lipossomos: Aplicações em Biossensores Enzimáticos e Imunossensores

Graça, S. J.;* Ferreira, M.

Rev. Virtual Quim., 2015, 7 (4), 1552-1564. Data de publicação na Web: 25 de maio de 2015<http://www.uff.br/rvq>**Liposome-Encapsulated Biomolecules: Application in Enzymatic Biosensors and Immunosensors**

Abstract: Biomolecules are largely used in the development of biosensors since they present high specificity and selectivity with the analyte. However, these properties can be affected during and after immobilization on the transducer surface, impairing the good functioning of the device. However, the construction of a more accurate and stable device requires that these characteristics are retained after immobilization. In this case, biomolecules encapsulation in liposomes has helped to preserve the structure and activity of molecules immobilized on substrate. Therefore, this article shows the importance of combining the adsorption technique with the encapsulation of biomolecules in liposomes to improve the operation of these devices.

Keywords: Biosensors; Biomolecules; Layer-by-Layer; Langmuir-Blodgett; liposome.

Resumo

As biomoléculas são amplamente utilizadas no desenvolvimento de biossensores, pois apresentam alta especificidade e seletividade com o analito. No entanto, a construção de dispositivos mais precisos e estáveis requer que estas propriedades sejam mantidas após a imobilização, neste sentido a encapsulação de biomoléculas em lipossomos tem ajudado a preservar a estrutura e atividade das biomoléculas que são imobilizadas. Portanto, o presente artigo mostra a importância da combinação da técnica de adsorção com a encapsulação das biomoléculas em lipossomos para melhorar o funcionamento destes dispositivos.

Palavras-chave: Biossensores; biomoléculas; Layer-by-Layer; Langmuir-Blodgett; lipossomo.

* Universidade Federal de São Carlos, Centro de Ciências e Tecnologia para Sustentabilidade, Departamento de Física, Química e Matemática, campus Sorocaba, CEP 18052-780, Sorocaba-SP, Brasil.

✉ marystela@ufscar.br

DOI: [10.5935/1984-6835.20150084](https://doi.org/10.5935/1984-6835.20150084)

Encapsulação de Biomoléculas em Lipossomos: Aplicações em Biossensores Enzimáticos e Imunossensores

Juliana S. Graça,* Marystela Ferreira

Universidade Federal de São Carlos, Centro de Ciências e Tecnologia para Sustentabilidade, Departamento de Física, Química e Matemática, campus Sorocaba, CEP 18052-780, Sorocaba-SP, Brasil.

* marystela@ufscar.br

Recebido em 18 de dezembro de 2014. Aceito para publicação em 22 de maio de 2015

1. Introdução
2. Biossensores
3. Métodos de fabricação de biossensores
4. Lipossomos
5. Lipossomos aplicados em biossensores enzimáticos
6. Lipossomos aplicados em imunossensores
7. Considerações finais

1. Introdução

As nanoestruturas biológicas têm despertado grande interesse para aplicações diversas, dentre elas, o desenvolvimento de biossensores. A utilização de biomoléculas tais como enzimas,^{1,2} anticorpos,³ antígenos,⁴ peptídeos,⁵ DNA,⁶ entre outros, são atraentes por apresentarem propriedades de biocompatibilidade e estabilidade, serem específicas e capazes de reconhecer outras moléculas. No entanto, para que estas propriedades possam ser utilizadas nos dispositivos é necessário que a biomolécula seja adsorvida em uma superfície sem que sua estrutura biológica seja comprometida. Neste sentido, muitas pesquisas estão sendo desenvolvidas sob estratégias que combinam

as técnicas de adsorção e a aplicação de outros materiais nanoestruturados, orgânicos e inorgânicos, a fim de evitar ou minimizar as mudanças de conformação estrutural e maximizar a atividade dessas biomoléculas, permitindo a construção de biossensores mais eficientes.⁷⁻⁹

Um método recentemente desenvolvido é o de encapsulação em lipossomos. Nele a biomolécula é envolta por uma membrana fosfolipídica que evita a contaminação e ligação direta com uma superfície sólida reduzindo a possibilidade de deformação durante a imobilização. Além disso, devido a sua similaridade com a membrana celular, os lipossomos criam um ambiente biocompatível e mais brando que ajudam na estabilidade das biomoléculas.^{1,10,11}

Assim, o presente artigo aborda duas

técnicas para adsorção e os benefícios obtidos pela encapsulação de biomoléculas em lipossomos aplicadas em biossensores, a fim de demonstrar as vantagens de se combinar as propriedades das biomoléculas com as técnicas de fabricação para melhorar a eficiência desses dispositivos.

2. Biossensores

Os biossensores são dispositivos analíticos capazes de converter uma informação físico-química, como transformações químicas, liberação de calor, transferência de elétrons e mudanças de pH, em um sinal analítico que pode ser quantitativo ou semi-quantitativo. Basicamente, o biossensor é constituído por

três partes integradas: o elemento biorreceptor, um transdutor e um sistema de processamento de sinal.¹²

O elemento biorreceptor responsável pela seletividade e especificidade dos dispositivos são biomoléculas como, por exemplo, as enzimas imobilizadas na superfície de um transdutor, as quais reconhecem e interagem especificamente com o analito de interesse gerando alterações químicas ou físicas. Essas alterações, que são proporcionais à concentração do analito, são detectadas pelo transdutor e transformadas em sinal analiticamente mensurável que, posteriormente, é processado, amplificado e registrado pela microeletrônica.¹³⁻¹⁵ Na Figura 1 estão ilustrados os principais componentes do biossensor e seu funcionamento.

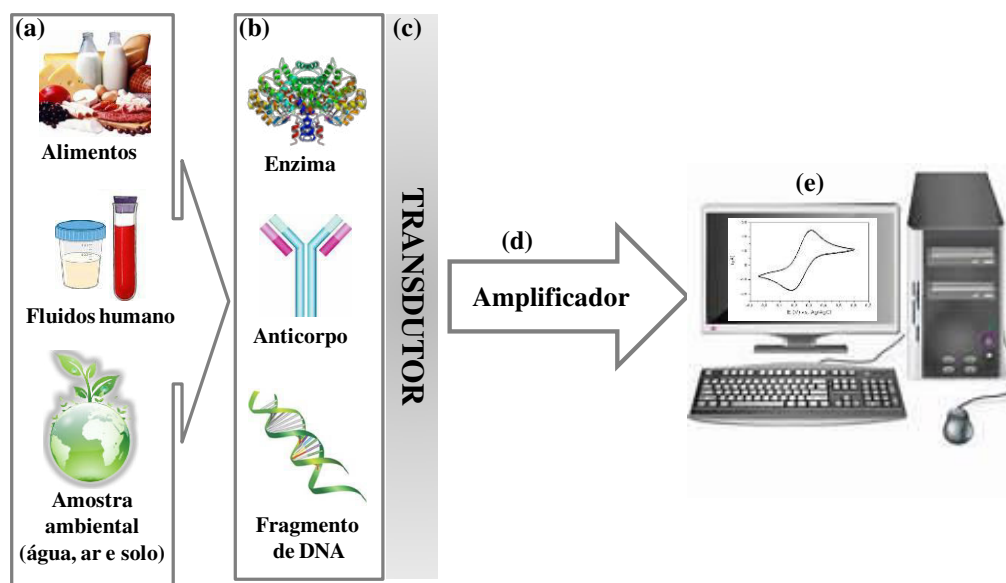


Figura 1. Representação esquemática dos componentes de um biossensor, (a) amostras de analitos, (b) elementos biorreceptores, (c) transdutor, (d) e (e) sistema eletrônico¹⁵

O elemento biorreceptor e o transdutor são constituintes fundamentais do biossensor. De acordo com a IUPAC, os biossensores podem ser classificados em termos do tipo de elemento biorreceptor, pelo modo de transdução de sinal, ou pela combinação dos dois. Em termos do elemento biorreceptor, o biossensor pode ser enzimático ou imunossensor (quando utilizam anticorpos, antígenos, peptídeos).

Quanto ao tipo de transdução de sinal, os sensores podem ser eletroquímicos, piezoelétricos, calorimétricos ou ópticos.¹²

O biossensor eletroquímico, que mede as alterações elétricas do meio, pode ser classificado como amperométrico, potenciométrico, condutimétrico e impedimétrico.¹² Nestes, o transdutor físico, também chamado de eletrodo, é sempre um

material condutor, como exemplos, o ITO (óxido de estanho dopado de índio), o eletrodo de pasta de carbono e o eletrodo impresso de carbono. Antes da imobilização de biomoléculas, estes eletrodos podem ser modificados com materiais que ajudam a aumentar a condutividade elétrica, por exemplo, nanotubo de carbono,¹⁶ grafeno,¹⁷ e nanopartículas de ouro.⁶

A sensibilidade, limite de detecção e estabilidade dos biossensores são parâmetros que podem ser comprometidos com a imobilização inadequada das biomoléculas^{18,19} e podem ser melhorados com a combinação de técnicas de imobilização e outros materiais, como os lipossomos.^{1,5} Esses parâmetros são importantes e devem ser determinados para verificar a viabilidade destes dispositivos. Para os biossensores eletroquímicos a sensibilidade pode ser determinada a partir do coeficiente angular de um gráfico que relaciona a variação da densidade de corrente com concentração do analito.¹³ Através deste valor é possível verificar o quanto a biomolécula imobilizada é sensível a um determinado analito. O limite de detecção pode ser calculado de acordo com a IUPAC, considerando 3 vezes a variação do ruído obtido na medida, dividido pela sensibilidade.²⁰ Este valor determina a concentração mínima de analito que as biomoléculas imobilizadas são capazes de reconhecer e gerar um sinal mensurável. Já a estabilidade informa a durabilidade, o tempo (por exemplo, em dias) que o material biológico permanece ativo à superfície do transdutor e capaz de reconhecer o analito¹³.

A presença das biomoléculas nos biossensores é que os tornam dispositivos altamente específicos e seletivos e a sua combinação com outros nanomateriais tem possibilitado a construção de biossensores para diferentes finalidades como, por exemplo, na área da saúde, são usados para monitorar a concentração de glicose,^{21,22} colesterol,²³ ácido úrico,²⁴ dopamina,^{25,26} vírus²⁷ e biomarcadores.^{28,29} Na indústria alimentícia são empregados biossensores

para controle de qualidade^{30,31} e detecção de componentes alimentares, por exemplo, lactose.² Já na área ambiental são usados para detecção organofosforados³² e metais pesados.³³ As principais vantagens deste tipo de dispositivo, em comparação com os métodos analíticos convencionais, estão no fato de serem pequenos, de fácil manipulação, relativamente baratos e realizam análise de forma rápida e específica.

3. Métodos de fabricação de biossensores

Construir biossensores com alta eficiência é o desafio da nanociência e da nanotecnologia. Atualmente, as técnicas mais empregadas para imobilização de biomoléculas a partir de filmes nanoestruturados, são a camada por camada, do inglês *Layer-by-Layer* (LbL)³⁴ e a Langmuir-Blodgett (LB)³⁵ pois são técnicas que minimizam a desnaturação das enzimas e, conseqüentemente, ajudam a preservar a atividade durante e após a imobilização. Além disso, as duas técnicas são complementares, sendo que a primeira se baseia na interação de materiais hidrossolúveis contendo cargas opostas e a segunda emprega materiais não solúveis em água. Desta maneira, as duas permitem que uma variedade de biomoléculas possam ser imobilizadas.³⁶

A técnica LbL foi desenvolvida por Decher e colaboradores na década de 90 e consiste na deposição de camadas alternadas muito finas de polieletrólitos catiônicos e aniônicos, sobre um substrato sólido.³⁷ Esta técnica é relativamente simples e requer apenas béqueres com soluções e um substrato sólido (exemplo eletrodo de ITO, óxido de estanho dopado com índio). A adsorção dos materiais na superfície do substrato se dão por meio da imersão do substrato em soluções contendo materiais que apresentam cargas opostas. Neste caso, as interações entre esses materiais são eletrostáticas. No entanto, a

adsorção também pode ocorrer através de outros tipos de interações, como forças de Van der Waals e ligações de hidrogênio.³⁶ Esta técnica é muito viável para adsorção de biomoléculas, pois o processo de fabricação dos filmes é realizado através de soluções aquosas, sendo possível controlar o pH, a temperatura e a força iônica da solução. Além disso, permite a manutenção de água entre as camadas adsorvidas, tornando o processo de fabricação mais favorável e brando as biomoléculas.³⁸

A técnica LB foi desenvolvida por Irving Langmuir e sua assistente Katherine Blodgett e requer um equipamento denominado Cuba de Langmuir. Neste equipamento, moléculas anfifílicas (substâncias que possuem uma estrutura química característica contendo uma região hidrofílica - região polar e outra hidrofóbica - região apolar), são espalhadas em uma interface ar-água de tal forma que a região polar das moléculas interaja com a água e a apolar fique voltada para o ar. Esta orientação das moléculas ocorre espontaneamente de maneira a minimizar a energia livre.³⁹ As moléculas espalhadas na interface são comprimidas por uma barreira móvel fazendo com que estas moléculas se aproximem umas das outras e atinjam um estágio de máxima organização e compactação. Quando essas moléculas atingem este estágio, a monocamada é

transferida para um substrato através da sua imersão e retirado da subfase aquosa.^{39,40}

4. Lipossomos

Os lipossomos são vesículas aquosas formadas a partir de lipídeos anfifílicos do tipo fosfolipídio que podem ser naturais ou sintéticos. Os fosfolipídios são caracterizados por apresentarem estrutura química constituída por uma região hidrofílica carregada com cargas positivas, negativas ou zwitteriônica (possui ambas as cargas em diferentes localizações), e outra hidrofóbica composta de uma cadeia de ácido graxo, ou seja, um grupo carboxila ligado a uma cadeia de hidrocarbonetos que podem ser saturados ou insaturados. Quando estas moléculas são dispersas em solução aquosa se organizam espontaneamente formando vesículas aquosas compostas de uma ou mais bicamadas lipídicas,^{41,42} como ilustrado na Figura 2.

A formação espontânea dos lipossomos ocorre com o agrupamento da região hidrofílica que ficam em contato com o meio aquoso e com a porção hidrofóbica que se agrupam entre si por interações entre as cadeias de hidrocarbonetos, permitindo que se tenha uma maior estabilidade termodinâmica.⁴³

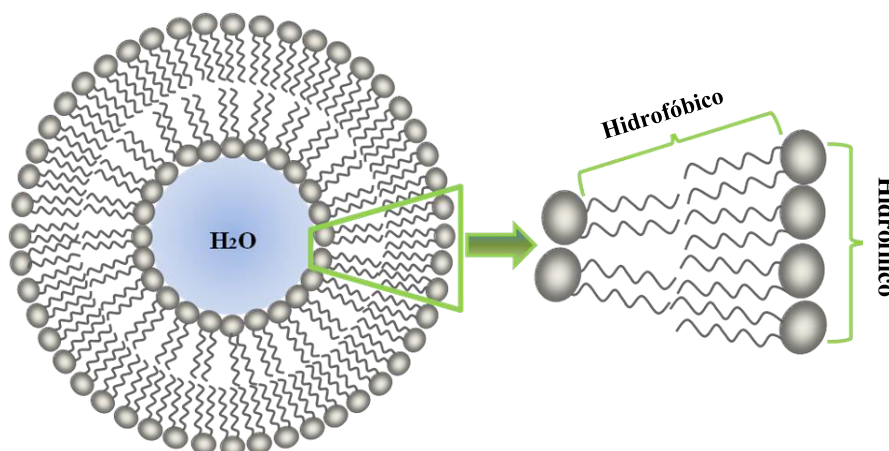


Figura 2. Ilustração da estrutura do lipossomo composto por uma bicamada lipídica

Essas vesículas foram observadas pela primeira vez por Alec Bangham e colaboradores em 1965,⁴⁵ quando investigavam a difusão de íons através de membranas lipídicas artificiais e posteriormente foram nomeadas de lipossomos por Weissmann.⁴⁶ Desde então, os lipossomos têm sido amplamente estudados e vem resultando em diversas aplicações, tais como modelos biomiméticos para estudos de membranas, transporte e liberação de fármacos (do inglês, *drug delivery*), cosméticos para regeneração e hidratação da pele e estabilização de fertilizantes.⁴⁷⁻⁵⁰

Devido à afinidade, biocompatibilidade com os tecidos e células do organismo e capacidade de incorporar e estabilizar biomoléculas e fármacos tanto hidrossolúveis como lipossolúveis, os lipossomos são vantajosos para aplicação na área médica e farmacêutica, como por exemplo, carreadores de fármacos para células alvo.^{51,52} Os lipossomos imobilizados em superfícies sólidas também estão sendo explorado para liberação de fármacos⁵³ e para estabilização de biomoléculas em biossensores,^{1,5} neste último, a estabilização ajuda a manter a atividade biológica e, conseqüentemente, melhora a seletividade e sensibilidade dos dispositivos. A seguir serão descritos algumas aplicações de lipossomos em biossensores enzimáticos e imunossensores.

5. Lipossomos aplicados em biossensores enzimáticos

Os biossensores enzimáticos empregam enzimas imobilizadas em transdutores para realizar reconhecimento molecular. As enzimas possuem excelente atividade catalítica, são biomoléculas com alto grau e especificidade e seletividade que garantem o reconhecimento de moléculas alvo.⁵⁴ No entanto, para que estas características possam ser usadas no sensoriamento, as

enzimas precisam manter a sua conformação estrutural após a imobilização. Enzimas cujas estruturas se encontrem desordenadas na superfície do transdutor, contribuem para o desenvolvimento de biossensores com baixa sensibilidade e estabilidade de armazenagem e alto limite de detecção.¹⁰

Os lipossomos com enzimas encapsuladas e aplicadas em biossensores vêm mostrando excelentes resultados em relação à preservação da atividade enzimática. Neste sentido, Graça *et al.*¹ desenvolveu um biossensor amperométrico para detecção de glicose utilizando a enzima glicose oxidase (GOx) livre e encapsulada em lipossomos de fosfolipídios DPPG (dipalmitoil fosfatidil glicerol) e POPG (palmitoil fosfatidil glicerol). As unidades sensoriais foram compostas de filmes LbL de GOx alternados com o polieletrólito PEI (polietilenoimina) depositados sobre o eletrodo de ITO modificado com microperoxidase-11. Os resultados de Dicroísmo Circular (DC) realizado para a enzima livre e encapsulada, imobilizada no substrato sólido, mostraram que em comparação com a GOx livre, os lipossomos mantiveram o dobro das estruturas ordenadas da enzima. Esta maior ordenação resultou no aumento da sensibilidade de aproximadamente oito vezes maior para sistema que continha lipossomos ($0,12 \pm 0,04 \text{ } (\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2})/\text{mM}$ sem lipossomo, $0,91 \pm 0,09 \text{ } (\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2})/\text{mM}$ com lipossomo) e diminuição do limite de detecção de $62,0 \pm 2,0 \text{ } \mu\text{M}$ (sistema sem lipossomo) para $8,6 \pm 1,1 \text{ } \mu\text{M}$ para o biossensor que continha a GOx em lipossomo da mistura de fosfolipídios DPPG com POPG.

Guan *et al.*⁵⁵ encapsulou a enzima tirosinase em lipossomos de L- α -fosfatidilcolina e imobilizou com quitosana no eletrodo de carbono vítreo uma bicamada automontada de tirosinase encapsulada, este dispositivo foi empregado na detecção eletroquímica de compostos fenólicos. O biossensor apresentou resposta linear entre $0,25 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ a $25 \text{ } \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ e um limite de detecção de $0,091 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$. Através do teste de estabilidade com a enzima livre e

encapsulada, foi verificado uma maior estabilidade para a enzima encapsulada.

Vamvakaki *et al.*⁵⁶ combinou o efeito da estabilidade com o fato dos lipossomos serem opticamente translúcidos e criou um biossensor óptico esférico de tamanho nanométrico, no qual a enzima acetilcolinesterase (AChE) foi encapsulada em lipossomos (L- α - fosfatidilcolina) contendo piranina como indicador fluorescente e incorporou as vesículas em uma matriz sol-gel. As medidas foram realizadas na presença de cloreto de acetilcolina (ATChCl) que é

catalisado pela acetilcolinesterase incorporada em lipossomo gerando como um dos produtos o ácido acético que altera o pH do meio. Esta mudança de pH altera o sinal fluorescente devido a presença de piranina. Como resultados, o biossensor apresentou boa estabilidade e boa detecção do cloreto de acetilcolina (ATChCl) e a sensibilidade calculada foi de $7.5 \times 10^{-3} \text{ Abs.min}^{-1}.\text{mM}^{-1}$. Uma lista de biossensores que empregam enzimas encapsuladas em lipossomos está apresentada na Tabela 1.

Tabela 1. Biossensores que empregam enzimas encapsuladas em lipossomos.

Lipídios	Enzima	Sinal	Analito	Limite de detecção	Ref.
DPPG e POPG	Glicose Oxidase	Eletroquímico	Glicose	$8,6 \mu\text{mol.L}^{-1}$	1
POPC, NGPE e Colestrerol	Glicose Oxidase	Eletroquímico	Glicose	13 mmol.L^{-1}	57
L- α - fosfatidilcolina e colesterol	Tirosinase	Eletroquímico	Fenol	$0,091 \text{ nmol.L}^{-1}$	55
L- α - fosfatidilcolina e colesterol	Acetilcolinesterase	Eletroquímico	Pesticida organofosforado	$0,89 \mu\text{g.L}^{-1}$	58

6. Lipossomos aplicados em imunossensores

Os imunossensores detectam alterações em um sistema quando o anticorpo ou fragmento do mesmo interage especificamente com um antígeno⁵⁹. Neste sistema, o antígeno ou o anticorpo é imobilizado na superfície do transdutor.

Os anticorpos, também chamados de imunoglobulinas IgGs, possuem estruturas em formato de Y que contém quatro cadeias polipeptídicas sendo duas cadeias leves e duas pesadas, ligadas entre si por pontes de dissulfetos, como mostra a Figura 3 (A). No topo da estrutura em Y se encontra o sítio de ligação, o fragmento Fab (do inglês *Antigen-Binding*), uma região com aminoácidos específicos responsável por reconhecer e se

ligar ao antígeno.^{54,60} A molécula do anticorpo também apresenta uma estrutura basal, uma região vertical denominada Fc porque seu fragmento se cristaliza com facilidade quando o anticorpo sofre hidrólise, esta região não interage com o antígeno e, portanto, possibilita a imobilização do mesmo nos transdutores sem comprometer a sua especificidade.^{54, 60} A especificidade do anticorpo é conferida pela complementaridade química do sítio de ligação com o antígeno, através de forças secundárias e da localização de grupos carregados, apolares e ligações de hidrogênio.^{52,59,54} Esta afinidade e especificidade de ligação faz com que os anticorpos e os antígenos sejam altamente seletivos e, por isto, são amplamente estudados e empregados em biossensoriamento.

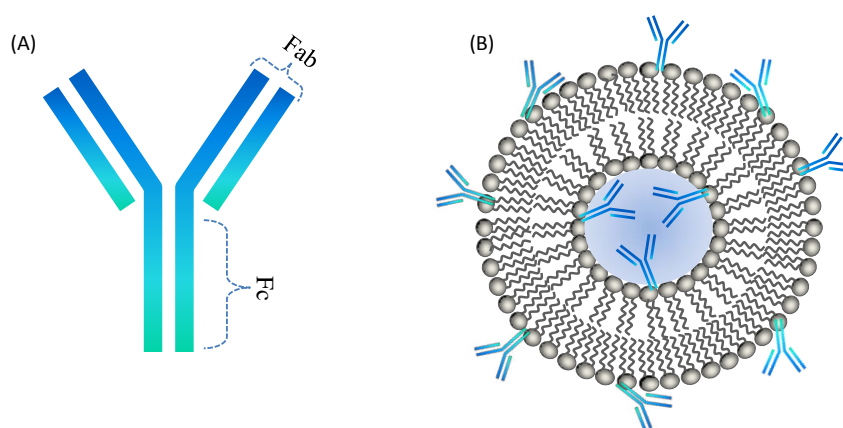


Figura 3. (A) Ilustração da estrutura genérica de um anticorpo, representando a região Fab (Fragmento Antígeno-Binding) e a região Fc (Fragmento cristalizável), figura adaptada,⁵⁴ (B) do anticorpo encapsulado em lipossomo

Na maioria dos imunossensores os anticorpos são adsorvidos na superfície de um transdutor, através de interações do tipo iônica, polar e ligações de hidrogênio. No entanto, a adsorção física pode resultar na desorientação do anticorpo e em ligações fracas, comprometendo a detecção do antígeno e resultando em imunossensores com baixa sensibilidade. Trilling *et al.*¹⁹ descreve quatro possíveis orientações, sendo que o anticorpo pode estar ligado ao transdutor através da sua região vertical Fc, ou pela região do sítio de ligação Fab, ou ligada de lado através das regiões Fab e Fc, ou ainda, com os três fragmentos ligados na superfície do transdutor. A orientação mais adequada para o anticorpo é quando o mesmo está ligado através da região Fc, pois mantém livre a região do sítio de ligação (Fab). Para garantir esta orientação, podem ser empregadas proteínas ligadas diretamente na superfície do transdutor, como as proteínas A e G que apresentam afinidade a região Fc do anticorpo.¹⁹

Assim como as enzimas, os anticorpos também podem ser incorporados em lipossomos para a preservação da estrutura e amplificar o sinal do imunossensor. Como exemplo da aplicação de lipossomos em imunossensores pode-se citar o trabalho de Viswanathan *et al.*⁶¹ que desenvolveu um imunossensor para a detecção do antígeno carcinoembrionário (CEA) presentes na saliva e

no soro. Neste trabalho, o anticorpo específico da CEA (α CEA) foi covalentemente imobilizado com PEI (polietilenoimina) e nanotubo de carbono (MWCNT) em um eletrodo de carbono impresso, e um imunensaio “sanduíche” foi realizado para a geração de sinal eletroquímico. No imunensaio “sanduíche” o antígeno CEA se liga ao anticorpo imobilizado, em seguida os anticorpos α CEA presentes nos lipossomos contendo ácido ferroceno carboxílico encapsulado se ligam ao antígeno CEA e, então, é realizada a lise dos lipossomos possibilitando a detecção e geração de sinal. O imunossensor detectou concentrações de 5×10^{-12} à 5×10^{-7} g.mL⁻¹ de CEA e apresentou um baixo limite de detecção (1×10^{-12} g.mL⁻¹). Moraes *et al.*⁴⁹ combinou a técnica camada por camada (LbL) e a encapsulação do peptídeo antigênico p24-3 (derivado da proteína p24 do HIV-1) em lipossomos e desenvolveu um imunossensor para a detecção do HIV-1. A conformação do p24-3 encapsulado foi analisado por difração circular (CD), no qual observou-se um aumento da conformação de estruturas α -hélice e conseqüentemente obteve-se uma melhora na detecção. Petri *et al.*⁵ também mostra em seu trabalho que a estrutura secundária do peptídeo p17-1 (derivado da proteína do HIV-1) é mantida nos filmes LbL se incorporados em lipossomos de DPPG, além disso, os anticorpos anti-p17 só foram

detectados pelo imunossensor eletroquímico que continha p17-1 incorporados em lipossomos. Na Tabela 2 estão outros

exemplos de imunossensores que utilizam lipossomos.

Tabela 2. Imunossensores que empregam anticorpos encapsulados em lipossomos.

Lipossomo	Bioreceptor	Sinal	Analito	Limite de detecção	Ref.
DPPC e DPPG	Anti-Mucin-16	Eletroquímico	Mucin-16 (biomarcador do câncer de ovário)	$5 \times 10^{-4} \text{ U.mL}^{-1}$	62
DPPC e DPPG	Anti-P-celectina	Eletroquímico	P-celectina	$0,85 \text{ pg.mL}^{-1}$	63

7. Considerações finais

O bom funcionamento dos biossensores é comprometido pela desorientação e baixa atividade das biomoléculas que são imobilizadas na superfície de um transdutor. A técnica de encapsulação de biomoléculas em lipossomos tem se mostrado eficiente na preservação da estrutura de enzimas, peptídeos, anticorpos e antígenos, durante e após a imobilização. Portanto, é uma estratégia promissora que pode ser empregada em conjunto com outras técnicas e materiais para obter biossensores cada vez mais eficientes.

Agradecimentos

Aos professores Fábio Minoru Yamaji e Walter Ruggeri Waldman que ministraram a disciplina de “Tópicos Especiais: Projetos de Dissertação” no Programa de Pós Graduação em Ciências dos Materiais e aos órgãos de fomento FAPESP (Processo 2014/17519-1) (Processo 2013/23288-0), Capes e CNPq.

Referências Bibliográficas

- Graca, J. S.; de Oliveira, R. F.; de Moraes, M. L.; Ferreira, M. Amperometric glucose biosensor based on layer-by-layer films of microperoxidase-11 and liposome-encapsulated glucose oxidase. *Bioelectrochemistry* **2014**, *96*, 37. [CrossRef] [PubMed]
- Campos, P. P.; Moraes, M. L.; Volpati, D.; Miranda, P. B.; Oliveira, O. N.; Ferreira, M. Amperometric Detection of Lactose Using beta-Galactosidase Immobilized in Layer-by-Layer Films. *Acs Applied Materials & Interfaces* **2014**, *6*, 11657. [CrossRef].
- Ling, L.; Hai-Yan, W.; Dong-Yan, S.; Wu, G.; Lun, W. Electrochemiluminescence Immunosensor Based on Carbon Nanotubes and Liposomes for Detection of Human Immunoglobulin G. *Chinese Journal of Analytical Chemistry* **2010**, *38*, 1329. [Link]
- Rafique, S.; Bin, W.; Bhatti, A. S. Electrochemical immunosensor for prostate-specific antigens using a label-free second antibody based on silica nanoparticles and polymer brush. *Bioelectrochemistry* **2015**, *101*, 75. [CrossRef] [PubMed]
- Petri, L.; Ferreira, M.; Moraes, M. L. Toward Preserving the Structure of the Antigenic Peptide p17-1 from the HIV-1 p17 Protein in Nanostructured Films. *Journal of Nanoscience*

- and *Nanotechnology* **2011**, *11*, 6705. [CrossRef]
- ⁶ Spain, E.; Kojima, R.; Kaner, R. B.; Wallace, G. G.; O'Grady, J.; Lacey, K.; Barry, T.; Keyes, T. E.; Forster, R. J. High sensitivity DNA detection using gold nanoparticle functionalised polyaniline nanofibres. *Biosensors and Bioelectronics* **2011**, *26*, 2613. [CrossRef] [PubMed]
- ⁷ Siqueira Jr., J. R.; Caseli, L.; Crespilho, F. N.; Zucolotto, V.; Oliveira Jr., O. N. Immobilization of biomolecules on nanostructured films for biosensing. *Biosensors and Bioelectronics* **2010**, *25*, 1254. [CrossRef]
- ⁸ Pingarrón, J. M.; Yáñez-Sedeño, P.; González-Cortés, A. Gold nanoparticle-based electrochemical biosensors. *Electrochimica Acta* **2008**, *53*, 5848. [CrossRef]
- ⁹ Samanman, S.; Kanatharana, P.; Asawatreratanakul, P.; Thavarungkul, P. Characterization and application of self-assembled layer by layer gold nanoparticles for highly sensitive label-free capacitive immunosensing. *Electrochimica Acta* **2012**, *80*, 202. [CrossRef]
- ¹⁰ Park, B.-W.; Yoon, D.-Y.; Kim, D.-S. Recent progress in bio-sensing techniques with encapsulated enzymes. *Biosensors and Bioelectronics* **2010**, *26*, 1. [CrossRef] [PubMed]
- ¹¹ Chaize, B.; Fournier, D. Sorting out molecules reacting with acetylcholinesterase by enzyme encapsulation in liposome. *Biosensors and Bioelectronics* **2004**, *20*, 628. [CrossRef] [PubMed]
- ¹² Perumal, V.; Hashim, U. Advances in biosensors: Principle, architecture and applications. *Journal of Applied Biomedicine* **2014**, *12*, 1. [CrossRef]
- ¹³ Thévenot, D. R.; Toth, K.; Durst, R. A.; Wilson, G. S. Electrochemical biosensors: recommended definitions and classification. *Biosensors and Bioelectronics* **2001**, *16*, 121. [CrossRef] [PubMed]
- ¹⁴ Karyakin, A. A. *Em Sensors for Environment, Health and Security: Advanced Materials and Technologies*; Baraton, M. I., org.; Springer: Dordrecht, 2009.
- ¹⁵ Grieshaber, D.; MacKenzie, R.; Vörös, J.; Reimhult, E. Electrochemical Biosensors - Sensor Principles and Architectures. *Sensors* **2008**, *8*, 1400. [CrossRef]
- ¹⁶ Kafi, A. K. M.; Crossley, M. J. Synthesis of a conductive network of crosslinked carbon nanotube/hemoglobin on a thiol-modified Au Surface and its application to biosensing. *Biosensors and Bioelectronics* **2013**, *42*, 273. [CrossRef]
- ¹⁷ Lu, X.; Wang, X.; Jin, J.; Zhang, Q.; Chen, J. Electrochemical biosensing platform based on amino acid ionic liquid functionalized graphene for ultrasensitive biosensing applications. *Biosensors and Bioelectronics* **2014**, *62*, 134. [CrossRef]
- ¹⁸ Marcuello, C.; de Miguel, R.; Gómez-Moreno, C.; Martínez-Júlvez, M.; Lostao, A. An efficient method for enzyme immobilization evidenced by atomic force microscopy. *Protein Engineering, Design and Selection* **2012**, *25*, 715. [CrossRef] [PubMed]
- ¹⁹ Trilling, A. K.; Beekwilder, J.; Zuilhof, H. Antibody orientation on biosensor surfaces: a minireview. *Analyst* **2013**, *138*, 1619. [CrossRef]
- ²⁰ Mocak, J.; Bond, A. M.; Mitchell, S.; Scollary, G. *Em Pure and Applied Chemistry IUPAC*, 1997.
- ²¹ Turkmen, E.; Bas, S. Z.; Gulce, H.; Yildiz, S. Glucose biosensor based on immobilization of glucose oxidase in electropolymerized poly(o-phenylenediamine) film on platinum nanoparticles-polyvinylferrocenium modified electrode. *Electrochimica Acta* **2014**, *123*, 93. [CrossRef]
- ²² Mani, V.; Devadas, B.; Chen, S.-M. Direct electrochemistry of glucose oxidase at electrochemically reduced graphene oxide-multiwalled carbon nanotubes hybrid material modified electrode for glucose biosensor. *Biosensors and Bioelectronics* **2013**, *41*, 309. [CrossRef]

- ²³ Souza, T. T. L.; Moraes, M. L.; Ferreira, M. Use of hemoglobin as alternative to peroxidases in cholesterol amperometric biosensors. *Sensors and Actuators B: Chemical* **2013**, *178*, 101. [CrossRef]
- ²⁴ Thakur, B.; Sawant, S. N. Polyaniline/Prussian-Blue-Based Amperometric Biosensor for Detection of Uric Acid. *Chempluschem* **2013**, *78*, 166. [CrossRef]
- ²⁵ Wang, K.; Liu, P.; Ye, Y.; Li, J.; Zhao, W.; Huang, X. Fabrication of a novel laccase biosensor based on silica nanoparticles modified with phytic acid for sensitive detection of dopamine. *Sensors and Actuators B: Chemical* **2014**, *197*, 292. [CrossRef]
- ²⁶ Raghu, P.; Reddy, T. M.; Gopal, P.; Reddaiah, K.; Sreedhar, N. Y. A novel horseradish peroxidase biosensor towards the detection of dopamine: A voltammetric study. *Enzyme and Microbial Technology* **2014**, *57*, 8. [CrossRef] [PubMed]
- ²⁷ Nidzworski, D.; Pranszke, P.; Grudniewska, M.; Król, E.; Gromadzka, B. Universal biosensor for detection of influenza virus. *Biosensors and Bioelectronics* **2014**, *59*, 239. [CrossRef] [PubMed]
- ²⁸ Jin, B.; Wang, P.; Mao, H.; Hu, B.; Zhang, H.; Cheng, Z.; Wu, Z.; Bian, X.; Jia, C.; Jing, F.; Jin, Q.; Zhao, J. Multi-nanomaterial electrochemical biosensor based on label-free graphene for detecting cancer biomarkers. *Biosensors and Bioelectronics* **2014**, *55*, 464. [CrossRef]
- ²⁹ Hasanzadeh, M.; Shadjou, N.; Soleymani, J.; Omidinia, E.; de la Guardia, M. Optical immunosensing of effective cardiac biomarkers on acute myocardial infarction. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* **2013**, *51*, 158. [CrossRef]
- ³⁰ Monosik, R.; Stredansky, M.; Tkac, J.; Sturdik, E. Application of Enzyme Biosensors in Analysis of Food and Beverages. *Food Analytical Methods* **2012**, *5*, 40. [CrossRef]
- ³¹ Pundir, C. S.; Chauhan, N. Acetylcholinesterase inhibition-based biosensors for pesticide determination: A review. *Analytical Biochemistry* **2012**, *429*, 19. [CrossRef] [PubMed]
- ³² Baker, P. A.; Goltz, M. N.; Schrand, A. M.; Yoon, D. Y.; Kim, D.-S. Organophosphate vapor detection on gold electrodes using peptide nanotubes. *Biosensors and Bioelectronics* **2014**, *61*, 119. [CrossRef] [PubMed]
- ³³ Wang, R.; Wang, W.; Ren, H.; Chae, J. Detection of copper ions in drinking water using the competitive adsorption of proteins. *Biosensors and Bioelectronics* **2014**, *57*, 179. [CrossRef] [PubMed]
- ³⁴ Decher, G.; Hong, J. D.; Schmitt, J. Buildup of ultrathin multilayer films by a self-assembly process: III. Consecutively alternating adsorption of anionic and cationic polyelectrolytes on charged surfaces. *Thin Solid Films* **1992**, *210*, 831 [CrossRef]
- ³⁵ Blodgett, K. Monomolecular films of fatty acids on glass. *Journal of The American Chemical Society* **1934**, *56*, 495. [CrossRef]
- ³⁶ Siqueira Jr.; J. R.; Caseli, L.; Crespilho, F. N.; Zucolotto, V.; Oliveira Jr., O. N. Immobilization of biomolecules on nanostructured films for biosensing. *Biosensors and Bioelectronics* **2010**, *25*, 1254. [CrossRef]
- ³⁷ Decher, G. Fuzzy Nanoassemblies: Toward Layered Polymeric Multicomposites. *Science* **1997**, *277*, 1232. [CrossRef]
- ³⁸ Lourenço, J. M. C.; Ribeiro, P. A.; Botelho do Rego, A. M.; Raposo, M. Counterions in layer-by-layer films - Influence of the drying process. *Journal of Colloid and Interface Science* **2007**, *313*, 26. [CrossRef]
- ³⁹ De Oliveira, R. F.; Xavier, A. C. F.; Barros, A.; Ferreira, M. Em *Nanoestruturas Princípios e aplicações*; 1a. ed, Elsevier: Brasil, 2015.
- ⁴⁰ Ferreira, M.; Zucolotto, V.; Ferreira, M.; Oliveira Jr., O. N. Em *Encyclopedia of Nanoscience and Nanotechnology*: American Scientific Publishers, 2003.
- ⁴¹ Santos, N. C.; Castanho, M. A. R. B. Lipossomas: a bala mágica acertou? *Química Nova* **2002**, *25*, 1181. [CrossRef]

- ⁴² Frézard, F.; Schettini, D. A.; Rocha, O. G. F.; Demicheli, C. Liposomes: physicochemical and pharmacological properties, applications in antimony-based chemotherapy. *Química Nova* **2005**, *28*, 511. [CrossRef]
- ⁴³ Moraes, M. L.; Caseli, L. *Em Nanoestruturas Princípios e aplicações*; 1a. ed, Elsevier: Brasil, 2015.
- ⁴⁴ Da Róz, A. L.; Leite, F. L.; Ferreira, M.; Oliveira Jr., O. N. *Nanoestruturas Princípios e Aplicações*, 1a. ed, Elsevier: Brasil, 2015.
- ⁴⁵ Bangham, A. D.; Standish, M. M.; Watkins, J. C. Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids. *Journal of Molecular Biology* **1965**, *13*, 238. [CrossRef] [PubMed]
- ⁴⁶ Sessa, G.; Weissmann, G. Phospholipid spherules (liposomes) as a model for biological membranes. *Journal of Lipid Research* **1968**, *9*, 310. [PubMed]
- ⁴⁷ Felice, B.; Prabhakaran, M. P.; Rodríguez, A. P.; Ramakrishna, S. Drug delivery vehicles on a nano-engineering perspective. *Materials Science and Engineering: C* **2014**, *41*, 178. [CrossRef]
- ⁴⁸ Babu, A.; Templeton, A. K.; Munshi, A.; Ramesh, R. Nanodrug Delivery Systems: A Promising Technology for Detection, Diagnosis, and Treatment of Cancer. *AAPS PharmSciTech* **2014**, *15*, 709. [CrossRef]
- ⁴⁹ Moraes, M. L.; Rodrigues, V. C.; Soares, J. C.; Ferreira, M.; de Souza, N. C.; Oliveira, O. N. Immunosensor for HIV-1 Diagnostics Based on Immobilization of the Antigenic Peptide p24-3 Into Liposomes. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology* **2014**, *14*, 6638. [CrossRef]
- ⁵⁰ Park, J.-W. First-Leaflet Phase Effect on Properties of Phospholipid Bilayer Formed Through Vesicle Adsorption on LB Monolayer. *The Journal of Membrane Biology* **2010**, *237*, 107. [CrossRef] [PubMed]
- ⁵¹ Al-Jamal, W. T.; Kostarelos, K. Liposomes: From a Clinically Established Drug Delivery System to a Nanoparticle Platform for Theranostic Nanomedicine. *Accounts of Chemical Research* **2011**, *44*, 1094. [CrossRef] [PubMed]
- ⁵² Ali, I.; Rahis-Uddin; Salim, K.; Rather, M. A.; Wani, W. A.; Haque, A. Advances in nano drugs for cancer chemotherapy. *Current Cancer Drug Targets* **2011**, *11*, 135. [CrossRef] [PubMed]
- ⁵³ Xavier, A. C. F.; de Moraes, M. L.; Ferreira, M. Immobilization of aloin encapsulated into liposomes in Layer-by-layer films for transdermal drug delivery. *Materials Science and Engineering: C* **2013**, *33*, 1193. [CrossRef]
- ⁵⁴ Nelson, D. L.; Cox, M. M. *Princípios de Bioquímica de Lehninger* Artmed, 2014.
- ⁵⁵ Guan, H.; Liu, X.; Wang, W. Encapsulation of tyrosinase within liposome bioreactors for developing an amperometric phenolic compounds biosensor. *Journal of Solid State Electrochemistry* **2013**, *17*, 2887. [CrossRef]
- ⁵⁶ Vamvakaki, V.; Fournier, D.; Chaniotakis, N. A. Fluorescence detection of enzymatic activity within a liposome based nanobiosensor. *Biosensors and Bioelectronics* **2005**, *21*, 384. [CrossRef] [PubMed]
- ⁵⁷ Yoshimoto, M.; Iida, C.; Kariya, A.; Takaki, N.; Nakayama, M. A Biosensor Composed of Glucose Oxidase-Containing Liposomes and MnO₂-Based Layered Nanocomposite. *Electroanalysis* **2010**, *22*, 653. [CrossRef]
- ⁵⁸ Guan, H.; Zhang, F.; Yu, J.; Chi, D. The novel acetylcholinesterase biosensors based on liposome bioreactors chitosan nanocomposite film for detection of organophosphates pesticides. *Food Research International* **2012**, *49*, 15. [CrossRef]
- ⁵⁹ Gil, E. de S.; Kubota, L. T.; Yamamoto, Y. I. Some aspects of immunoassays applied to analytical chemistry. *Química Nova* **1999**, *22*, 874. [CrossRef]
- ⁶⁰ Riccardi, C. dos S.; Costa, P. I. da; Yamanaka, H. Amperometric immunosensor. *Química Nova* **2002**, *25*, 316. [CrossRef]
- ⁶¹ Viswanathan, S.; Rani, C.; Vijay Anand, A.; Ho, J. A. Disposable electrochemical immunosensor for carcinoembryonic antigen using ferrocene liposomes and MWCNT

screen-printed electrode. *Biosensors and Bioelectronics* **2009**, *24*, 1984. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

⁶² Viswanathan, S.; Rani, C.; Delerue-Matos, C. Ultrasensitive detection of ovarian cancer marker using immunoliposomes and gold

nanoelectrodes. *Analytica Chimica Acta* **2012**, *726*, 79. [[CrossRef](#)]

⁶³ Ho, J. A.; Jou, A. F.; Wu, L.; Hsu, S.-L. Development of an immunopredictor for the evaluation of the risk of cardiovascular diseases based on the level of soluble P-selectin. *Methods* **2012**, *56*, 223. [[CrossRef](#)]