

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**“DESENVOLVIMENTO DE PLATAFORMAS
NANOMÉTRICAS HÍBRIDAS BASEADAS EM
POLÍMERO/ENZIMA VISANDO APLICAÇÕES EM
BIOSSENSORES”**

Stanley Endrigo Bilatto Rodrigues*

Tese apresentada como parte dos requisitos
para obtenção do título de DOUTOR EM
CIÊNCIAS, área de concentração: FÍSICO-
QUÍMICA

Orientador: Dr. Daniel Souza Corrêa

*** bolsista CAPES/Embrapa – Rede NanoBiotec**

**São Carlos - SP
2016**

Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da Biblioteca Comunitária UFSCar
Processamento Técnico
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

R696d Rodrigues, Stanley Endrigo Bilatto
Desenvolvimento de plataformas nanométricas
híbridas baseadas em polímero/enzima visando aplicações
em biossensores / Stanley Endrigo Bilatto Rodrigues.
-- São Carlos : UFSCar, 2016.
87 p.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São
Carlos, 2016.

1. Físico-química. 2. Polímeros. 3. Microrganismos.
I. Título.



Folha de Aprovação

Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Tese de Doutorado do candidato Stanley Endrigo Bilatto Rodrigues, realizada em 27/10/2016:

Prof. Dr. Daniel Souza Corrêa
Embrapa

Prof. Dr. Antonio Riul Junior
UNICAMP

Prof. Dr. José Mário de Aquino
UFSCar

Profa. Dra. Sandra Andrea Cruz
UFSCar

Profa. Dra. Juliana Coatrin Soares
IFSC/USP

*Dedico esta Tese à minha família,
não só de sangue, mas de coração.*

AGRADECIMENTOS

A minha família, pelo apoio, suporte e incentivo durante minha vida acadêmica e profissional.

Ao Dr. Daniel Souza Corrêa pela orientação, amizade, incentivo e dedicação concedida durante a realização desta pesquisa.

Ao Prof. Dr. Bernhard Wolfrum e ao Dr. Alexey Yakushenko pela orientação, amizade e disponibilidade em me receber no FORSCHUNGSZENTRUM JÜLICH.

Aos meus amigos e colegas da EMBRAPA INSTRUMENTAÇÃO e da UFSCar pelo convívio diário e fora do ambiente de trabalho, com os quais tive a oportunidade de conviver desde o início desta pesquisa.

Aos amigos e colegas que estiveram presentes durante o estágio no FORSCHUNGSZENTRUM JÜLICH.

À bióloga M.Sc. Joana Bresolin por toda a ajuda e suporte no Laboratório de Amostras Biológicas da Embrapa Instrumentação.

Ao Dr. Flávio Makoto Schimizu e à M.Sc. Rafaella Takehara Paschoalin pela parceria e apoio em todo o desenvolvimento desta pesquisa.

A todos – sem nomeá-los para não cometer a injustiça de esquecer alguém – que contribuíram com equipamentos, metodologias, análises, críticas, sugestões e discussões para o desenvolvimento desta pesquisa.

A CAPES/Embrapa - REDE NanoBiotec pelo suporte financeiro.

Ao PPGQ-UFSCar, DQ, UFSCar e Embrapa Instrumentação pela possibilidade do desenvolvimento deste doutorado.

A todos que contribuíram direta e indiretamente para a realização deste trabalho.

LISTA DE TABELAS

Tabela 5.1 – Resultados experimentais para o ponto isoelétrico das enzimas lisozima, tripsina e pepsina, seguidos dos intervalos de pH em que estas apresentam atividade (com a respectiva maior atividade) e a polaridade resultante.	36
---	----

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1.1 – Dados relacionados sobre os agentes etiológicos associados a surtos de doenças transmitidas por alimentos no Brasil entre os anos de 2000 a 2014. Fonte: Sinan Net/SV/MS ¹	1
FIGURA 2.1 – Representação das estruturas das paredes celulares para as bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, indicados a Membrana citoplasmática, o Peptidoglicano e a Membrana externa. (Fonte ref. ³¹).....	5
FIGURA 2.2 – Representação da interação entre a enzima Lisozima e o peptidoglicano presente na parede celular das bactérias Gram-positivas, resultando na <i>lises</i> celular. (Fonte ref. ³¹).	6
FIGURA 2.3 – Interação entre enzimas e proteínas/substâncias resultantes da interação de bactérias com o meio. a) possibilidades de hidrólise de ligações peptídicas de proteínas originadas pelas reações das bactérias com o meio em que se encontram, quando na presença de diferentes enzimas ³⁴ ; b) reação de hidrólise das ligações peptídicas que compõem as proteínas.....	7
FIGURA 2.4 – Etapas do processo de automontagem (<i>LbL</i>) por adsorção eletrostática. (1) deposição do polication; (2) lavagem e secagem do substrato; (3) deposição do poliânion e (4) lavagem e secagem do substrato contendo camadas alternadas de polication e poliânion ¹⁴	11
FIGURA 2.5 - Estrutura secundária de polipeptídeos. Representadas as estruturas α -hélice e folhas- β . Em destaque as ligações de hidrogênio entre átomos de diferentes ligações peptídicas. (Fonte ref. ³¹).....	14
FIGURA 2.6 – Circuito equivalente para eletrodo metálico recoberto com filme condutor (Retirado da ref. ⁷¹).....	15
FIGURA 2.7 – Representação da dependência da Capacitância vs. Frequência para o circuito equivalente apresentado na FIGURA 2.6. Indicadas as regiões: (1) baixas frequências – correlacionado com as modificações na dupla camada; (2) médias frequências - correlacionado com as modificações no filme; (3) altas frequências – correlacionado com as características geométricas do eletrodo e da solução.....	16
FIGURA 2.8 – Língua Eletrônica: a) arranjo de sensores; b) multiplexador; c) analisador de impedância; d) aquisição e tratamento de dados (computador). (Fonte: ref. ⁹⁵).	19
FIGURA 4.1: Fluxograma da metodologia utilizada no presente trabalho.....	22

FIGURA 4.2 – Estrutura química dos polímeros a) Poliestireno-sulfonato de sódio (PSS) e b) hidrocloreto de polialilamina (PAH).....	23
FIGURA 4.3 - Vista real (esquerda) e esquemática (direita) dos microeletrodos interdigitados utilizados na fabricação dos sensores, com detalhe mostrando a região dos dígitos.	24
FIGURA 4.4 – Curva padrão de crescimento bacteriano. Indicadas as fases: Lag, Log, Estacionária e Fase de Morte. (Fonte ref. ⁹⁹).	25
FIGURA 5.1 - Cinética de crescimento bacteriano para a <i>Salmonella</i> . Absorção em 625 nm em diferentes intervalos de tempo.....	32
FIGURA 5.2 – Micrografias para as bactérias a) <i>Salmonella</i> e b) <i>E. coli</i> . Distância de trabalho 11 mm, tensão aplicada 5 kV, ampliação 15.000 ×.	33
FIGURA 5.3 - Medidas de potencial zeta para soluções enzimáticas 0.5 mg/mL em água deionizada. a) Lisozima; b) Tripsina; c) Pepsina. Variação de pH realizada com adição de KOH e HCl. Nas figuras estão indicados os pontos isoelétricos determinados experimentalmente e circulados (em vermelho) os valores de pH inicialmente empregados. T = 25°C.	35
FIGURA 5.4 - Espectro de absorção na região do UV-Vis para soluções das enzimas Lisozima, Pepsina e Tripsina na concentração de 0.1 mg/mL. Intervalo de absorção entre 200 - 350 nm.	37
FIGURA 5.5 - Absorbância no comprimento de onda de 220 nm para o substrato de quartzo após imersão em solução de tripsina 0.5 mg/mL.	38
FIGURA 5.6 – Cinética de adsorção enzimática (absorbância em 220 nm versus tempo de imersão de substrato de quartzo modificado com camada colchão) para: a) lisozima; b) tripsina e c) pepsina. Soluções enzimáticas 0.5 mg/mL. Ajuste teórico (linha contínua) obtido pela equação de Johnson-Mehl-Avrami. Na figura (a-c) são indicados os tempos de saturação τ_1 para cada enzima.	39
FIGURA 5.7 – (a) Espectro de absorção na região UV-Vis para deposição sequencial de camadas de PSS sobre o quartzo contendo apenas a “camada colchão”. Solução de PSS 0.5 mg/mL; tempo de imersão 3 minutos, com lavagem em H ₂ O destilada por 30 segundos e secagem em fluxo de gás nitrogênio. Procedimento repetido por 7×. (b) Ampliada região 210 – 240 nm em b).....	41
FIGURA 5.8 - Espectros de absorção na região UV-Vis para o crescimento de filmes automontados PSS/Tripsina nas concentrações a) 0.1; b) 0.5 e c) 1.0 mg/mL. Tempo	

de imersão na solução enzimática = 10 minutos. Medidas efetuadas após etapa de imersão na solução enzimática.	43
FIGURA 5.9 - Gráfico da absorbância em 220 nm em função do número de bicamadas das enzimas: a) lisozima, b) tripsina e c) pepsina sobre o quartzo contendo a camada colchão. Variou-se a concentração enzimática em 0.1, 0.5 e 1.0 mg/mL. Tempo de imersão na solução enzimática = 10 minutos. Medidas realizadas em triplicata.	44
FIGURA 5.10 - Espectro de dicroísmo circular para: a) soluções enzimáticas; b) filmes com 7 bicamadas de pepsina, tripsina e lisozima. T = 25°C.	46
FIGURA 5.11 – Figura esquemática para as unidades sensoriais imobilizadas com 1, 3, 5 e 7 bicamadas das diferentes enzimas/PSS, formando distintas Línguas Eletrônicas.	47
FIGURA 5.12 – Resultados de capacitância elétrica em função da frequência para eletrodos interdigitados de platina recobertos com a) 1; b) 3; c) 5 e d) 7 bicamadas de PSS/Lisozima em 3 concentrações de <i>E. coli</i> . (UFC = 10^3 , 10^5 e 10^7) e concentrações correspondentes do Meio de Cultura (MC). Ampliada na segunda coluna região em 1 kHz. Tempo de estabilização = 10 minutos. T = 25°C.	49
FIGURA 5.13 – Resultados de capacitância elétrica em função da frequência para eletrodos interdigitados de platina recobertos com a) 1; b) 3; c) 5 e d) 7 bicamadas de PSS/Tripsina em 3 concentrações de <i>E. coli</i> . (UFC = 10^3 , 10^5 e 10^7) e concentrações correspondentes do Meio de Cultura (MC). Ampliada na segunda coluna região em 1 kHz. Tempo de estabilização = 10 minutos. T = 25°C.	50
FIGURA 5.14 – Resultados de capacitância elétrica em função da frequência para eletrodos interdigitados de platina recobertos com a) 1; b) 3; c) 5 e d) 7 bicamadas de PSS/Pepsina em 3 concentrações de <i>E. coli</i> . (UFC = 10^3 , 10^5 e 10^7) e concentrações correspondentes do Meio de Cultura (MC). Ampliada na segunda coluna região em 1 kHz. Tempo de estabilização = 10 minutos. T = 25°C.	51
FIGURA 5.15 – Análise das Componentes Principais (PCA) dos conjuntos de unidades sensoriais a) lisozima; b) tripsina; c) pepsina e d) todas as unidades juntas. Dados obtidos a partir dos valores de capacitância a 1 kHz. Indicadas as concentrações de <i>E. coli</i> com UFC = 10^3 , 10^5 e 10^7 e dos respectivos Meios de Cultura (MC).	54
FIGURA 5.16 – Ilustração das etapas envolvidas na modificação do eletrodo com glutaraldeído.	56

FIGURA 5.17 – Esquema da reação entre o glutaraldeído e o polímero PAH (Adaptado da ref. ¹¹⁷).	57
FIGURA 5.18 – Esquema da reação de interação entre o glutaraldeído com enzimas. (Fonte ref. ¹¹⁸).....	57
FIGURA 5.19 – Resultados de capacitância elétrica para eletrodos interdigitados de ouro: a) bare (sem modificação superficial); e modificados superficialmente com: b) lisozima imobilizada via ligação covalente; c) tripsina imobilizada via ligação covalente. Foram empregadas 3 concentrações de <i>S. aureus</i> (UFC = 10^3 , 10^5 e 10^7) preparadas via re-suspensão em PBS 0.1 M. Solução branco: PBS 0.1 M. Ampliada região de 1 kHz na segunda coluna. Tempo de estabilização = 10 minutos. T = 25°C.	59
FIGURA 5.20 - Resultados de capacitância elétrica para eletrodos interdigitados de ouro modificados superficialmente com: a) lisozima imobilizada eletrostaticamente (5 bicamadas de <i>LbL</i>); b) tripsina imobilizada eletrostaticamente (5 bicamadas de <i>LbL</i>). Foram empregadas 3 concentrações de <i>S. aureus</i> (UFC = 10^3 , 10^5 e 10^7) preparadas via re-suspensão em PBS 0.1 M. Solução branco: PBS 0.1 M. Ampliada região de 1 kHz na segunda coluna. Tempo de estabilização = 10 minutos. T = 25°C.	60
FIGURA 5.21 – Resultados de capacitância elétrica para eletrodos interdigitados de ouro: a) bare (sem modificação superficial); e modificados superficialmente com: b) lisozima imobilizada via ligação covalente; c) tripsina imobilizada via ligação covalente. Foram empregadas 3 concentrações de <i>Salmonella</i> (UFC = 10^3 , 10^5 e 10^7) preparadas via re-suspensão em PBS 0.1 M. Solução branco: PBS 0.1 M. Ampliada região de 1 kHz na segunda coluna. Tempo de estabilização = 10 minutos. T = 25°C.	61
FIGURA 5.22 - Resultados de capacitância elétrica para eletrodos interdigitados de ouro modificados superficialmente com: a) lisozima imobilizada eletrostaticamente (5 bicamadas de <i>LbL</i>); b) tripsina imobilizada eletrostaticamente (5 bicamadas de <i>LbL</i>). Foram empregadas 3 concentrações de <i>Salmonella</i> (UFC = 10^3 , 10^5 e 10^7) preparadas via re-suspensão em PBS 0.1 M. Solução branco: PBS 0.1 M. Ampliada região de 1 kHz na segunda coluna. Tempo de estabilização = 10 minutos. T = 25°C.	62
FIGURA 5.23 – Resultados de capacitância elétrica para eletrodos interdigitados de ouro: a) bare (sem modificação superficial); e modificados superficialmente com: b)	

- lisozima imobilizada via ligação covalente; c) tripsina imobilizada via ligação covalente. Analisadas 3 concentrações da mistura de *S. aureus* e *Salmonella* (UFC = 10^3 , 10^5 e 10^7) preparadas via re-suspensão em PBS 0.1 M. Solução branco: PBS 0.1 M. Ampliada região de 1 kHz na segunda coluna. Tempo de estabilização = 10 minutos. T = 25°C.....63
- FIGURA 5.24 – Resultados de capacitância elétrica para eletrodos interdigitados de ouro modificados superficialmente com: a) lisozima imobilizada eletrostaticamente (5 bicamadas de *LbL*); b) tripsina imobilizada eletrostaticamente (5 bicamadas de *LbL*). Analisadas 3 concentrações da mistura de *S. aureus* e *Salmonella* (UFC = 10^3 , 10^5 e 10^7) preparadas via re-suspensão em PBS 0.1 M. Solução branco: PBS 0.1 M. Ampliada região de 1 kHz na segunda coluna. Tempo de estabilização = 10 minutos. T = 25°C.....64
- FIGURA 5.25 - Análise das Componentes Principais (PCA) dos conjuntos de unidades sensoriais para análise de cada bactéria a) *S. aureus*; b) *Salmonella* e c) mistura de *S. aureus* + *Salmonella*. Dados obtidos a partir dos valores de capacitância em 1 kHz. Indicadas as concentrações das bactérias com UFC = 10^3 , 10^5 e 10^7 e dos respectivos brancos (PBS).....65
- FIGURA AI.1 - Gráfico de *IDMAP* para os dados de capacitância vs. frequência de 10 unidades sensoriais modificadas superficialmente com filmes de *LbL* contendo 3, 5 e 7 bicamadas de lisozima, tripsina e pepsina. Indicadas as concentrações de *E. coli* em 10^3 , 10^5 e 10^7 UFC e os respectivos meios de cultura (MC)..... 83
- FIGURA AII. 1 - Resultados de capacitância elétrica em função da frequência para eletrodos interdigitados de ouro recobertos com 5 bicamadas de Tripsina em: a) solução tampão fosfato (PBS); b) concentração de 10^5 UFC de *Salmonella*. Tempos de medida = 0, 5 e 10 minutos sem a retirada do eletrodo da solução. Ampliada na segunda coluna região em 1 kHz. T = 25°C84
- FIGURA AIII. 1 – Integração entre estruturas microfluídicas e o substrato polietileno-naftaleno PQA1-M. a) CAD design utilizado para a impressão 3D; b) tinta PVP-co-PMMA impressa sob o substrato PQA1-M no formato da área que será aderida na estrutura 3D; c) estrutura microfluídica colada sobre o substrato flexível PQA1-M após cura do PVP-co-PMMA; d) ilustração do sistema proposto; e) escoamento capilar de sangue em função do tempo para o sistema proposto. (Fonte: 120).....85

FIGURA AIII. 2 – a) Vista diagonal da estrutura microfluídica impressa; b) micro canal com sangue puro; c) micro canal apresentando processo de filtração utilizando sangue com heparina.....86

RESUMO

DESENVOLVIMENTO DE PLATAFORMAS NANOMÉTRICAS HÍBRIDAS BASEADAS EM POLÍMERO/ENZIMA VISANDO APLICAÇÕES EM BIOSSENSORES.

Casos de intoxicação de origem alimentar causados por microrganismos são comuns no Brasil e no mundo. Contudo, em muitos dos surtos não se consegue identificar qual é o microrganismo causador da contaminação. Além disto, as análises tradicionais usualmente empregadas para identificação do microrganismo são muitas vezes caras e demoradas. Deste modo, o desenvolvimento de métodos para uma rápida detecção de microrganismos, similar a um sistema de triagem, focado em indicar se há ou não a contaminação por patogênicos antes da realização de testes específicos, são de grande interesse. Neste trabalho foram desenvolvidos dois sistemas utilizando o conceito de Língua Eletrônica. No primeiro sistema utilizou-se a técnica de *Layer-by-Layer (LbL)* para o crescimento de filmes nanoestruturados juntamente com a imobilização das enzimas lisozima, tripsina e pepsina. As enzimas tripsina e pepsina têm como característica reagirem com subprodutos da presença de bactérias no meio, enquanto a enzima lisozima reage diretamente com a parede celular das bactérias Gram-positivas. Foram estudados e definidos todos os parâmetros necessários para a formação de filmes estáveis mantendo as enzimas em sua forma ativa. No primeiro sistema foi avaliada a detecção de *Escherichia coli* utilizando a técnica de Espectroscopia de Impedância Elétrica, obtendo resultados satisfatórios na detecção das bactérias em valores intermediários de 10^5 UFC. O segundo sistema de língua eletrônica foi composto por unidades sensoriais com as enzimas lisozima e tripsina imobilizadas por meio de ligações covalentes e eletrostáticas (*LbL*), podendo ocorrer reações tanto com subprodutos da presença bacteriana quanto diretamente com a parede celular das bactérias. Foram analisadas soluções contaminadas com as bactérias Gram-positivas *Staphylococcus aureus*, Gram-negativas *Salmonella* e também a mistura de ambas, sendo possível distinguir baixas concentrações das mesmas e na ordem de 10^3 UFC. Por último, verificou-se que o tratamento das soluções por meio da re-suspensão das bactérias influenciou positivamente nos resultados de detecção, suprimindo a influência da presença do meio de cultura nas repostas obtidas. A Língua Eletrônica apresentada foi capaz de distinguir soluções

contaminadas com bactérias, tendo potencial para auxiliar na prevenção de surtos de doenças transmitida por alimento.

ABSTRACT

DEVELOPMENT OF NANOMETRIC HYBRID PLATFORMS BASED ON POLYMER / ENZYME FOR BIOSENSORS APPLICATIONS.

Foodborne illness cases are common in Brazil and in the world. However, in many cases the microorganism causing the illness cannot properly identified. In addition, traditional analyses usually employed for identifying such microorganisms are often expensive and time consuming. In this context, the development of novel methods capable of detecting such microorganism in a fast way, similarly to a pre-selection method to indicate the positive or negative presence of pathogenic, are highly pursued. In this work, two systems using a concept of Electronic Tongue were developed. The first system used the Layer-by-Layer (LbL) technique to immobilize lysozyme, trypsin and pepsin enzymes in nanostructured films. In the second system, the immobilization process was combined using the LbL technique and covalent bonding for lysozyme and trypsin enzymes. The trypsin and pepsin can react with bacterial sub-products released in the medium, while the lysozyme can react directly with the gram-positive bacteria cell wall. All parameters required to obtain stable films with preserved enzymatic activity were investigated and determined. In the first case, the detection of *Escherichia coli* using the Electrical Impedance Spectroscopy yielded detection of bacteria at 10^5 UFC (intermediate values). The second electronic tongue was composed by sensing units formed by lysozyme and trypsin immobilized by covalent and electrostatic (LbL) bonds, allowing the reaction with either by products or with the bacterial cell wall. Contaminated solutions with the Gram-positive *Staphylococcus aureus*, Gram-negative *Salmonella* bacteria and a mixed solution with both were analyzed. The second system was able to detect small bacteria concentrations at 10^3 CFU. Finally, the solution re-suspension treatment showed to be beneficial for improving the detection results. The electronic tongue was capable of distinguishing solutions contaminated with bacteria, showing potential to aid in the prevention of foodborne diseases.

Sumário

1 - INTRODUÇÃO.....	1
2 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	3
2.1 - Sensores.....	3
2.2 - Biossensores	4
2.2.1 - Bioreceptor Enzimático.....	4
2.2.1.1 - Interação direta entre enzimas/bactérias	5
2.2.1.2 - Interação de enzimas com subprodutos da presença bacteriana	7
2.2.1.3 - Aplicações em Sensores.....	7
2.3 - Conceitos gerais sobre sensores químicos	8
2.3.1 - Uso de Microeletrodos Interdigitados	8
2.3.2 - Filmes Poliméricos Nanoestruturados	9
2.3.2.1 - Filmes Automontados por adsorção física (<i>Layer-by-Layer – LbL</i>) ...	9
2.3.3 - Imobilização de Biomoléculas em Filmes.....	11
2.3.3.1 - Dicroísmo Circular.....	14
2.3.4 - Espectroscopia de Impedância	15
2.4 - Conceito de Língua Eletrônica	17
2.4.1 - Análise das Componentes Principais (PCA)	19
3 - OBJETIVOS.....	21
3.1 - Objetivo Geral	21
3.2 - Objetivos Específicos.....	21
4 - MATERIAIS E MÉTODOS	22
4.1 - Sequência metodológica empregada nos experimentos	22
4.2 - Materiais	22
4.2.1 - Reagentes	22
4.2.2 - Microeletrodos Interdigitados (MEI).....	24
4.3 - Métodos	25

4.3.1 - Preparo de Amostras Biológicas	25
4.3.1.1 - Re-suspensão de Amostras Biológicas.....	27
4.3.1.2 - Microscopia Eletrônica de Varredura	27
4.3.2 - Desenvolvimento e Caracterização dos Filmes Sensitivos	28
4.3.2.1 - Preparo dos Substratos	28
4.3.2.2 - Ponto Isoelétrico (pI).....	28
4.3.2.3 - Fabricação dos Filmes Automontados	29
4.3.2.4 - Caracterização dos Filmes Sensitivos	29
4.3.2.5 - Dicroísmo Circular.....	29
4.3.3 - Medidas de Impedância Elétrica	30
4.3.4 - Tratamento e Análise dos Resultados Experimentais	30
5 - RESULTADOS E DISCUSSÃO	32
5.1 - Cinética de crescimento bacteriano.....	32
5.2 - Desenvolvimento e Aplicação de Arquiteturas Utilizando a Técnica de LbL.....	34
5.2.1 - Polaridade das Soluções Enzimáticas	34
5.2.2 - Cinética de Adsorção Enzimática.....	36
5.2.3 - Crescimento de Filmes Automontados.....	41
5.2.4 - Medidas de Espectroscopia de Impedância Elétrica (<i>E. coli</i>).....	47
5.3 - Imobilização de Enzimas via Ligação Covalente	56
5.3.1 - Medidas de Espectroscopia de Impedância Elétrica (<i>Samonella</i> e <i>S. aureus</i>).....	58
6 - CONCLUSÕES.....	67
7 - SUGESTÕES DE TRABALHOS FUTUROS.....	69
REFERÊNCIAS.....	70
TRABALHOS PRODUZIDOS NO PERÍODO.....	80
APÊNDICE I.....	82
APÊNDICE II.....	84

APÊNDICE III.....	85
ANEXO.....	87

1 - INTRODUÇÃO

Surtos de toxinfecção de origem alimentar ou doenças transmitidas por alimentos (DTA) são constantes em países desenvolvidos e em desenvolvimento. Dentre os agentes patogênicos frequentemente encontrados como causadores desses surtos podem ser citados a *Salmonella spp.* seguido da *Staphylococcus aureus* ¹. Dados do Ministério da Saúde ¹ indicam que em mais de 50% dos casos dos surtos de origem alimentar os agentes causadores de doenças não foram identificados, como pode ser observado na FIGURA 1.1:

Agentes etiológicos associados ao surtos de DTA. Brasil, 2000 a 2014*.

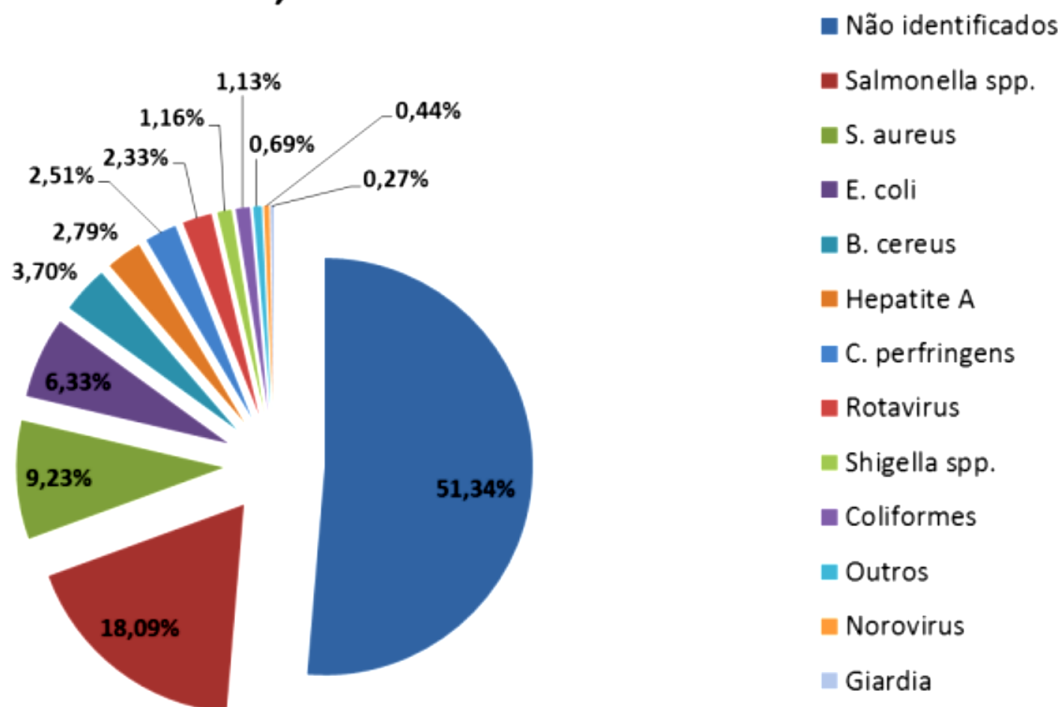


FIGURA 1.1 – Dados relacionados sobre os agentes etiológicos associados a surtos de doenças transmitidas por alimentos no Brasil entre os anos de 2000 a 2014. Fonte: Sinan Net/SV/MS ¹.

Surtos epidêmicos geram problemas à saúde humana e prejuízos ao sistema público de saúde, e também podem comprometer a economia relacionada ao comércio de produtos alimentares. Diagnósticos rápidos para a detecção de agentes nocivos podem prevenir os surtos epidêmicos, bem como permitir intervenções rápidas e a tomada de decisões correspondentes ². Geralmente, as

infecções são detectadas por isolamento e identificação da bactéria a partir de culturas fecais após várias etapas de cultura. A identificação é baseada nas propriedades bioquímicas e no fenótipo das respectivas bactérias. Estes métodos de rotina são precisos, mas são demorados e necessitam de atividades laboratoriais intensas, o que pode retardar a obtenção dos resultados^{2, 3}.

Dentre as técnicas tradicionais para detecção de bactérias, podem ser citadas as reações de polimerização em cadeia (PCR)^{4, 5}; ressonância plasmônica de superfície (SPR)^{3, 6}; microbalança de cristal de quartzo (QCM)^{7, 8}; ensaios imuno-enzimáticos eletroquímicos (ELISA)⁹, dentre outras¹⁰⁻¹². Embora sejam técnicas precisas e já bem estabelecidas, muitos estudos têm sido realizados visando o desenvolvimento de metodologias específicas que permitam o monitoramento e tomada de decisões em tempo real, e o desenvolvimento de dispositivos rápidos, simples e portáteis para facilitar a aplicação em campo, como o caso dos sensores e biossensores^{13, 14}.

2 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 - Sensores

Sensores são largamente empregados em diversas aplicações incluindo medidas de pH, humidade, processos bioquímicos ¹⁵, classificação de bebidas ^{16, 17}; em indústrias ¹⁸, sabor ¹⁹⁻²¹; detecção de bactérias e vírus ²²⁻²⁶; diagnósticos clínicos ²⁷ entre outros. De uma maneira geral, um sensor pode ser definido como um dispositivo capaz de detectar eventos ou alterações no meio e fazer a conversão (processo de transdução) do sinal em informações qualitativas e/ou quantitativas ¹⁴.

Especificamente, nos sensores químicos as variações nas respostas podem estar relacionadas à alterações na polaridade do meio, na variação de concentração do analito, mudança de estado de oxidação, etc. As repostas podem ser detectadas por meio de medidas das propriedades óticas, elétricas ou eletroquímicas como, por exemplo, condutividade, diferença de potencial e resposta à variação de frequência. O sinal gerado pelo contato do analito com a camada ativa do sensor, por processos químicos ou físicos, pode ser detectado por um transdutor apropriado e convertido em um sinal de saída. Este sinal é então processado utilizando ferramentas computacionais, visando obter os dados analíticos de interesse. Diversas propriedades são desejadas em sensores químicos, incluindo: alta velocidade de operação, reversibilidade, reprodutibilidade, sensibilidade, seletividade, robustez e estabilidade sobre condições operacionais. Entretanto, é desejável que a resposta do sensor não sofra grandes interferências pela presença de compostos interferentes (dependendo do analito em análise). Sensores químicos podem ser classificados em diversos tipos, sendo definidos por^{14, 28}:

- a) Natureza do analito a ser medido (sensores de pH, umidade, líquido ou gás);
- b) Tipo da espécie (ou camada) sensativa (sensores químicos ou biológicos);
- c) Princípio de transdução (potenciométrico, amperométrico, voltamétrico, impedimétrico, óptico, etc.);
- d) Mecanismo de reconhecimento molecular (microbiano, DNA, hibridização, enzimático, imunossensor, etc.);

- e) Especificidade (específico, semi-específico e sensores de seletividade global).

2.2 - Biossensores

Biossensores são geralmente definidos como dispositivos que utilizam um bioreceptor seletivo com afinidade para uma amostra ou um analito de interesse. O bioreceptor (geralmente uma espécie bioquímica como um anticorpo, um oligonucleotídeo ou ainda uma enzima) é acoplado a um transdutor que utiliza um típico mecanismo bioquímico de reconhecimento e converte o resultado de interação em um sinal mensurável ²⁹.

Baseado no elemento biológico, o biossensor pode ser classificado como biocatalítico (enzimas, células ou tecidos) ou por bioafinidade (antígenos, anticorpos ou fragmentos de DNA). Se baseado no tipo de transdutor, os biossensores podem ser eletroquímicos (amperométricos, potenciométricos, condutimétricos, impedimétricos); óptico (mudança de propriedades ópticas e/ou absorção ou emissão de radiação eletromagnética) e piezoelétrico (alteração de massa e/ou microviscosidade) ^{14, 30}. Para a escolha do bioreceptor, deve-se conhecer as características do elemento biológico a ser detectado e as possíveis interações que possam ser mensuradas. Com a definição do bioreceptor, pode-se definir qual transdutor a ser utilizado.

2.2.1 - Bioreceptor Enzimático

Enzimas são substâncias orgânicas de natureza geralmente proteica caracterizadas pela sua capacidade de efetuar ligações específicas e por sua atividade catalítica ³¹. Como substâncias bioreceptoras aplicadas em biossensores, elas podem detectar baixas concentrações de analitos biológicos quando comparadas a outros tipos de materiais ³². Os produtos ou subprodutos de reações enzimáticas podem ser eletroativos, podendo sua atividade ser acompanhada por métodos elétricos e/ou eletroquímicos. Durante as reações podem ser produzidos ou consumidos prótons e elétrons, resultando em variação no pH; ou mesmo a geração de outros íons, podendo ser monitorada sua atividade por meio de medidas condutimétricas ²⁹. Já as bactérias, uma vez em solução, podem reagir e modificar

as substâncias presentes no meio em que se encontram, gerando subprodutos, como proteínas e outras substâncias.

Em uma detecção global, ou seja, para determinar se há ou não a presença de bactérias presentes no meio e, posteriormente, realizar análises específicas, pode-se utilizar a combinação de uma ou mais enzimas que reajam diretamente com uma classe de bactérias ou com seus subprodutos. Para isso, dois tipos de interação podem ser analisadas: a interação das enzimas com os subprodutos da modificação do meio originados pela presença de bactérias; e a interação direta entre as enzimas e a parede celular das bactérias. Ambos os casos serão apresentados a seguir.

2.2.1.1 - Interação direta entre enzimas/bactérias

No caso da interação direta de enzimas com uma classe específica de bactérias, inicialmente deve-se considerar que as bactérias se dividem em dois grandes grupos: Gram-positivas e Gram-negativas. A principal diferença entre os grupos baseia-se na estrutura da parede celular, ilustradas na FIGURA 2.1. Nas bactérias Gram-negativas a parede celular é composta por várias camadas, sendo elas a membrana citoplasmática, o peptidoglicano e uma membrana externa. As Gram-positivas são formadas apenas pela membrana citoplasmática e o peptidoglicano, sendo este de maior espessura quando comparado ao da Gram-negativa ³¹.

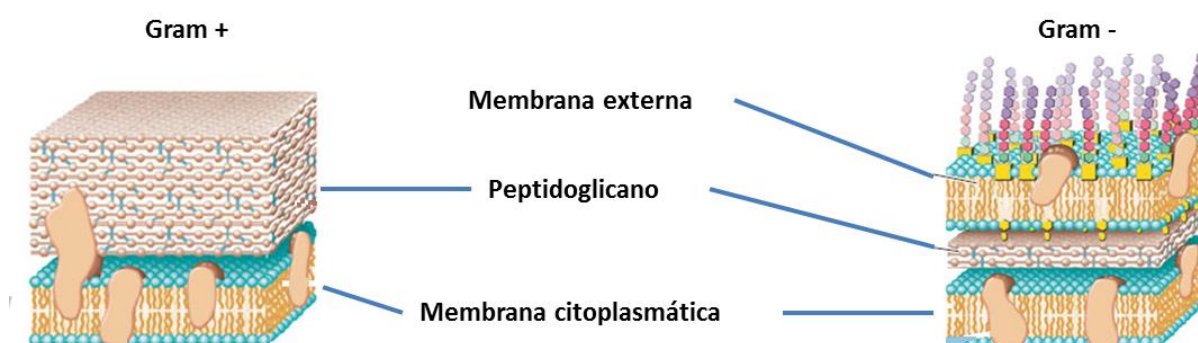


FIGURA 2.1 – Representação das estruturas das paredes celulares para as bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, indicados a Membrana citoplasmática, o Peptidoglicano e a Membrana externa. (Fonte ref. ³¹).

Em relação ao ciclo catalítico da enzima lisozima, sabe-se da literatura ³¹ que a mesma realiza a hidrólise de componentes das paredes celulares de bactérias, característica esta responsável pelas suas propriedades bactericidas. Inicialmente, o sítio ativo da lisozima interage com a parede celular da bactéria, realiza a quebra da ligação β (1-4) entre N-acetil ácido D-muramico e N-acetil D-glucosamina, levando ao rompimento das paredes celulares (*lises*) de bactérias Gram-positivas como *Staphylococcus* e *Streptococcus*, e de outras bactérias, neutralizando a propagação dos microrganismos ³¹, como demonstrado na FIGURA 2.2:

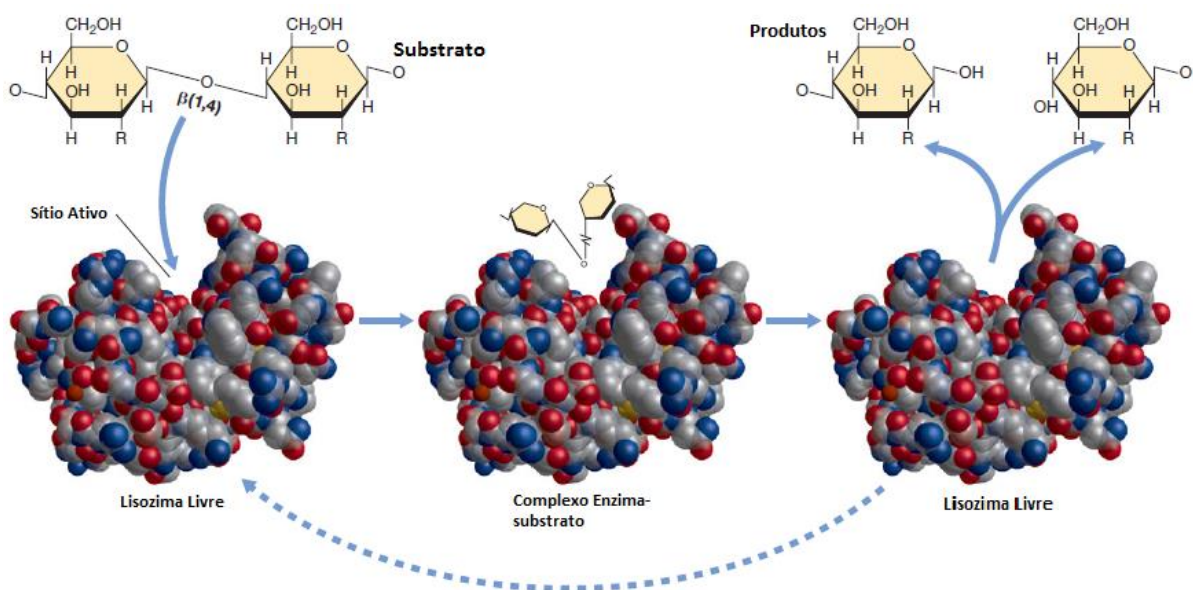


FIGURA 2.2 – Representação da interação entre a enzima Lisozima e o peptidoglicano presente na parede celular das bactérias Gram-positivas, resultando na *lises* celular. (Fonte ref. ³¹).

Já as bactérias Gram-negativas, como a *Salmonella* e *E. coli* são resistentes a *lises* com a presença da enzima lisozima, devido à presença da membrana externa e a pequena dimensão do peptidoglicano, mesmo ocorrendo a ruptura deste último ^{31, 33}.

Encontram-se estudos de seu uso como antibiótico (porém ainda não aprovado para uso clínico) ³⁶ e no tratamento de poluentes ambientais de resíduos sólidos e iodo ³⁶.

Outras enzimas, como a pepsina e a tripsina (apresentadas anteriormente como opções na hidrólise das ligações peptídicas das proteínas ou subprodutos da interação das bactérias com o meio), apresentam potenciais similares com conhecida ação antibacteriana ³⁷, além de apresentarem características filmogênicas ³², o que é particularmente interessante no processo de confecção de superfícies ativas ³⁸.

Dessa forma, pode-se ampliar o estudo em biossensores utilizando essas enzimas imobilizadas na superfície ativa dos eletrodos. Com a análise dos padrões de resposta elétrica-sensoriais entre a superfície modificada e bactérias ou mesmo os subprodutos provenientes da interação das bactérias com o meio, há a possibilidade do desenvolvimento de novas plataformas sensoriais utilizando enzimas.

2.3 - Conceitos gerais sobre sensores químicos

2.3.1 - Uso de Microeletrodos Interdigitados

Microeletrodos são eletrodos de dimensões micrométricas, e apresentam como característica uma maior velocidade na taxa de renovação de reagentes em sua superfície. A difusão de uma pequena quantidade de substâncias do seio da solução até a interface eletrodo/solução já é suficiente para ocasionar uma completa renovação desta, quando comparado à macroeletrodos convencionais, além de necessitar de menores concentrações de íons eletroativos na formação da dupla camada ³⁹. Os microeletrodos são capazes de monitorar pequenas mudanças nas propriedades elétricas dessa região ⁴⁰. No caso de microeletrodos interdigitados (MEI's), são considerados interessantes transdutores para utilização em biossensores, devido à possibilidade de miniaturização de dispositivos e integração com micro- e nanofluídica ⁴¹, além do grande número de pares de dígitos que podem contribuir múltiplas vezes para o aumento do sinal de detecção ⁴². A relação sinal-ruído melhora significativamente, melhorando os limites de detecção para concentrações de analito mais baixas. Quanto menor a distância entre os dígitos, maior poderá ser a relação de sinal obtido ⁴³. Se analisados com a

técnica de espectroscopia de impedância, os MEI's geralmente respondem à presença de bactérias na camada ativa ⁴⁴; apresentam baixa queda ôhmica ⁴¹; atingem rapidamente o estado estacionário e possuem uma rápida cinética de reação ³⁹.

2.3.2 - Filmes Poliméricos Nanoestruturados

Os MEI's podem ser modificados superficialmente utilizando filmes poliméricos nanoestruturados, com ou sem espécies/bio-espécies imobilizadas, gerando elementos sensoriais capazes de converter respostas de reações químicas/bioquímicas em sinais mensuráveis. Ainda, o uso de filmes nanoestruturados pode aumentar drasticamente a sensibilidade ¹⁴. Entre as técnicas empregadas com sucesso na produção de filmes com elevada organização em nível molecular, combinado a elevada sensibilidade e controle morfológico, estão as técnicas de Langmuir–Blodgett (*LB*) e automontagem por adsorção física (*LbL*, do inglês *Layer-by-Layer*). Em conjunto com estas técnicas, podem ser utilizados polímeros condutores, onde pequenas alterações em sua superfície ou na solução em análise podem gerar grandes mudanças em sua eletroatividade. Estes polímeros possuem a habilidade de transferir eficientemente a carga elétrica gerada por reações bioquímicas para o circuito eletrônico, que pode ser observada por técnicas elétricas/eletroquímicas ²⁹. Outra vantagem consiste na simplicidade em se funcionalizar a superfície polimérica com biomoléculas, servindo o polímero como matriz suporte e minimizando a desnaturação das biomoléculas ¹⁴.

2.3.2.1 - Filmes Automontados por adsorção física (*Layer-by-Layer* – *LbL*)

A técnica *LbL* utilizando polieletrólitos foi proposta inicialmente por DECHER et al. ^{45, 46} e baseia-se na adsorção física de materiais com cargas opostas por meio de interações intermoleculares, onde quaisquer materiais com cargas de sinais opostos podem ser imobilizados levando a formação de filmes nanoestruturados.

Para o crescimento de filmes *LbL*, a adsorção ocorre como resultado do processo da imersão alternada de um substrato sólido em soluções de

polieletrólitos catiônicos e aniônicos, sendo o excesso dos polieletrólitos fracamente adsorvidos removidos em etapas de lavagem ⁴⁵. Parâmetros como a rugosidade, espessura e porosidade dos filmes podem ser controladas mudando-se as condições experimentais como o pH, temperatura, concentração do polieletrólito e a força iônica do meio ¹⁴. A força motriz que governa o processo de crescimento de multicamadas é baseado em processos termodinâmicos ⁴⁷, e que envolvem, como reportado na literatura ^{48, 49}, interações hidrofóbicas entre as cadeias laterais dos polieletrólitos, forças de van der Waals e ligações de hidrogênio também podem influenciar na estabilização dos filmes. O efeito de interações coulômbicas entre as cadeias laterais do polieletrólito é atribuída, em parte, à natureza da compensação do contra-íon ⁵⁰.

A preparação de filmes poliméricos pela técnica de automontagem é relativamente simples, consistindo na imersão de um substrato sólido, previamente tratado, por um breve intervalo de tempo em uma solução aquosa contendo uma substância a ser depositada e que possua carga oposta à do substrato, formando um filme com espessura em torno de 1 – 10 nm. O substrato é então colocado na solução de lavagem, onde é retirado o excesso de material não adsorvido na superfície. O filme é seco e imerso novamente em uma solução contendo material de carga oposta. A repetição cíclica das etapas de adsorção resulta na formação de estrutura multicamada formando filmes ultrafinos. A FIGURA 2.4 ilustra esquematicamente o processo de fabricação de filmes finos pela técnica de automontagem.

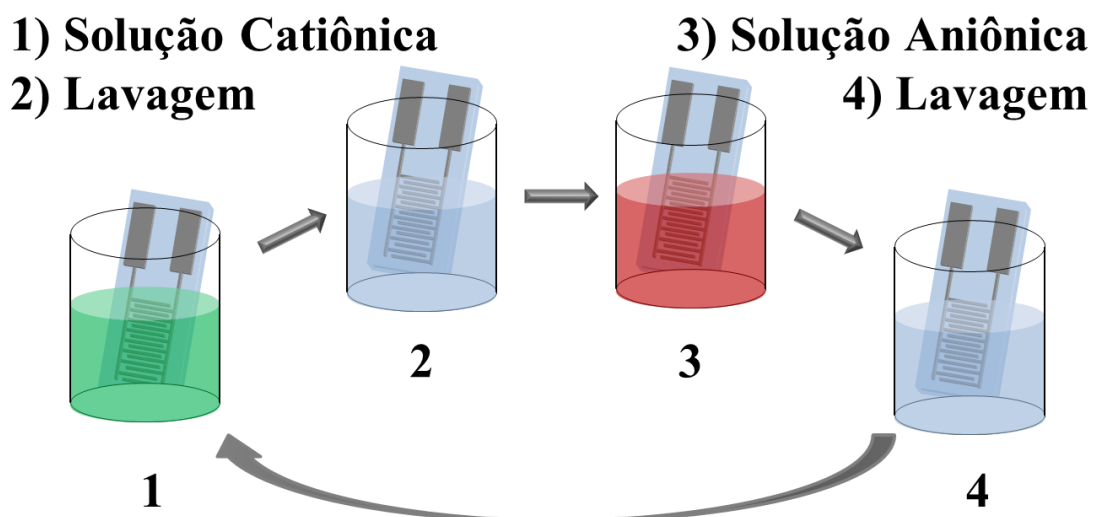


FIGURA 2.4 – Etapas do processo de automontagem (*LbL*) por adsorção eletrostática. (1) deposição do polycation; (2) lavagem e secagem do substrato; (3) deposição do polianion e (4) lavagem e secagem do substrato contendo camadas alternadas de polycation e polianion ¹⁴.

Comparado com outras técnicas de deposição de filmes, como a *LB*, a técnica *LbL* apresenta vantagens por ter baixo custo relativo; arranjo experimental e manipulações mais simples; possibilidade de produção em larga escala; não necessita de equipamentos sofisticados e pode ser realizada manualmente ¹⁴. A técnica mostra-se também promissora na utilização de biomateriais hidrossolúveis, como proteínas ⁵¹, enzimas ⁵² e DNA ⁵³.

2.3.3 - Imobilização de Biomoléculas em Filmes

A imobilização de biomoléculas (DNA, enzimas, anticorpos) na superfície de eletrodos ou juntamente com filmes automontados (*LbL*, *LB*) ou pela técnica de eletro-polimerização ⁵⁴ vem sendo extensivamente estudada visando a retenção de sua atividade catalítica; minimização do tempo de desnaturação ⁵⁵, podendo ser utilizada repetida e continuamente ³⁶. Segundo ZABORSKI et al. ⁵⁶, citado por BON et al. ³⁶, a classificação das enzimas imobilizadas pode ocorrer:

- pelo tipo de interação responsável pela imobilização;
- por meios químicos (com pelo menos uma ligação covalente entre os resíduos terminais de uma enzima e um grupo funcional do suporte, ou entre duas ou mais enzimas);
- por meios físicos: adsorção, interações eletrostáticas;

- encapsulação ou microencapsulação em matrizes poliméricas.

Já os trabalhos de KENNEDY e ROIG ⁵⁷, citado por BON et al. ³⁶, que consideram a combinação da natureza da interação responsável pela imobilização e o tipo de suporte utilizado, a interação das enzimas imobilizadas pode ser classificada por:

- cross-linking – ligação cruzada intermolecular ou reticulação (ligação em suportes);
- membranas semipermeáveis (reatores);
- ligada a outra macromolécula, mas ainda solúvel em água.

A escolha do suporte envolve características como área superficial (com preferência por alta porosidade e poros de pequeno diâmetro) e hidrofiliidade superficial, sendo os suportes com caráter hidrofílicos favoráveis, uma vez que os hidrofóbicos diminuem a estabilidade da enzima. Durante a imobilização podem ocorrer alterações de orientação e acesso do substrato ao sítio ativo, reduzindo a atividade da enzima, ou ainda reduzindo aparentemente a especificidade ao substrato.

A fabricação de biossensores com filmes *LbL* utilizando enzimas e polímeros condutores pode ser alcançada controlando-se o número de camadas depositadas nos substratos das unidades sensoriais. De acordo com a literatura, a dimensão da resposta em corrente pode estar relacionada com o número de camadas de enzimas ⁵⁸⁻⁶⁰.

A atividade biológica das enzimas é um parâmetro essencial e de extrema importância para um sensor. Uma técnica que pode ser empregada para avaliar essa atividade é o Dicroísmo Circular (DC), que auxilia na obtenção de detalhes estruturais de diferentes tipos de compostos, como proteínas; carboidratos; ácidos nucleicos; fármacos; etc, e será apresentado na seção 2.3.3.1 .

A seguir serão apresentados alguns trabalhos presentes na literatura que utilizam diferentes técnicas e combinações para a imobilização de biomoléculas:

LVOV et al. ⁵³, utilizaram a técnica de automontagem para imobilizar DNA utilizando poli(alilamina) (PAH) em camadas alternadas, obtendo dimensões na ordem de 40 Angstroms para cada bicamada (DNA/PAH). Em outro trabalho, LVOV

et al.⁵¹ demonstraram a eficiência do método de formação de camadas alternadas com biomoléculas (lisozima, citocromo, mioglobinas, etc.) e polieletrólitos (Poliestireno sulfonato e polietileno imina), utilizando a adsorção eletrostática. Foram propostos diferentes arranjos de arquiteturas com mono e multi-proteínas para possíveis utilizações em sistemas complexos. Porém, em ambos os trabalhos, não foi avaliada a atividade das biomoléculas após imobilização. HUANG et al.⁶¹ imobilizaram a enzima lisozima sobre uma superfície de SiO₂ para captura não específica dos microrganismos *Escherichia coli* (Gram-negativa) e *Listeria monocytogenes* (Gram-positiva). Utilizando a técnica de microscopia por fluorescência, os autores observaram que ambas as bactérias foram adsorvidas na superfície enzimática, e que essa adsorção era reduzida se em presença de *Tween 20* e albumina de soro bovino (BSA). ASSIS e CLARO⁶² imobilizaram a enzima lisozima em um filtro bioativo utilizando a técnica de automontagem e avaliaram sua atividade na remoção de *Escherichia coli* por meio do processo de filtração. Os resultados obtidos apresentaram uma redução de aproximadamente 75% da presença bacteriana. BALL e RAMSDEN⁶³ estudaram a adsorção de lisozima sobre superfície de Si(Ti)O₂ em dois diferentes pH's, evidenciando que em uma solução com menor força iônica a quantidade de material adsorvido é maior, e que a adsorção procede sem exclusão de superfície e por intermédio de ligações mais fracas. GOLE et al.⁶⁴ estudaram a adsorção de pepsina com octadecil amina (ODA) sobre lâminas de quartzo e determinaram um tempo de 10 min para que a curva de cinética de crescimento alcançasse o platô de estabilidade, caracterizando a finalização de difusão de moléculas para a superfície. O crescimento do filme foi baseado na estrutura positiva do ODA em pH 3,0 do meio e na estrutura negativa da pepsina, por esta ter um ponto isoelétrico (PI) em pH ~1,0. Segundo VOET et al.³³ sinais elétricos podem ser gerados após a interação bactéria - sistema sensorial (filme enzimático / eletrodo interdigitado).

Visando medir as respostas provenientes do transdutor, sendo elas pequenas alterações nas propriedades dos filmes superficiais devido às reações bioquímicas, assim como pequenas mudanças na solução em análise, a técnica de Espectroscopia de Impedância tem apresentado resultados rápidos e satisfatórios⁶⁵. O uso desta técnica permite o entendimento dos mecanismos de interação entre o sistema de reconhecimento e o analito⁶⁶. Os princípios para utilização desta técnica serão apresentados na seção 2.3.4.

2.3.3.1 - Dicroísmo Circular

Enzimas apresentam cadeias polipeptídicas que tendem a dobrar-se de modo a formar uma estrutura mais estável. Essas estruturas mais estáveis são as estruturas secundárias, formadas devido a ligações de hidrogênio dos átomos de oxigênio e nitrogênio de duas ligações peptídicas, gerando estruturas bem características, sendo a α -hélice e folhas- β as mais comuns, ilustradas na FIGURA 2.5 ³¹:

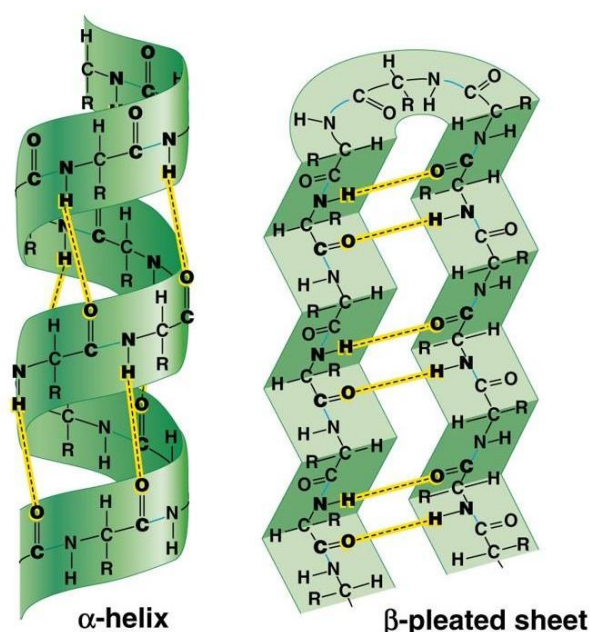


FIGURA 2.5 - Estrutura secundária de polipeptídeos. Representadas as estruturas α -hélice e folhas- β . Em destaque as ligações de hidrogênio entre átomos de diferentes ligações peptídicas. (Fonte ref. ³¹).

Sem a presença destas ligações de hidrogênio, as estruturas secundárias não são estáveis ocasionando uma conformação linear das cadeias polipeptídicas, resultando na desnaturação das enzimas.

A análise de DC consiste na diferença de absorção da luz polarizada circularmente à esquerda (LPC-E) e a luz polarizada circularmente à direita (LPC-D) e ocorre apenas quando a molécula contém um ou mais grupos quirais que absorvam luz, como no caso das enzimas ⁶⁷. Devido à sua característica quiral, as enzimas apresentam um meio anisotrópico no qual a LPC-E e a LPC-D propagam em diferentes velocidades. A utilização do DC permite determinar rapidamente a presença das estruturas secundárias, sendo possível distinguir conformações α -

hélice e folhas- β quando realizada varredura na região espectral do UV entre 190-250 nm. O sinal de DC poderá ser positivo ou negativo, dependendo da proporção entre a absorção da luz polarizada à direita e à esquerda. A realização de medidas antes e após a imobilização das enzimas nos filmes automontados auxilia a avaliar se estas continuam em sua forma ativa, com a presença das estruturas secundárias, ou desnaturadas, com a ausência das bandas características.

2.3.4 - Espectroscopia de Impedância

Medidas de espectroscopia de Impedância provêm informações que podem ser correlacionadas com a atividade bacteriana através da composição e variação do meio. As bactérias produzem metabólitos em contato com o meio, mudando a sua composição, e conseqüentemente mudando as respostas na impedância elétrica ⁶⁸⁻⁷⁰. De um modo geral, medidas de impedância podem ser divididas em duas categorias: Faradaica e não-Faradaica ⁴⁰. A impedância Faradaica necessita da presença de um par redox, enquanto impedância não-Faradaica pode ser realizada na ausência deste ³⁹. O uso da técnica de espectroscopia de impedância utilizando eletrodos modificados com filmes superficiais foi discutido por Taylor e MacDonald ⁷¹. Foi proposto o uso de circuitos equivalentes para a análise e caracterização do sistema, podendo ser identificadas mudanças na dupla camada elétrica, na solução eletrolítica e no filme depositado, conforme apresentado esquematicamente na FIGURA 2.6:

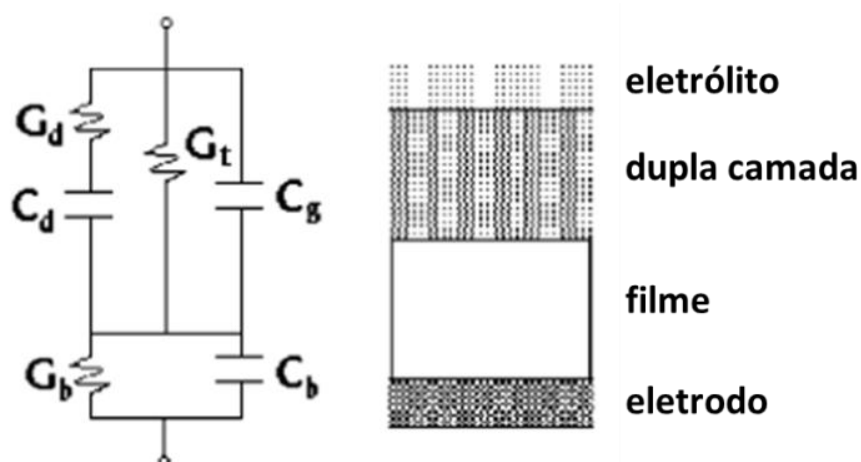


FIGURA 2.6 – Circuito equivalente para eletrodo metálico recoberto com filme condutor (Retirado da ref. ⁷²).

Neste circuito equivalente, a presença do filme que recobre o eletrodo é representada pela combinação paralela do capacitor C_b com o resistor G_b . Estes componentes estão em série com a impedância do eletrólito que contém três outros componentes: a capacitância geométrica do espaço inter-eletrodo preenchido com o eletrólito (C_g); a capacitância da dupla camada (C_d), que é carregada a partir da resistência da solução (G_d); e a resistência total do eletrólito representada por ($G_d + G_t$). G_t permite a transferência de carga através da interface filme/eletrólito ^{71, 72}.

A dependência da capacitância total (C) com a frequência, referente ao circuito equivalente apresentado na FIGURA 2.6 está apresentada na FIGURA 2.7.

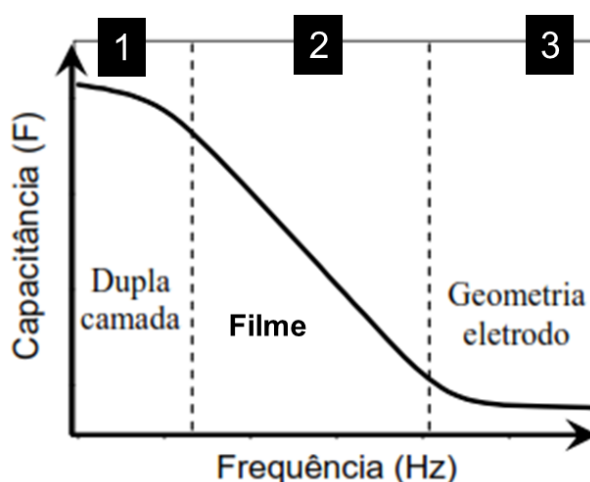


FIGURA 2.7 – Representação da dependência da Capacitância vs. Frequência para o circuito equivalente apresentado na FIGURA 2.6. Indicadas as regiões: (1) baixas frequências – correlacionado com as modificações na dupla camada; (2) médias frequências - correlacionado com as modificações no filme; (3) altas frequências – correlacionado com as características geométricas do eletrodo e da solução.

A região de baixa frequência (1) sofre efeito majoritário de modificações referentes à dupla camada, enquanto a região de médias frequências (2), entre $10^2 - 10^4$ Hz apresentam efeitos dos filmes sobre os eletrodos. Em frequências acima de 10^5 Hz (3), a impedância do sistema está relacionada com os resultados da capacitância geométrica e da solução ⁷¹⁻⁷³.

A detecção de bactérias patogênicas em amostras alimentícias pode ocorrer por meio do monitoramento da condutividade ou da impedância das amostras. Esta detecção é possível porque o metabolismo bacteriano modifica a concentração do eletrólito do meio em que está suspensa, alterando significativamente as características elétricas ⁷⁰. Medidas em uma frequência ou em

múltiplas frequências tornam o uso desta técnica muito sensível na detecção de fenômenos ocorridos na interface eletrodo/solução ⁷⁴. Com o intuito de simplificar as medidas de impedância, sem a necessidade da utilização de eletrodos de referência (o que facilita na miniaturização do sistema) e sem a presença de pares redox, vem sendo muito utilizada as análises de Impedância Elétrica, onde pode-se avaliar variações na resistência e na capacitância em uma larga faixa de frequência, abrangendo todas as regiões e interfaces onde podem ocorrer as interações/detecções entre eletrodo/analito ⁷⁰.

2.4 - Conceito de Língua Eletrônica

HAYASHI et al. ⁷⁵ em 1990 introduziram o primeiro sistema de multisensores para análise de líquidos, baseado em um sensor não específico, referido por diversos autores como língua eletrônica ^{76, 77}. No Brasil, a Língua Eletrônica foi desenvolvida pela parceria de pesquisadores da Embrapa Instrumentação e da Universidade de São Paulo (USP) ^{77, 78}. Foi desenvolvido um conjunto de sensores recobertos com diferentes filmes nanométricos, utilizando polímeros condutores, que por meio da técnica de espectroscopia de impedância simplificaram o processo de discriminação das amostras sem a necessidade da utilização de eletrodos de referência ⁷⁹, facilitando a miniaturização do sistema. O conceito inicial baseou-se em realizar a detecção, quantificação e avaliação do sabor em alimentos líquidos e sólidos, diferenciando os padrões básicos de paladar, doce, salgado, azedo e amargo, em concentrações abaixo do limite de detecção do ser humano ⁷⁹⁻⁸².

Os dados obtidos na língua eletrônica são normalmente baseados em uma seletividade global ^{14, 83, 84}. A natureza não específica do conjunto de sensores leva a discriminação de grupos de substâncias, em que o cruzamento das respostas de sensibilidade e os efeitos de supressão fornecem uma impressão digital única de cada amostra ^{14, 28, 83}. Quando colocados em contato com o analito a ser analisado, os diferentes filmes nanoestruturados das unidades sensoriais sofrem alterações em suas propriedades elétricas, que são medidas por meio de instrumentação eletrônica adequada. Todos os resultados experimentais são coletados e analisados por meio de técnicas computacionais e estatísticas, como a Análise das Componentes Principais (PCA, do inglês *Principal Component Analysis*) ^{77, 79}, redes neurais ⁸⁵,

Projection Explorer for Sensors/Interactive Document Mapping (PEX-Sensors/IDMAP) ⁸⁶, bem como outras técnicas de visualização de dados ⁸⁷. A técnica de análise por PCA será discutida na seção 2.4.1 e as análises utilizando o PEX-Sensors/IDMAP serão apresentadas no APÊNDICE I.

A língua eletrônica foi largamente utilizada na identificação e classificação de líquidos com composições complexas e similares ^{88, 89}. Destaca-se a possibilidade de sua utilização para a determinação de substâncias tóxicas e de sabor desagradável em alimentos líquidos e sólidos ⁹⁰⁻⁹⁴.

De um modo geral, a língua eletrônica é composta por ^{28, 76, 95}:

- Célula de medida: onde ocorre o contato entre o analito e os sensores;
- Arranjo de sensores: composto por distintas unidades sensoriais, com diferentes graus de sensibilidade a íons ou moléculas, que geram uma “impressão digital” característica para cada analito;
- Multiplexador: equipamento que permite a coleta de dados de múltiplas unidades sensoriais de maneira sequencial e controlada;
- Analisador de impedância: equipamento que irá realizar as medidas de impedância elétrica e captar as respostas do sistema, como variações na condutividade, resistência e capacitância, em função da frequência;
- Aquisição de dados: computador com software específico para captar e analisar os dados.

Na FIGURA 2.8 está representado o conjunto que compõe uma Língua Eletrônica:

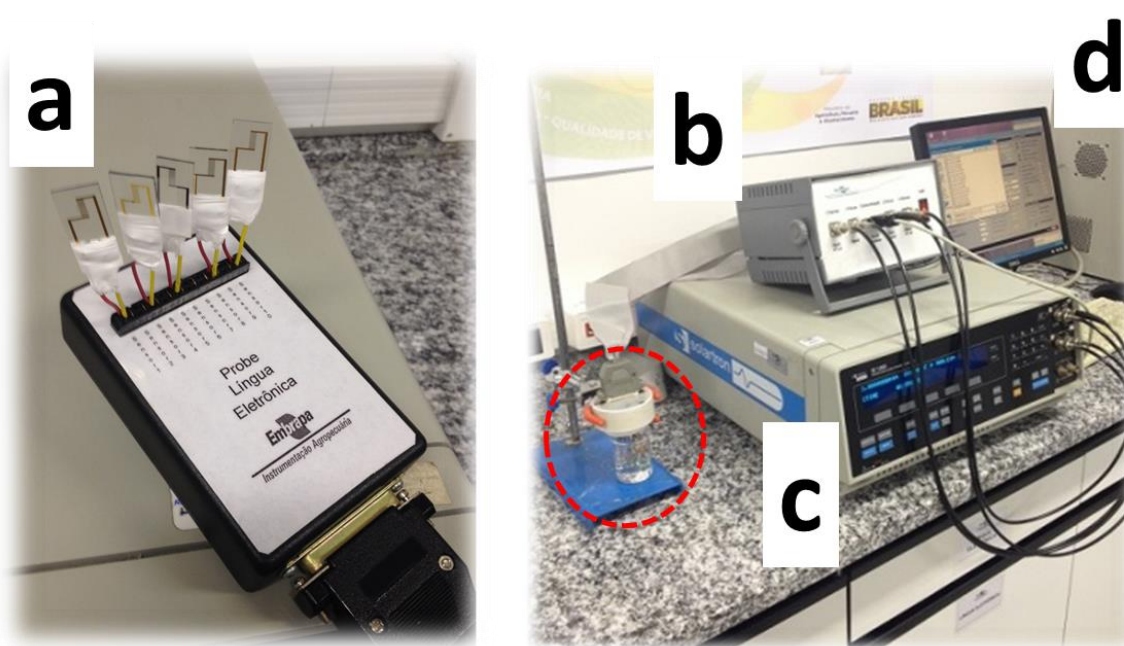


FIGURA 2.8 – Língua Eletrônica: a) arranjo de sensores; b) multiplexador; c) analisador de impedância; d) aquisição e tratamento de dados (computador). (Fonte: ref. ⁹⁶).

2.4.1 - Análise das Componentes Principais (PCA)

A PCA é um procedimento matemático que emprega transformações ortogonais para converter um conjunto de dados multi-variáveis em um conjunto de variáveis com dimensionalidade reduzida chamadas componentes principais (CP). É uma técnica de análise linear baseada em dados estatísticos como a covariância, que possibilita investigar um grande número de dados, identificando as medidas responsáveis pelas maiores variações entre os resultados, sem perdas de informações. Ela transforma um conjunto original de variáveis em um conjunto de componentes principais, sendo o número de componentes principais igual ao número de variáveis.

Um dos principais usos desta técnica ocorre quando as variáveis são originárias de processos em que diversas características devem ser observadas ao mesmo tempo. Ela permite o agrupamento de indivíduos similares mediante exames visuais, em dispersões gráficas de fácil interpretação geométrica ^{77, 97}.

O tratamento do banco de dados é realizado criando-se uma matriz com os resultados de cada amostra dispostos em linhas (objetos) e os diferentes sensores (variáveis) nas colunas. Em seguida, realiza-se uma normalização, pois a

matriz de dados construída apresenta diferentes variáveis (sensores) com magnitudes distintas. Nesta etapa a matriz é centrada na média dos valores subtraindo-se o valor de cada elemento da matriz da média de cada variável (coluna) e, em seguida, é normalizada pelo desvio padrão (dividindo-se o valor de cada elemento centrado na média pelo desvio padrão da variável). O propósito dessa transformação é permitir que todas as variáveis possam exercer influências equitativas nos resultados, além de torná-las adimensionais ⁹⁸. Em seguida, os dados estão prontos para serem submetidos à análise das componentes principais. Existe uma grande variedade de programas computacionais disponíveis para realizar análise multivariada e a análise de componentes principais, dos quais podemos citar os comerciais *Statistica*[®], *Unscrambler*[®], *Minitab*[®], *Pirouette*[®] e *Origin Lab*[®], ou mesmo escrever rotinas para o *Matlab*[®] e para o programa livre GNU *Octave*[®]. Os detalhes das operações estatísticas realizadas pelos softwares podem ser encontrados no ANEXO ⁹⁸ do presente trabalho.

3 - OBJETIVOS

3.1 - Objetivo Geral

Este trabalho teve como objetivo principal desenvolver plataformas nanométricas híbridas baseadas na interação de polímeros com enzimas visando aplicação em biossensores globais utilizando o conceito de Língua Eletrônica.

3.2 - Objetivos Específicos

- Empregar a técnica de automontagem para a formação de filmes finos depositados sobre substrato condutor, incluindo filmes de enzimas e filmes poliméricos;
- Avaliar a cinética de crescimento de colônia bacteriana;
- Estudar por espectroscopia no Ultravioleta-Visível o crescimento dos filmes automontados;
- Determinar as melhores condições de deposição de filmes nanoestruturados poliméricos e enzimáticos nos eletrodos;
- Avaliar a utilização das plataformas propostas na detecção de bactérias.

4 - MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 - Sequência metodológica empregada nos experimentos

A sequência da metodologia utilizada nos experimentos está representada na FIGURA 4.1:. Iniciaram-se os estudos da cinética de adsorção das enzimas e crescimento dos filmes, os quais foram caracterizados pelas técnicas de espectroscopia de absorção UV-Vis e Dicroísmo Circular e posteriormente foram realizadas as medidas de detecção utilizando a técnica de espectroscopia de impedância. Paralelamente foi realizado o estudo da cinética de crescimento bacteriano.

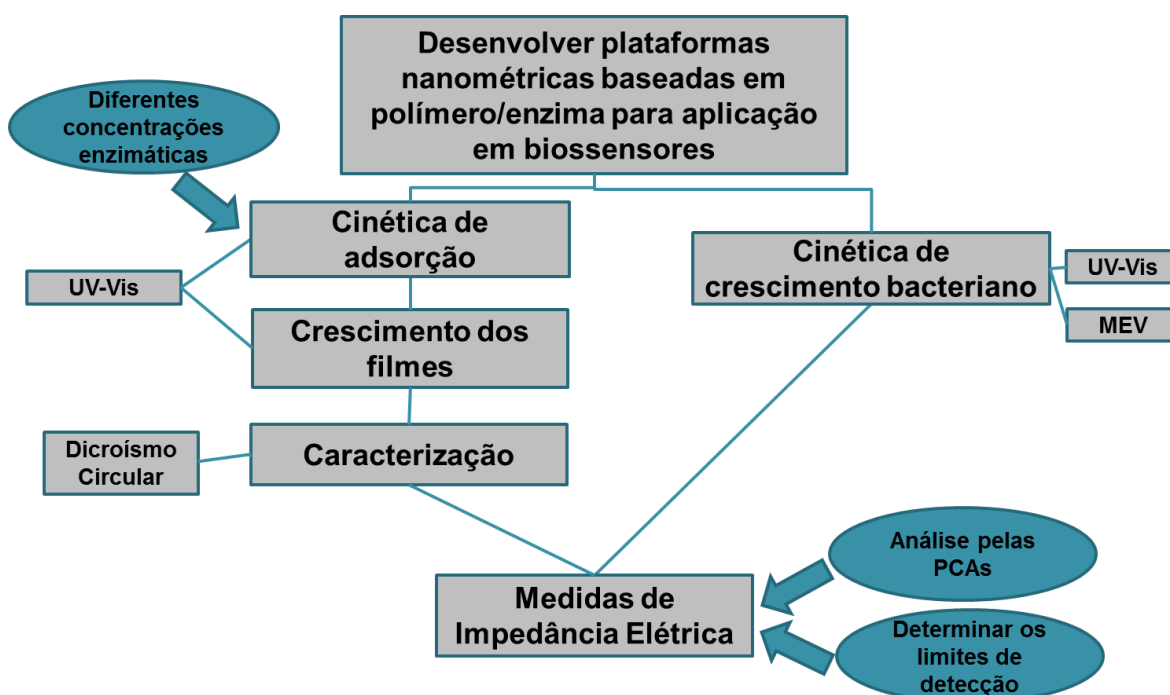


FIGURA 4.1: Fluxograma da metodologia utilizada no presente trabalho.

4.2 - Materiais

4.2.1 - Reagentes

Todas as enzimas e meio de cultura empregadas neste trabalho foram adquiridas da Sigma Aldrich: Lisozima (originária da clara do ovo de galinha, código L6876, com ≥ 40.000 unidades/mg de proteína); Tripsina (originária do pâncreas

bovino, código T8003, com ~10.000 unidades/mg de proteína); Pepsina (originária da mucosa gástrica suína, código P6887, com 3.200 - 4.500 unidades/mg de proteína); meio de cultura Triptona de Soja. A Lisozima tem como característica clivar o peptidoglicano ³¹, já a Tripsina e a Pepsina podem reagir com os subprodutos oriundos da interação das bactérias com o meio ³⁴.

As bactérias gram-negativas *Salmonella Typhimurium* CCCD S004, *Escherichia coli* ATCC 25922 e a gram-positiva *Staphylococcus aureus* foram adquiridas na Cefar Diagnostica e cultivadas no Laboratório de Amostras Biológicas da Embrapa Instrumentação. Estas três bactérias são as principais causadores de surtos por intoxicação de origem alimentar.

As soluções tampão foram preparadas em água destilada utilizando fosfato de sódio monobásico (NaH_2PO_4), fosfato de sódio dibásico (Na_2HPO_4), Trizma básica ($\text{NH}_2\text{C}(\text{CH}_2\text{OH})_3$) e Trizma hidrocloreto ($\text{NH}_2\text{C}(\text{CH}_2\text{OH})_3 \text{HCl}$) adquiridos na Sigma-Aldrich, e ácido fosfórico (H_3PO_4), ácido hidrocloreto (HCl) e cloreto de sódio (NaCl), adquiridos na Synth.

Para o crescimento dos filmes e imobilização das enzimas, foram utilizados polímeros já empregados no grupo de pesquisa visando o desenvolvimento de plataformas sensoriais baseados em filmes nanoestruturados, os quais incluem o hidrocloreto de polialilamina (PAH, Mw ~58.000) como policação e o Poliestireno-sulfonato (PSS, Mw ~70.000) como poliânion. O glutaraldeído 2.5% (Mw ~100,12) foi empregado visando formar ligações covalentes entre as enzimas e a superfície modificada dos eletrodos. Todos os reagentes empregados são da marca Sigma Aldrich. As soluções foram preparadas utilizando água destilada. A FIGURA 4.2 mostra a estrutura química dos polímeros utilizados:

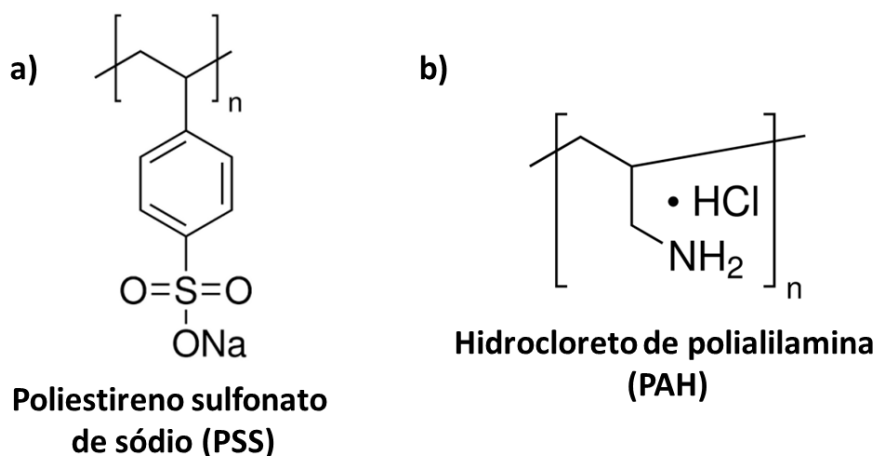


FIGURA 4.2 – Estrutura química dos polímeros a) Poliestireno-sulfonato de sódio (PSS) e b) hidrocloreto de polialilamina (PAH).

4.2.2 - Microeletrodos Interdigitados (MEI)

Para as medidas de espectroscopia de impedância, foram utilizados microeletrodos interdigitados de platina e de ouro fabricados pela técnica de fotolitografia⁹⁹ no LNNano (CNPEM). Os eletrodos foram fabricados sob lâminas de Quartzo, contendo 50 pares de dígitos, cada um com 10 μm de largura, 3 mm de comprimento e espaçamento entre-dígitos de 10 μm , conforme ilustrado na FIGURA 4.3:

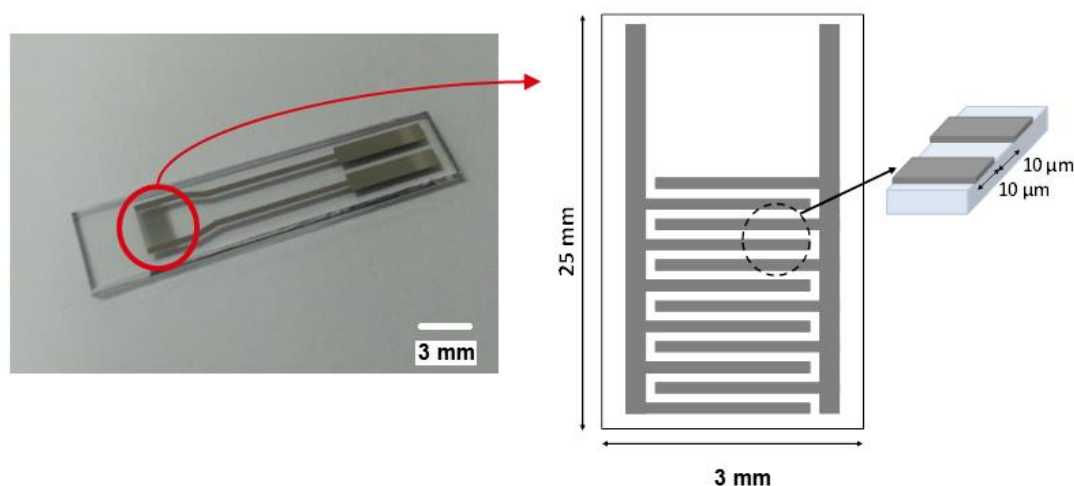


FIGURA 4.3 - Vista real (esquerda) e esquemática (direita) dos microeletrodos interdigitados utilizados na fabricação dos sensores, com detalhe mostrando a região dos dígitos.

Previamente à utilização, os eletrodos foram limpos através da imersão em solução de extran 40% utilizando ultrassom durante 30 minutos; posteriormente, os eletrodos foram limpos utilizando esponja e água abundante, seguido de re-imersão em ultrassom com água destilada e armazenados em álcool isopropílico até a utilização.

4.3 - Métodos

4.3.1 - Preparo de Amostras Biológicas

As amostras biológicas foram preparadas seguindo os devidos padrões de segurança: todo manuseio foi realizado em capela de fluxo laminar, com lâmpada UV germicida ligada por 1 hora antes de cada manipulação e com bico de Bunsen aceso por pelo menos 10 min antes de cada manipulação. Além de procedimentos de rotina, todos os aparatos foram previamente esterilizados com álcool etílico 70%. Todas as manipulações foram realizadas próximas ao bico de Bunsen. Para se compreender as fases de crescimento bacteriano, uma curva padrão pode ser utilizada como exemplo na FIGURA 4.4 ¹⁰⁰:

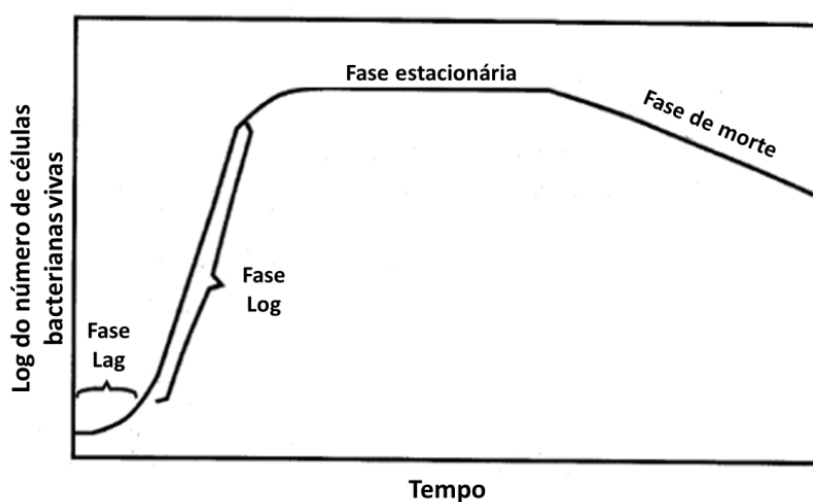


FIGURA 4.4 – Curva padrão de crescimento bacteriano. Indicadas as fases: Lag, Log, Estacionária e Fase de Morte. (Fonte ref. ¹⁰⁰).

No início do processo de crescimento, ocorre a fase Lag onde a bactéria recém-diluída no meio de cultura se estabiliza e inicia a multiplicar-se atingindo a fase logarítmica. Nesta fase, a velocidade de reprodução bacteriana é elevada, apresentando comportamento exponencial, devido à abundância de nutrientes no meio, favorável ao seu crescimento. Após um período, as velocidades de crescimento e de morte das bactérias se igualam, alcançando a fase estacionária. Após a fase estacionária, a quantidade de nutrientes em solução não é suficiente para manter a velocidade de crescimento estável, onde a velocidade de

morte das bactérias torna-se maior que a de crescimento, iniciando a fase de morte. Para a realização de experimentos, necessita-se definir o tempo de crescimento mínimo necessário para se atingir a fase estacionária, garantindo que não haverá variação da concentração do meio em análise durante as medidas.

Inicialmente, as bactérias foram adquiridas na forma de ampolas com cultura liofilizada e recomendação de uso em temperatura de 37 °C. O cultivo bacteriano inicial foi realizado em placas de Petri com meio de cultura sólido Luria-Bertani (LB) (etapa realizada pelo Laboratório de Amostras Biológicas da Embrapa Instrumentação). A partir desta cultura em meio sólido foram retiradas alíquotas de colônias bacterianas e diluídas no meio de cultura líquido (MC) de Triptona de soja, permanecendo incubadas a 37 °C sob agitação. Pequenas alíquotas foram retiradas em diferentes intervalos de tempo onde mediu-se a absorbância no comprimento de onda de 625 nm utilizando a técnica de espectroscopia de absorção UV-Vis contra o padrão McFarland No. 0.5, até obter-se o perfil de crescimento chegando a fase estacionária. Definido o tempo de crescimento para atingir a fase estacionária, este foi utilizado para todos os crescimentos subsequentes.

Para cada conjunto de medidas, foi realizado o cultivo de novas bactérias. Após o tempo de incubação padrão, retirou-se uma alíquota da solução de meio de cultura com as bactérias cultivadas e verificou-se a absorbância das mesmas vs a solução padrão McFarland 0.5. Esta solução padrão possui uma turbidez equivalente a 1.5×10^5 Unidades Formadoras de Colônia (UFC). Realizando uma regra de três simples, pode-se determinar a concentração das bactérias presentes em solução. Após obtida a concentração inicial, retiraram-se alíquotas para preparo das soluções de trabalho com diferentes concentrações de UFC's por meio do método de diluição em série. Para o primeiro conjunto de arquiteturas estudadas, foi preparada a bactéria Gram-negativa *E. coli*. As bactérias foram diluídas utilizando água destilada até atingir as concentrações de 10^3 , 10^5 , 10^7 UFC. As alíquotas utilizadas no preparo dessas soluções continham, além da bactéria em estudo, a presença do meio de cultura utilizado no crescimento das bactérias. Dessa forma, foram preparados soluções com a concentração equivalente apenas de MC a fim de ser utilizado como o branco correspondente às respectivas concentrações de bactéria durante as medidas de impedância.

Para o segundo conjunto de arquiteturas, foram preparadas as bactérias Gram-negativas *Salmonella* e Gram-positivas *Staphylococcus aureus*

conforme procedimento já descrito. Após conhecida a concentração inicial das bactérias pós-crescimento, estas foram diluídas em solução tampão fosfato (PBS) 0.1 M e, posteriormente, realizada a re-suspensão em PBS, com o intuito de atenuar a presença do meio de cultura (MC) na solução.

Conhecida a concentração de 10^5 UFC para se considerar uma solução contaminada ^{39, 70}, o intervalo de concentrações entre $10^3 - 10^7$ UFC mostrou-se adequado para o presente estudo.

4.3.1.1 - Re-suspensão de Amostras Biológicas

A re-suspensão foi realizada adicionando-se 3 mL da amostra inicial em um eppendorf e centrifugada a 5.000 rpm durante 15 min. Retirou-se o líquido sobrenadante e completou-se o volume com PBS até atingir o volume inicial. Este procedimento foi realizado por 3 vezes. Depois de completada a etapa de re-suspensão, foram preparadas as soluções com as concentrações de 10^3 , 10^5 , 10^7 UFC (utilizando a diluição em série com PBS). Como a presença do MC foi atenuada nas soluções a serem analisadas, pode-se utilizar soluções padrões de PBS 0.1 M como branco.

4.3.1.2 - Microscopia Eletrônica de Varredura

A morfologia das bactérias foi observada utilizando um microscópio eletrônico de varredura (MEV) modelo Zeiss DSM960, com distância de trabalho de 11 mm e tensão de 5 kV. As superfícies das amostras foram recobertas com ouro com auxílio de um metalizador Balzer, SCD 050.

Para fixação das bactérias, seguiu-se o procedimento:

- tratou-se os substratos (pequenas lâminas de vidro) com solução aquosa de Poly-L-Lysine 0.1 %;
- recobriu-se a superfície dos substratos com as bactérias *Salmonella* e *E. coli* na concentração de 10^7 UFC;
- imergiu-se o substrato em 500 μ L do fixador de Karnovsky ¹⁰¹ durante 4 horas;

- lavaram-se as amostras com água deionizada e desidrataram-se as bactérias em imersões de 10 minutos consecutivos em soluções de 30, 50, 70, 90 e finalizando com 3 × 100 % de acetona;

- por último, secaram-se as amostras com o auxílio de um liofilizador.

4.3.2 - Desenvolvimento e Caracterização dos Filmes Sensoativos

4.3.2.1 - Preparo dos Substratos

Os substratos utilizados no estudo de crescimento dos filmes foram lâminas de quartzo de dimensões padronizadas apropriadas para medidas em espectrômetro de absorção na região do ultravioleta e no visível (UV-Vis). Os substratos foram previamente limpos com solução de ácido nítrico (HNO_3) 10% mantidos durante 5 minutos em ultrassom e posteriormente lavados abundantemente com água destilada. O procedimento foi repetido por 3 vezes. Após a limpeza, os substratos foram armazenados em álcool isopropílico, sendo secos com gás nitrogênio previamente ao uso. Este tratamento teve como objetivo efetuar a limpeza do quartzo para remover possíveis impurezas que poderiam influenciar o processo de adsorção dos filmes e também deixar a superfície com uma característica hidrofílica ¹⁰².

4.3.2.2 - Ponto Isoelétrico (pI)

Para o crescimento de filmes utilizando a técnica de *LbL*, faz-se necessário conhecer a polaridade das soluções. Estas informações foram obtidas definindo-se o ponto isoelétrico em medidas de potencial Zeta, utilizando o equipamento Zetasizer Nano ZS Zen 3600 (Malvern Instruments). Foram preparadas soluções 0.5 mg/mL de cada enzima, utilizando água deionizada, onde variou-se o pH com soluções de KOH e HCl, até obtenção de um intervalo suficiente para a definição do pI.

4.3.2.3 - Fabricação dos Filmes Automontados

Os filmes automontados foram fabricados pela imersão dos substratos em soluções catiônicas e aniônicas de forma alternada. Os substratos foram fixados em um suporte e imersos em béqueres de 5 mL contendo aproximadamente 3 mL da solução de interesse.

Para o crescimento dos filmes, foi utilizada a sequência ^{103, 104}:

- imersão em solução polimérica 0.5 mg/mL por 3 minutos;
- imersão em solução de lavagem (H₂O) por 30 segundos, para retirar o excesso e os íons não fortemente adsorvidos na superfície;
- secagem utilizando jato de gás nitrogênio;
- imersão em solução polimérica ou solução enzimática de polaridade contrária à previamente utilizada;
- repetida a etapa de lavagem por 30 segundos e secagem.

Estas etapas foram repetidas até a obtenção do número de camadas desejadas. Como solução de lavagem pós-imersão em solução polimérica foi utilizada H₂O, para lavagem pós-imersão em solução enzimática foi utilizada a respectiva solução tampão.

4.3.2.4 - Caracterização dos Filmes Sensoativos

Medidas de espectroscopia de absorção UV-Vis foram utilizadas para caracterizar a cinética de adsorção enzimática, ou seja, o tempo mínimo necessário para que a maior quantidade de material se adsorva na superfície do substrato, assim como monitorar o crescimento dos filmes automontados através da absorbância em função do número de bicamadas depositadas. Os resultados de absorbância foram obtidos em um espectrofotômetro UV-Vis da Perkin-Elmer, modelo Lambda 25, no intervalo de comprimento de onda de 200 a 350 nm.

4.3.2.5 - Dicroísmo Circular

Para verificar se as enzimas continuaram ativas após a imobilização, foram verificadas as presenças das estruturas secundárias características das enzimas por meio da análise por Dicroísmo Circular com o auxílio do

espectropolarímetro Jasco, modelo J-715 no intervalo de comprimento de onda de 190 a 260 nm.

4.3.3 - Medidas de Impedância Elétrica

As medidas de Impedância Elétrica para detecção das bactérias foram realizadas variando-se a frequência da tensão elétrica, medindo a resposta do sistema com o auxílio do Analisador de Impedância Solartron Analytical 1260.

Ao utilizar uma voltagem AC com uma pequena amplitude, é gerado um sobrepotencial de reação que flutua entre valores positivos e negativos de maneira uniforme, o que torna o uso desta técnica não invasiva e mantém a linearidade do sinal de resposta ¹⁰⁵. No caso de uma voltagem DC, ocorreria uma polarização permanente do sistema, gerando um arraste de material e podendo ocasionar em modificações na superfície/danos ao filme. O sobrepotencial de reação gerado pela voltagem AC possui uma defasagem de fase em relação à corrente alternada, denominada “impedância da reação”, que é dependente da frequência aplicada e da velocidade da reação. A impedância de reação é composta por uma componente ôhmica R e uma componente capacitiva C, as quais determinam a magnitude dessa defasagem ¹⁰⁶. A resposta de impedância para a interface eletrodo/solução pode ser determinada utilizando baixas frequências AC ¹⁰⁵.

No presente trabalho, utilizou-se um potencial ac aplicado de 50 mV, no intervalo de frequência de 1 MHz a 1 Hz. Os dados foram obtidos utilizando o *software* ZPlot 2.6 e visualizados/extraídos utilizando o *software* ZView 2.9 (ambos da Scribner Associates, Inc.). Valores de Capacitância Real foram obtidos diretamente no *software* ZView utilizando a representação gráfica de Bode no modo Paralelo RCL. Tratamentos posteriores foram realizados utilizando o *software* Origin Lab 8.0. Os resultados de capacitância dos sistemas foram analisados em função da concentração dos analitos nas soluções.

4.3.4 - Tratamento e Análise dos Resultados Experimentais

Os dados experimentais foram tratados e analisados pela técnica de Análise de Componentes Principais (PCA) utilizando o *software* Statistica 7. Foram

utilizados os dados de Capacitância Real obtidos nas análises de impedância elétrica, a partir dos valores obtidos na frequência que corresponde à resposta majoritária das alterações no filme superficial, ou seja, 1 kHz. Testes utilizando o *software* Projection Explorer for Sensors/Interactive Document Mapping (PEX-Sensors/IDMAP) para o primeiro conjunto de medidas serão apresentado no APÊNDICE I.

5 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

Este capítulo será dividido em 3 seções, conforme detalhado a seguir:

- Estudo da cinética de crescimento bacteriano;
- Resultados gerais que englobam o preparo, caracterização e o crescimento dos filmes por *LbL*; assim como os resultados para o primeiro conjunto de arquiteturas propostas, composta por unidades sensoriais contendo as enzimas lisozima, tripsina e pepsina imobilizadas pela técnica *LbL*;
- Resultados referentes ao segundo conjunto de arquiteturas, que mescla unidades sensoriais utilizando enzimas imobilizadas eletrostaticamente (*LbL*) e enzimas imobilizadas de forma covalente.

5.1 - Cinética de crescimento bacteriano.

Como discutido na seção 4.3.1 - *Preparo de Amostras Biológicas*, avaliou-se a cinética de crescimento para a bactéria *Salmonella*, visando a definição do tempo necessário para o crescimento da bactéria atingir a fase estacionária, como apresentado na FIGURA 5.1:

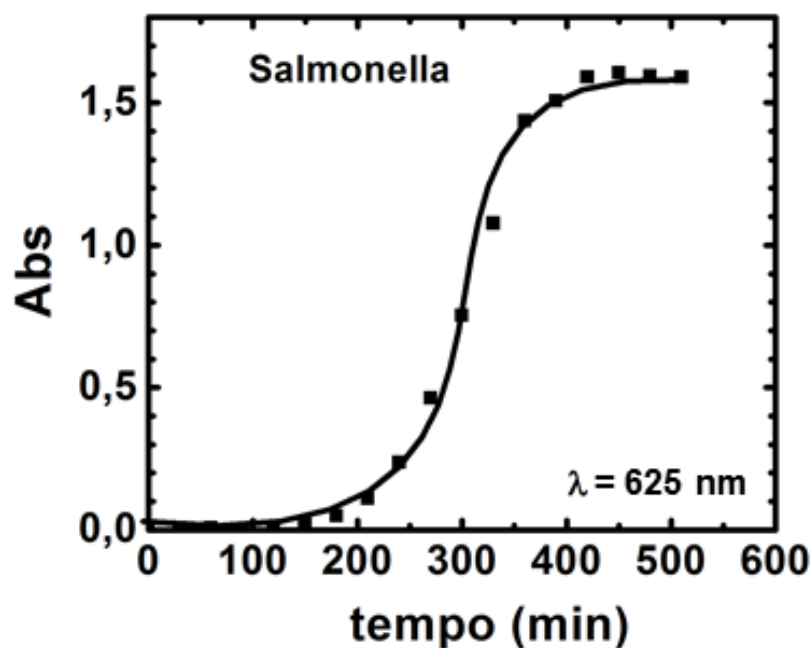


FIGURA 5.1 - Cinética de crescimento bacteriano para a *Salmonella*. Absorção em 625 nm em diferentes intervalos de tempo.

Pode-se observar que o tempo de crescimento inicial da *Salmonella* denominada, fase Lag, é a partir de 100 minutos, e tem duração por volta de 275 minutos, onde inicia-se a fase constante de crescimento, denominada fase Log. Pode-se considerar que o crescimento da bactéria entra na fase estacionária com tempo de incubação entre 400 - 500 minutos. Para a realização deste trabalho, padronizou-se o tempo de incubação como 8 horas, ou seja, 480 minutos para todas as bactérias, assegurando a realização dos experimentos utilizando uma concentração constante.

Após o período de incubação, foram retiradas alíquotas das bactérias *Salmonella* e *E. coli* e realizado o procedimento de fixação para a análise de MEV, conforme descrito na seção 4.3.1.2. As micrografias estão apresentadas na FIGURA 5.2:

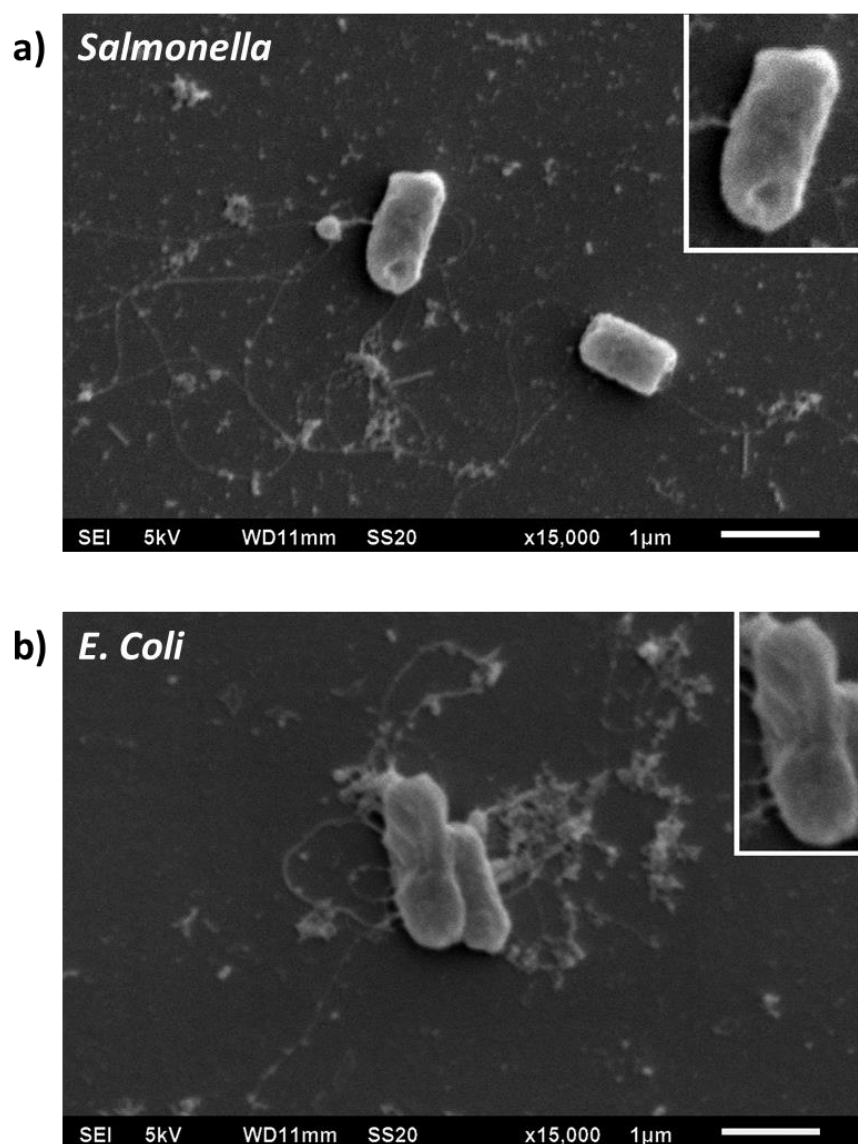


FIGURA 5.2 – Micrografias para as bactérias a) *Salmonella* e b) *E. coli*. Distância de trabalho 11 mm, tensão aplicada 5 kV, ampliação 15.000 ×.

Observa-se o formato de bastonete de ambas as bactérias e a presença de grande quantidade de flagelos. Pode-se notar que as bactérias apresentam dimensões próximas a 1 μm , o que fica na mesma ordem de grandeza das dimensões da espessura/espacamento dos dígitos dos eletrodos interdigitados, beneficiando o processo de detecção ¹⁰⁷.

5.2 - Desenvolvimento e Aplicação de Arquiteturas Utilizando a Técnica de *LbL*.

Nesta etapa foram selecionadas as enzimas tripsina, pepsina e a lisozima. As duas primeiras podem interagir com os sub-produtos/proteínas formadas pela interação das bactérias com o meio em que se encontram, ou seja, realizando uma detecção indireta. Já a lisozima tem como característica interagir com a parede celular bacteriana, mais especificamente o peptidoglicano, realizando uma detecção direta. O uso destes dois mecanismos de interação com as bactérias visaram incrementar e expandir a obtenção de um sinal de detecção do sistema de sensoriamento global.

Com intuito de adquirir experiência no manuseio de amostras biológicas, e definir as condições de preparo dos filmes automontados, nesta etapa foi utilizada apenas a bactéria Gram-negativa *E. coli*.

5.2.1 - Polaridade das Soluções Enzimáticas

A primeira etapa para o crescimento de filmes *LbL* é a definição da polaridade das soluções contendo as substâncias a serem utilizadas. Inicialmente, verificou-se o ponto isoelétrico (pI) de cada solução enzimática através de medidas de Potencial Zeta. Diluíram-se 0.5 mg/mL das enzimas Lisozima, Tripsina e Pepsina em água deionizada e controlou-se o pH com a adição de KOH e HCl até obter-se um intervalo de pH suficiente para a definição do pI. Os resultados da variação do potencial Zeta vs pH estão apresentados na FIGURA 5.3:

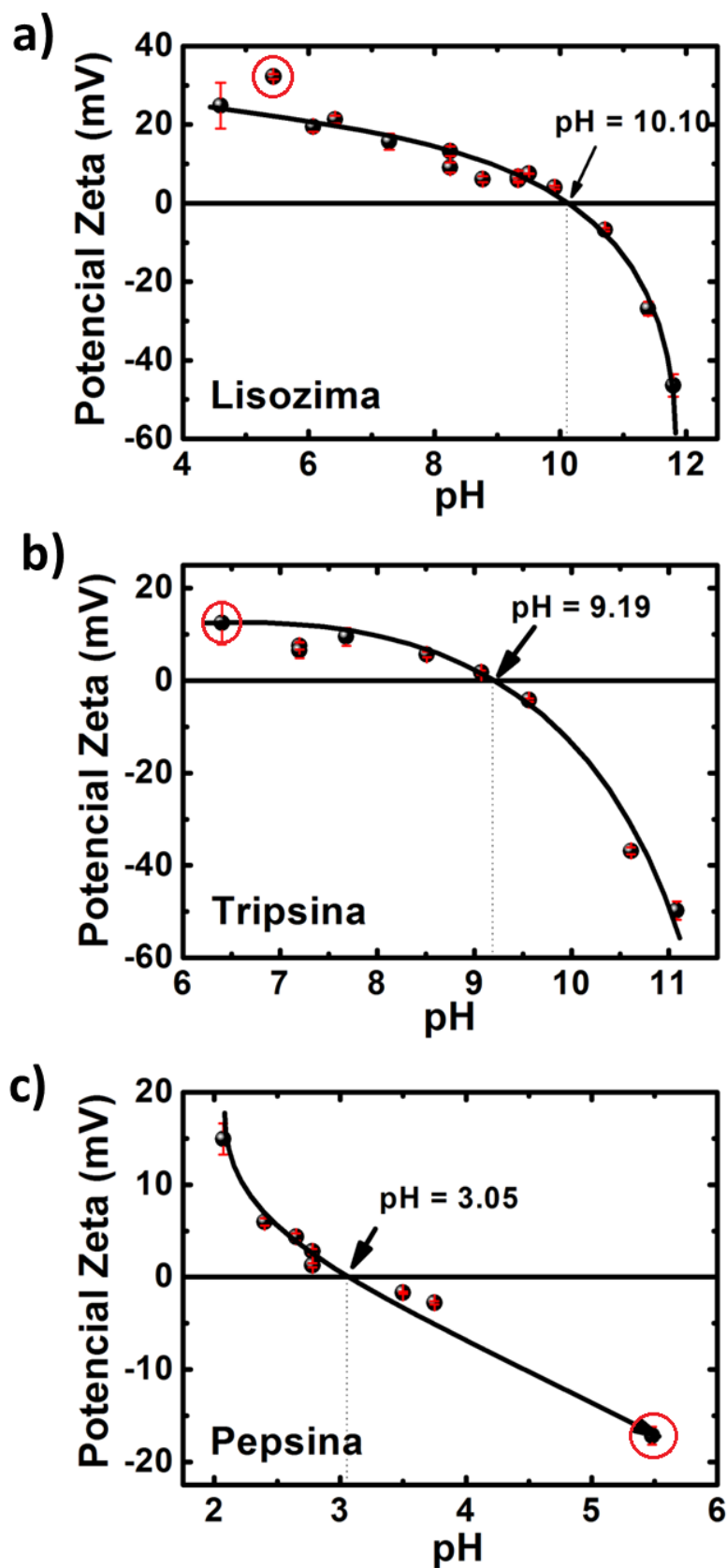


FIGURA 5.3 - Medidas de potencial zeta para soluções enzimáticas 0.5 mg/mL em água deionizada. a) Lisozima; b) Tripsina; c) Pepsina. Variação de pH realizada com adição de KOH e HCl. Nas figuras estão indicados os pontos iselétricos determinados experimentalmente e circulos (em vermelho) os valores de pH inicialmente empregados. $T = 25^{\circ}\text{C}$.

A partir dos resultados obtidos, pode-se correlacionar os valores de pI experimental com o intervalo de pH em que as enzimas estão presentes na forma ativa e definir a polaridade das soluções finais.

Conforme observado na FIGURA 5.3, a Lisozima apresenta pI de 10.10. O intervalo de pH que compreende a atividade desta enzima situa-se entre pH 6.0 e 9.0, sendo em pH 6.2 a maior atividade indicada pelo fornecedor, o que corresponde a um intervalo graficamente acima do pI , indicando uma solução de caráter catiônico. O mesmo pode ser observado para as enzimas Tripsina e Pepsina, que apresentaram pI de 9.19 e 3.05, respectivamente. O intervalo de pH em que estas enzimas apresentam atividade situa-se entre pH 7.0 e 9.0 para a Tripsina e pH 1.5 e 2.5 para a Pepsina, ambos graficamente acima dos respectivos pI , resultando também em soluções de caráter catiônico. Na Tabela 5.1 está apresentado um resumo dos pI para cada enzima, seguido do intervalo de atividade enzimática com os respectivos pH 's de maior atividade e as respectivas polaridades resultantes.

Tabela 5.1 – Resultados experimentais para o ponto isoelétrico das enzimas lisozima, tripsina e pepsina, seguidos dos intervalos de pH em que estas apresentam atividade (com a respectiva maior atividade) e a polaridade resultante.

Enzima	pI experimental	Intervalo de pH de atividade	Polaridade
Lisozima	10.10	6.0 - 9.0 (6.2)	catiônica
Tripsina	9.19	7.0 – 9.0 (8.3)	catiônica
Pepsina	3.05	1.5 – 2.5 (1.5)	catiônica

A partir do observado, selecionou-se o pH de maior atividade enzimática indicada pelo fornecedor para o preparo de soluções tampão, as quais apresentam caráter catiônico, gerando a necessidade de um contra-íon aniônico para o crescimento dos filmes automontados.

- Lisozima: solução tampão fosfato básico 0.05 M $pH = 6.2$;
- Tripsina: solução tampão trizma 0.05 M $pH = 8.3$;
- Pepsina: solução tampão fosfato ácido 0.05 M $pH = 1.6$.

5.2.2 - Cinética de Adsorção Enzimática

Uma vez determinado o pH ideal e o caráter catiônico das soluções enzimáticas, estudou-se a cinética de adsorção das enzimas sobre lâminas de

quartzo, para se determinar o tempo necessário para se obter a maior imobilização de enzimas durante o crescimento das diferentes bicamadas sobre os sensores ¹⁰⁴.

Inicialmente, com o auxílio da técnica de espectroscopia de absorção na região do UV-Vis, analisou-se a absorbância das soluções enzimáticas entre 200 - 350 nm para se determinar os picos de absorção característicos de cada enzima a serem monitorados durante o estudo da cinética de adsorção, conforme apresentado na FIGURA 5.4:

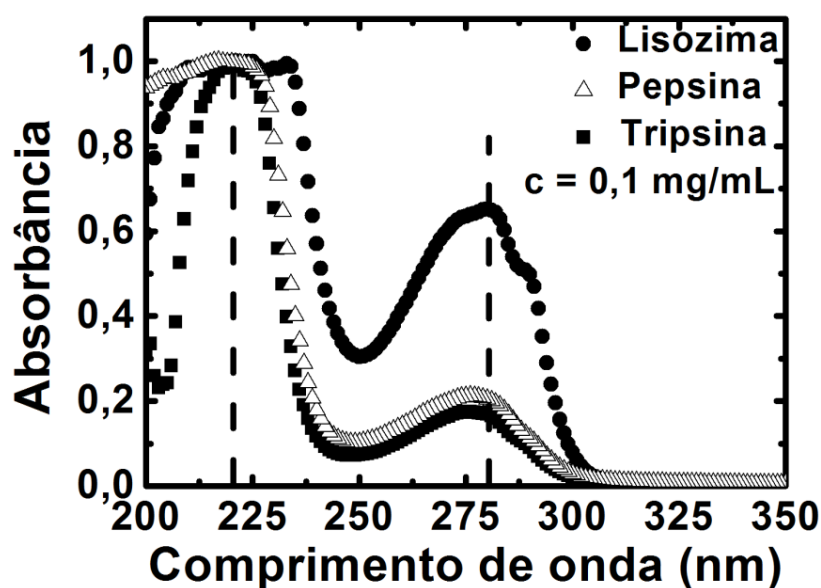


FIGURA 5.4 - Espectro de absorção na região do UV-Vis para soluções das enzimas Lisozima, Pepsina e Tripsina na concentração de 0.1 mg/mL. Intervalo de absorção entre 200 - 350 nm.

Observa-se que as enzimas possuem absorbância característica em 220 nm e 280 nm, características da excitação da banda peptídica e dos resíduos aromáticos (triptofano, tirosina e histidina) dos grupos amino ¹⁰⁸. A primeira banda, de maior magnitude, servirá de referência para monitorar a adsorção das enzimas, assim como o crescimento das camadas automontadas ¹⁰².

Os testes iniciais de adsorção enzimática foram realizados imergindo uma lâmina de quartzo previamente limpa, sem nenhum filme aderido, em cada solução contendo uma enzima específica. Em todos os casos (com tempo de imersão de até 40 minutos e diferentes concentrações enzimáticas) a variação da absorbância foi baixa e praticamente constante, ou seja, não se observou nenhuma adsorção da enzima no substrato hidrofílicado, conforme observado na FIGURA 5.5 para o caso da tripsina:

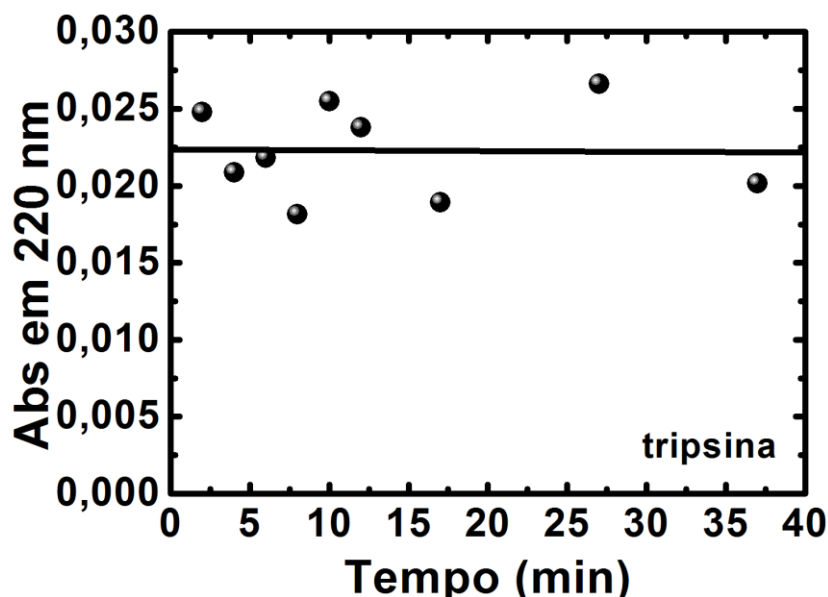


FIGURA 5.5 - Absorbância no comprimento de onda de 220 nm para o substrato de quartzo após imersão em solução de tripsina 0.5 mg/mL.

Uma estratégia para se melhorar a adsorção de enzimas em substratos, preservando a atividade enzimática e conferindo estabilidade à enzima é por meio da modificação do substrato com uma camada colchão (“cushion layer”), composta por polieletrólitos ¹⁰⁹⁻¹¹¹. Optou-se por recobrir inicialmente o substrato com uma dupla camada estável ¹⁰⁴ dos polímeros PAH/PSS (PAH com caráter catiônico e PSS com caráter aniônico) utilizando a técnica *LbL* para, assim, posteriormente, iniciar-se a adsorção das enzimas. Como as soluções enzimáticas apresentaram caráter catiônico, elas devem ser precedidas por uma superfície aniônica, como por ex. do polieletrólito PSS. Esta dupla bicamada recebeu o nome de “camada colchão” (PAH/PSS/PAH/PSS) e foi realizada conforme descrito na seção 4.3.2.3 - *Fabricação dos filmes automontados*.

A FIGURA 5.6 ilustra a absorbância em 220 nm vs o tempo de imersão do substrato de quartzo contendo a “camada colchão”, ilustrando a cinética de adsorção enzimática. Após cada imersão na solução enzimática, o substrato foi lavado com a respectiva solução tampão e seco em fluxo de gás nitrogênio.

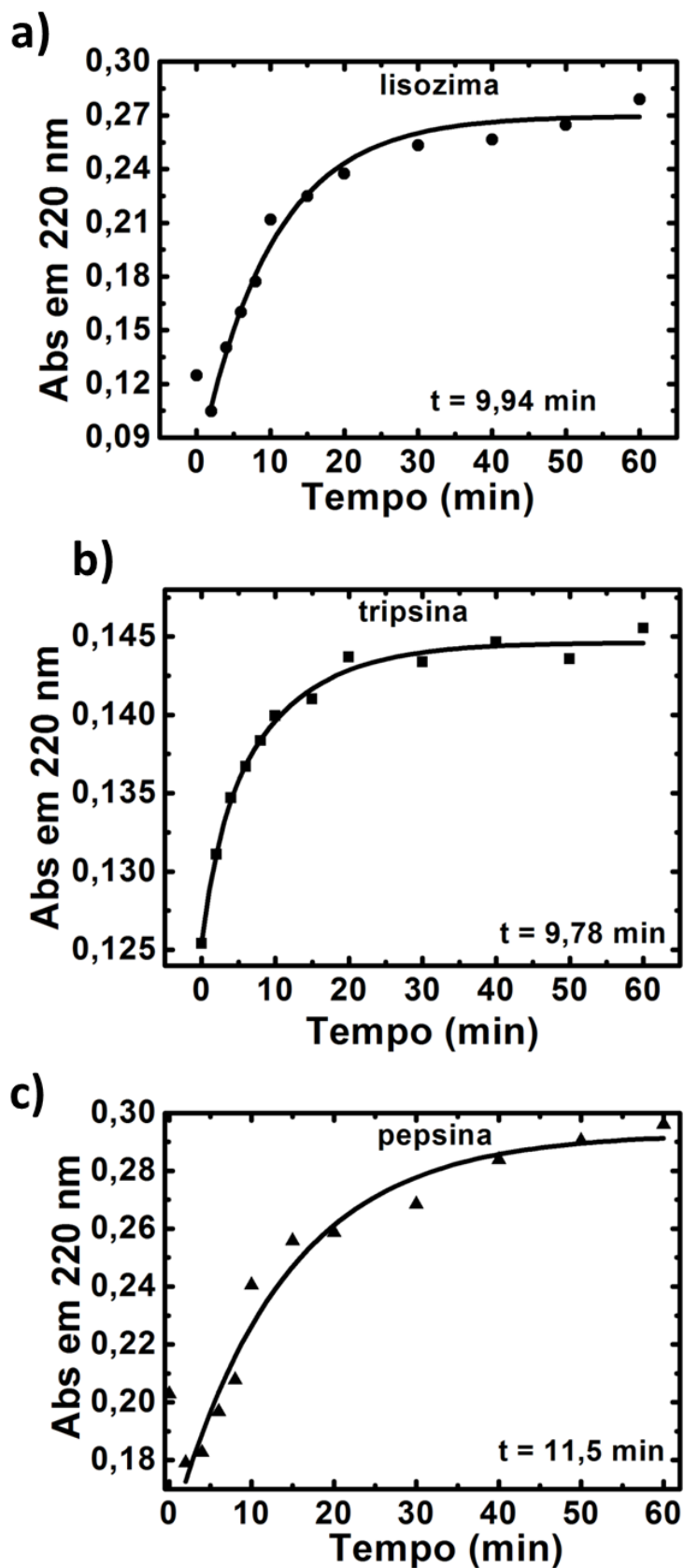


FIGURA 5.6 – Cinética de adsorção enzimática (absorbância em 220 nm versus tempo de imersão de substrato de quartzo modificado com camada colchão) para: a) lisozima; b) tripsina e c) pepsina. Soluções enzimáticas 0.5 mg/mL. Ajuste teórico (linha contínua) obtido pela equação de Johnson-Mehl-Avrami. Na figura (a-c) são indicados os tempos de saturação τ_1 para cada enzima.

A partir destes resultados pode-se observar que a atração eletrostática entre as enzimas e o PSS mostra-se mais intensa do que à interação entre as enzimas e o substrato. Pode-se também evidenciar um comportamento logarítmico da adsorção em função do tempo de imersão até alcançar o platô de estabilidade, caracterizando a finalização da difusão e adsorção de moléculas para a superfície em estudo ⁶⁴ com um completo recobrimento desta ¹¹². Os valores de absorvância do platô apresentados pela tripsina são quase a metade dos valores apresentados pelas outras enzimas, o que indica a adsorção de menor quantidade de material. Este fato pode estar vinculado ao pH básico da solução (8.3), resultando na presença de íons aniônicos juntamente com as moléculas da enzima. Como a superfície contendo PSS também apresenta caráter aniônico, ocorre uma repulsão entre a solução e a superfície, dificultando a difusão das moléculas de tripsina, diminuindo a sua adsorção.

O comportamento das curvas apresentadas na FIGURA 5.6 pode ser dividido em duas partes: uma parte inicial, de rápida adsorção, característica de uma cinética de reação de primeira ordem, com τ_1 associado à nucleação da maioria dos domínios (ou ilhas) de material adsorvido, seguido de uma segunda exponencial relacionada ao processo lento de crescimento controlado por difusão nos domínios. Este comportamento pode ser representado pela função cinética de Johnson-Mehl-Avrami ^{104, 112, 113}, que proporciona uma descrição fenomenológica da cinética de adsorção e define o tempo de saturação da adsorção das enzimas utilizadas:

$$A = k_1 \left(1 - \exp \left(-\frac{t}{\tau_1} \right) \right) + k_2 \left(1 - \exp \left(-\left(\frac{t}{\tau_2} \right)^n \right) \right) \quad (1)$$

onde A é a massa adsorvida (assumida como proporcional à absorvância óptica no comprimento de onda específico); k e n são constantes; τ_1 e τ_2 são os tempos característicos de saturação.

Os resultados obtidos aplicando esta função cinética estão representados na FIGURA 5.6. Obteve-se um tempo médio de 10 minutos para que as curvas das três enzimas alcançassem a saturação superficial, sendo este tempo adotado para o crescimento dos filmes posteriores.

Este processo de adsorção em duas etapas é esperado, desde que a primeira etapa corresponda às moléculas da enzima sendo conduzidas ao substrato

devido à atração eletrostática, enquanto que no segundo processo a carga superficial inicial diminui, reduzindo a força motriz de adsorção eletrostática, ocorrendo a reorganização das moléculas de polímero no substrato ¹¹². Nos instantes iniciais, a concentração de enzimas na interface é igual à concentração na solução, resultando em uma rápida adsorção na superfície limpa. Conforme a superfície torna-se recoberta progressivamente com a enzima, a velocidade de adsorção diminui, onde é observado um platô.

5.2.3 - Crescimento de Filmes Automontados

Estudou-se a formação de filmes finos com diferentes camadas das enzimas lisozima, tripsina e pepsina em lâminas de quartzo contendo a “camada colchão”. Foi acompanhada a cinética de crescimento, ou seja, a variação na concentração de material adsorvido na superfície do substrato em função do incremento da absorbância observado em 220 nm. Inicialmente, verificou-se se a deposição sequencial de múltiplas camadas de PSS iria influenciar nos valores de absorbância, o que poderia mascarar a adsorção das enzimas. Os resultados estão apresentados na FIGURA 5.7:

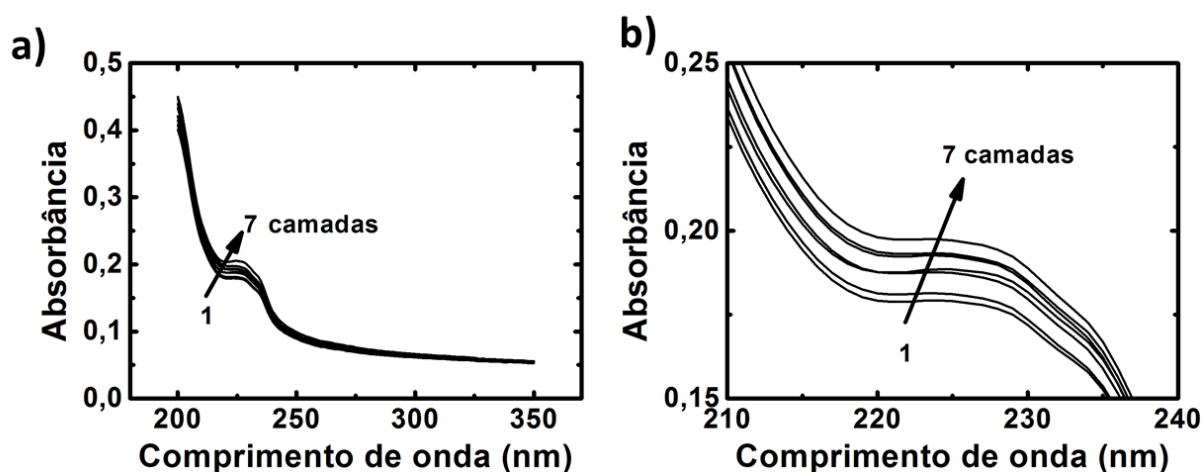


FIGURA 5.7 – (a) Espectro de absorção na região UV-Vis para deposição sequencial de camadas de PSS sobre o quartzo contendo apenas a “camada colchão”. Solução de PSS 0.5 mg/mL; tempo de imersão 3 minutos, com lavagem em H₂O destilada por 30 segundos e secagem em fluxo de gás nitrogênio. Procedimento repetido por 7×. (b) Ampliada região 210 – 240 nm em b).

Como pode ser observado nos resultados acima, não foi observada uma influência considerável nos valores de absorbância, indicando que a re-imersão

na solução do polieletrólito PSS não contribuiu fortemente na adsorção de múltiplas camadas.

Iniciou-se o estudo do crescimento das bicamadas enzima/PSS sobre o substrato de quartzo contendo a camada colchão. Foi utilizado o tempo de imersão de 10 minutos, obtido pela equação de Johnson-Mehl-Avrami na seção 5.2.2. Com o intuito de definir a concentração das soluções enzimáticas, analisou-se a resposta na adsorção para 3 diferentes concentrações de cada enzima, sendo elas 0.1, 0.5 e 1.0 mg/mL. A título de ilustração, apenas os resultados para a enzima tripsina estão apresentados na FIGURA 5.8:

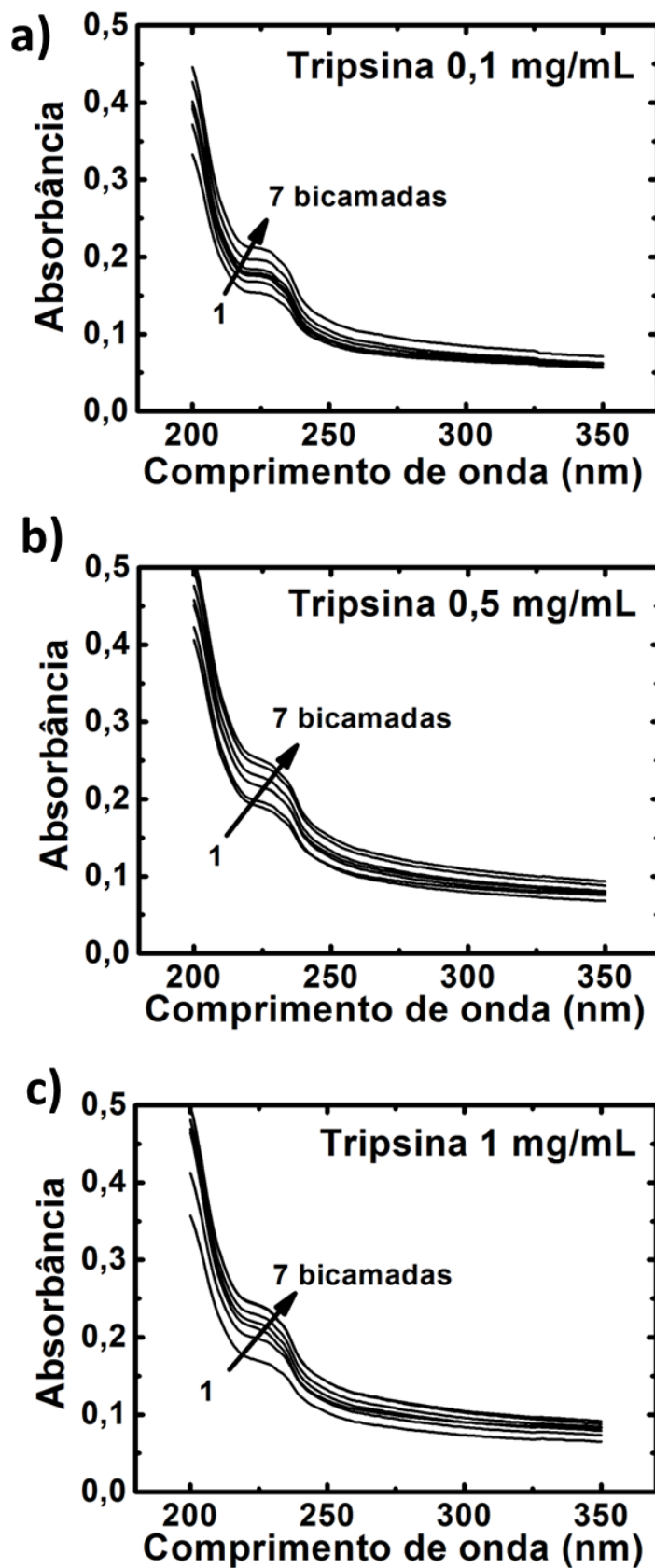


FIGURA 5.8 - Espectros de absorção na região UV-Vis para o crescimento de filmes automontados PSS/Tripsina nas concentrações a) 0.1; b) 0.5 e c) 1.0 mg/mL. Tempo de imersão na solução enzimática = 10 minutos. Medidas efetuadas após etapa de imersão na solução enzimática.

Em todos os casos, pode-se observar o crescimento das bicamadas, porém ficou difícil visualizar qual das concentrações melhor contribuiu para o crescimento dos filmes. Visando uma melhor análise, os dados de absorvância em 220 nm em função do número de bicamadas foram plotados para as 3 enzimas, e estão apresentados na FIGURA 5.9.

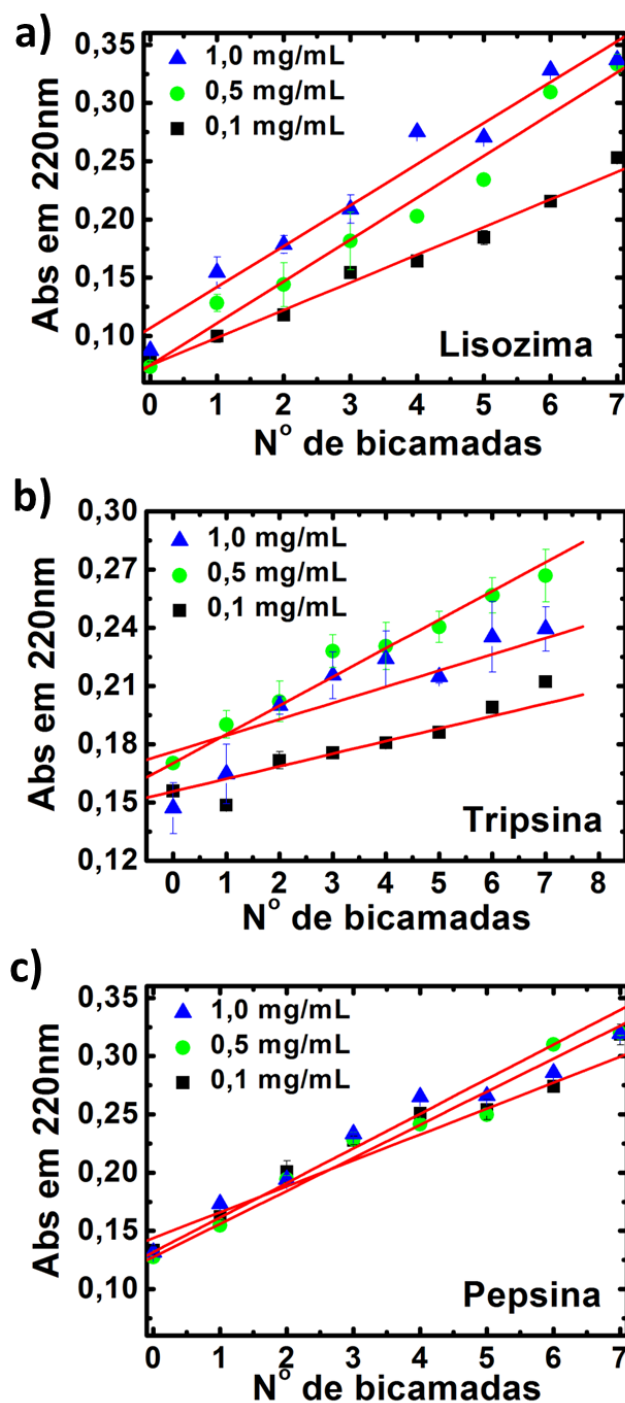


FIGURA 5.9 - Gráfico da absorvância em 220 nm em função do número de bicamadas das enzimas: a) lisozima, b) tripsina e c) pepsina sobre o quartzo contendo a camada colchão. Variou-se a concentração enzimática em 0,1, 0,5 e 1,0 mg/mL. Tempo de imersão na solução enzimática = 10 minutos. Medidas realizadas em triplicata.

Para cada curva, todos os pontos do gráfico correspondem ao mesmo substrato que foi retirado da solução, lavado, seco, medido a absorvância e colocado novamente na solução para adsorção de uma nova bicamada. Pode-se observar um crescimento linear em todos os casos analisados. O crescimento nos valores de absorvância comprovou que cada bicamada resultou na adsorção uniforme do polímero/enzima, contribuindo com uma mesma quantidade de material depositado a cada ciclo. Este comportamento condiz com o resultado esperado para a técnica de automontagem *LbL*, onde a adsorção das camadas depende do número de cargas opostas previamente adsorvidas, de modo que a quantidade de material adsorvido por camada tende a ser constante ^{45, 110}.

Nota-se a proximidade na inclinação das retas para as três concentrações utilizadas, das quais optou-se por utilizar a concentração intermediária de 0.5 mg/mL.

Após crescidos os filmes por *LbL* é necessário verificar se as enzimas continuam na sua forma ativa após a imobilização, o que pode ser realizado verificando a presença das estruturas secundárias α -hélice e folhas- β por meio de medidas de dicroísmo circular (DC) ¹¹⁴. As medidas foram realizadas para soluções enzimáticas e comparadas com resultados dos filmes contendo 7 bicamadas. Também foram realizadas medidas de DC em filmes com menor número de bicamadas, mas não foi possível obter espectros com bandas definidas. Na FIGURA 5.10 são apresentados os espectros de DC na região entre 190 a 260 nm, onde é possível observar as bandas características das proteínas.

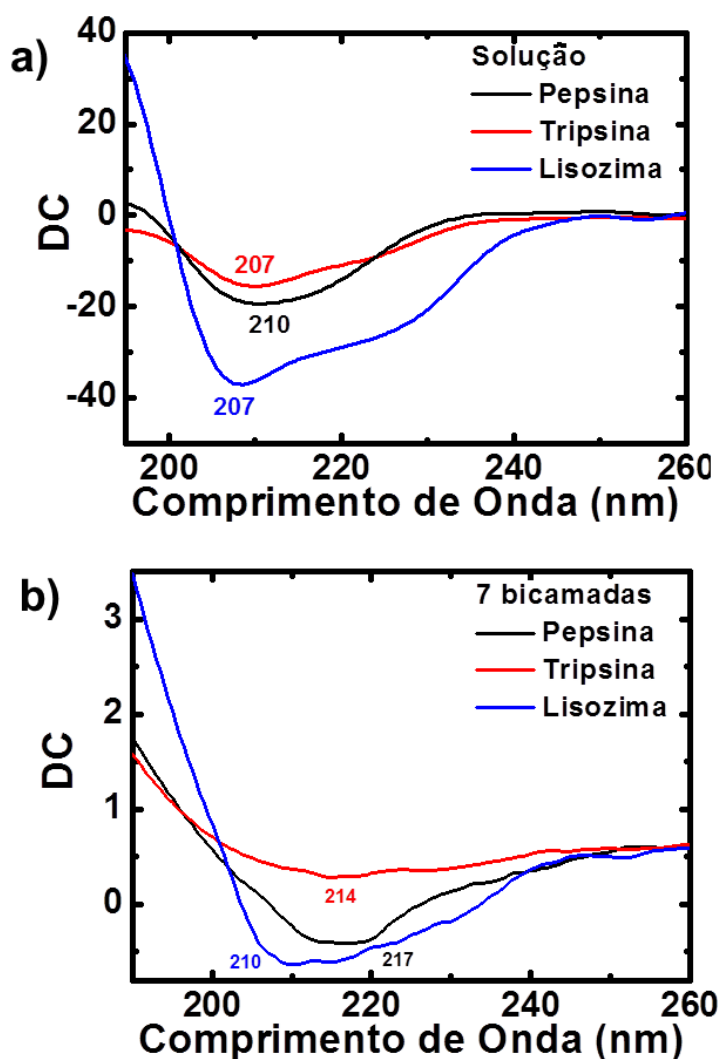


FIGURA 5.10 - Espectro de dicroísmo circular para: a) soluções enzimáticas; b) filmes com 7 bicamadas de pepsina, tripsina e lisozima. $T = 25^{\circ}\text{C}$.

Pode-se observar a semelhança entre as bandas obtidas para as enzimas tanto em solução quanto imobilizadas nos filmes de 7 bicamadas. Bandas entre 200 - 230 nm são referentes à estrutura alfa hélice ¹¹⁴, o que confirma que as enzimas permaneceram ativas após sua imobilização.

Visando a aplicação em sensores, o trabalho de JIN et al. ⁵⁸ mostrou que a resposta do eletrodo impresso de ouro é dependente do número de camadas enzimáticas depositadas, e verificou que a transição da dependência da resposta cinética para a difusional ocorreu com a deposição de até 6 - 7 camadas, obtendo a partir deste ponto uma resposta elétrica constante. Para o nosso estudo, foram utilizadas no máximo 7 camadas enzimáticas.

5.2.4 - Medidas de Espectroscopia de Impedância Elétrica (*E. coli*)

Após definir as condições experimentais para imobilizar as enzimas utilizando o crescimento de filmes automontados, foram preparados eletrodos interdigitados de platina contendo a camada colchão modificada por 1, 3, 5 e 7 bicamadas de PSS/Enzima, totalizando um conjunto de 4 arquiteturas/eletrodos para cada enzima, conforme ilustrado abaixo.

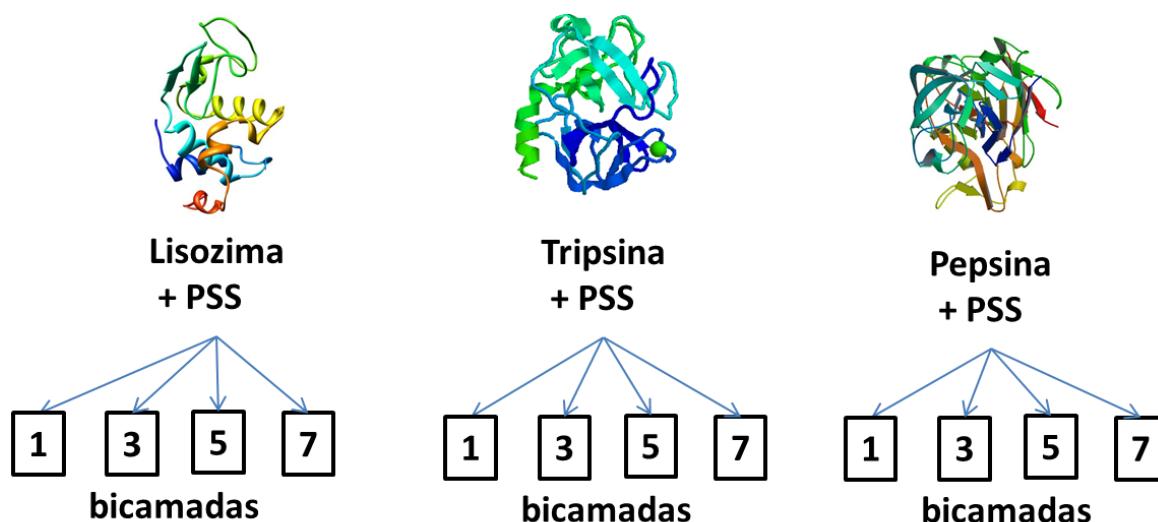


FIGURA 5.11 – Figura esquemática para as unidades sensoriais imobilizadas com 1, 3, 5 e 7 bicamadas das diferentes enzimas/PSS, formando distintas Línguas Eletrônicas.

A escolha do conjunto de unidades sensoriais com diferentes modificações superficiais baseou-se no conceito de seletividade global da Língua Eletrônica ¹⁴, onde cada unidade sensorial apresenta uma modificação superficial e consequentemente terá sua resposta elétrica alterada, o que resulta em um conjunto de respostas para cada sistema, como uma impressão digital ¹¹⁵. Foram selecionadas duas enzimas que podem reagir com proteínas/subprodutos da interação das bactérias com o meio e outra que pode reagir com a parede celular bacteriana, aumentando as possibilidades de interação a serem obtidas. Ao imergir os sensores nas soluções de análise, aguardou-se um tempo de incubação de 10 minutos para o início de cada medida ¹¹⁶, garantindo um tempo hábil para que haja interação entre a superfície modificada e o analito, que pode ser observado em um gráfico representativo no APÊNDICE II.

As medidas de Espectroscopia de Impedância Elétrica foram realizadas em soluções contendo a bactéria *E. coli* nas concentrações CFU = 10^3 , 10^5 e 10^7 . Como amostra branco, foram utilizadas soluções contendo concentração equivalente de meio de cultura, como discutido na seção 4.3.1. Cada gráfico nas FIGURAS 5.12 - 5.14 contém os resultados de capacitância elétrica em função da frequência obtida para uma unidade sensorial frente às três concentrações analisadas. Posteriormente, os dados foram tratados utilizando a ferramenta estatística PCA.

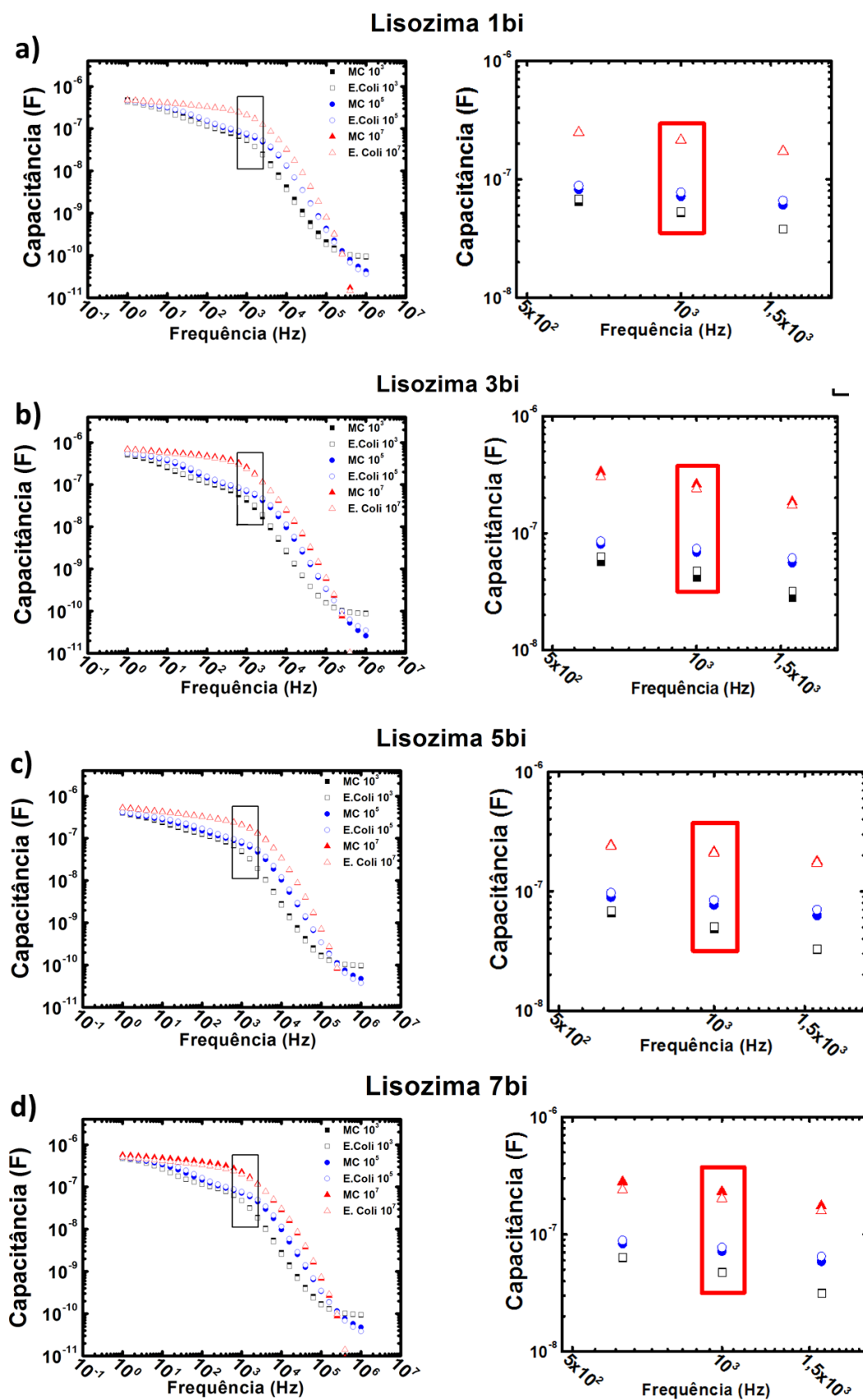


FIGURA 5.12 – Resultados de capacitância elétrica em função da frequência para eletrodos interdigitados de platina recobertos com a) 1; b) 3; c) 5 e d) 7 bicamadas de PSS/Liozima em 3 concentrações de *E. coli*. (UFC = 10^3 , 10^5 e 10^7) e concentrações correspondentes do Meio de Cultura (MC). Ampliada na segunda coluna região em 1 kHz. Tempo de estabilização = 10 minutos. T = 25°C.

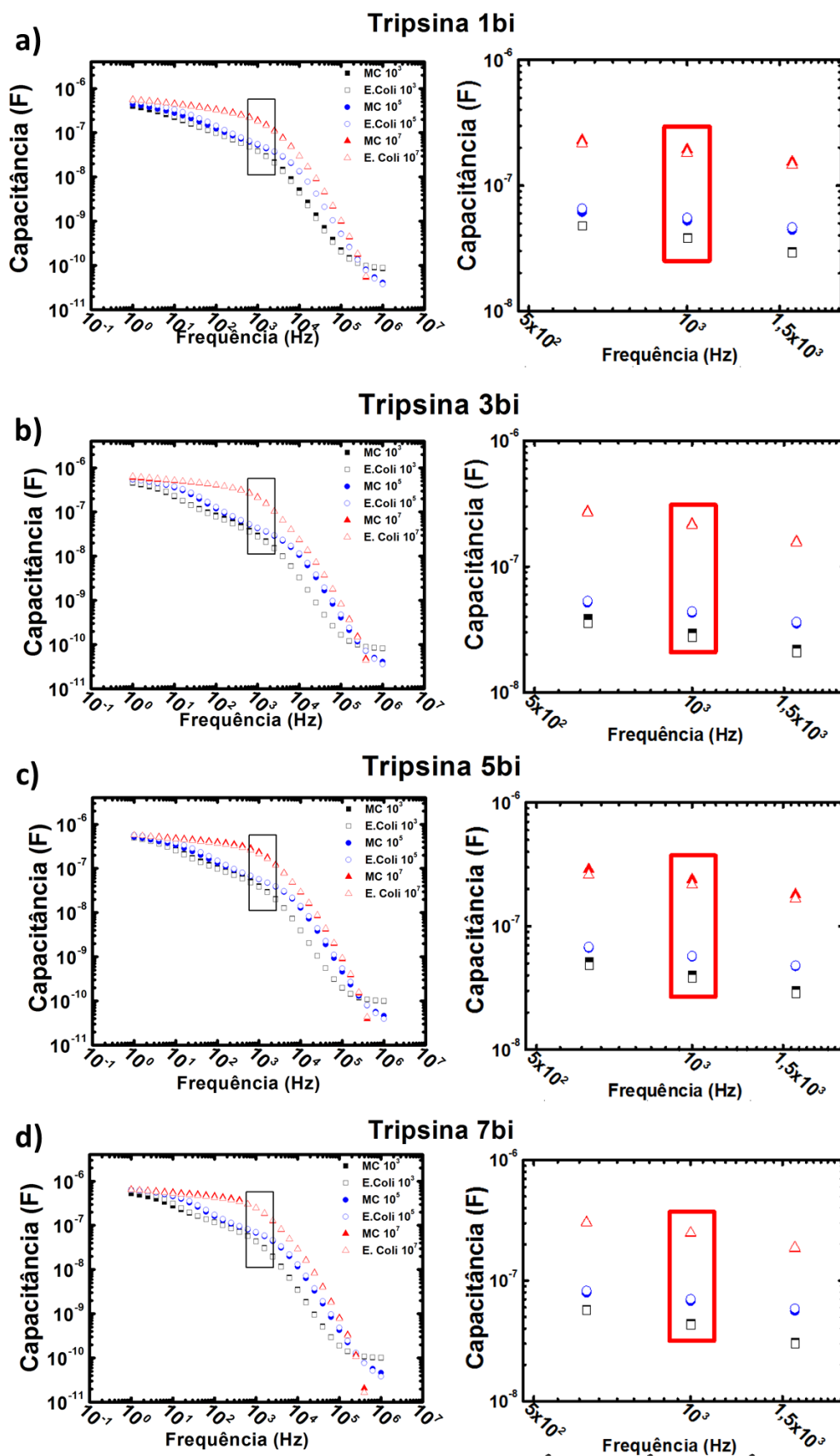


FIGURA 5.13 – Resultados de capacitância elétrica em função da frequência para eletrodos interdigitados de platina recobertos com a) 1; b) 3; c) 5 e d) 7 bicamadas de PSS/Tripsina em 3 concentrações de *E. coli*. (UFC = 10^3 , 10^5 e 10^7) e concentrações correspondentes do Meio de Cultura (MC). Ampliada na segunda coluna região em 1 kHz. Tempo de estabilização = 10 minutos. T = 25°C.

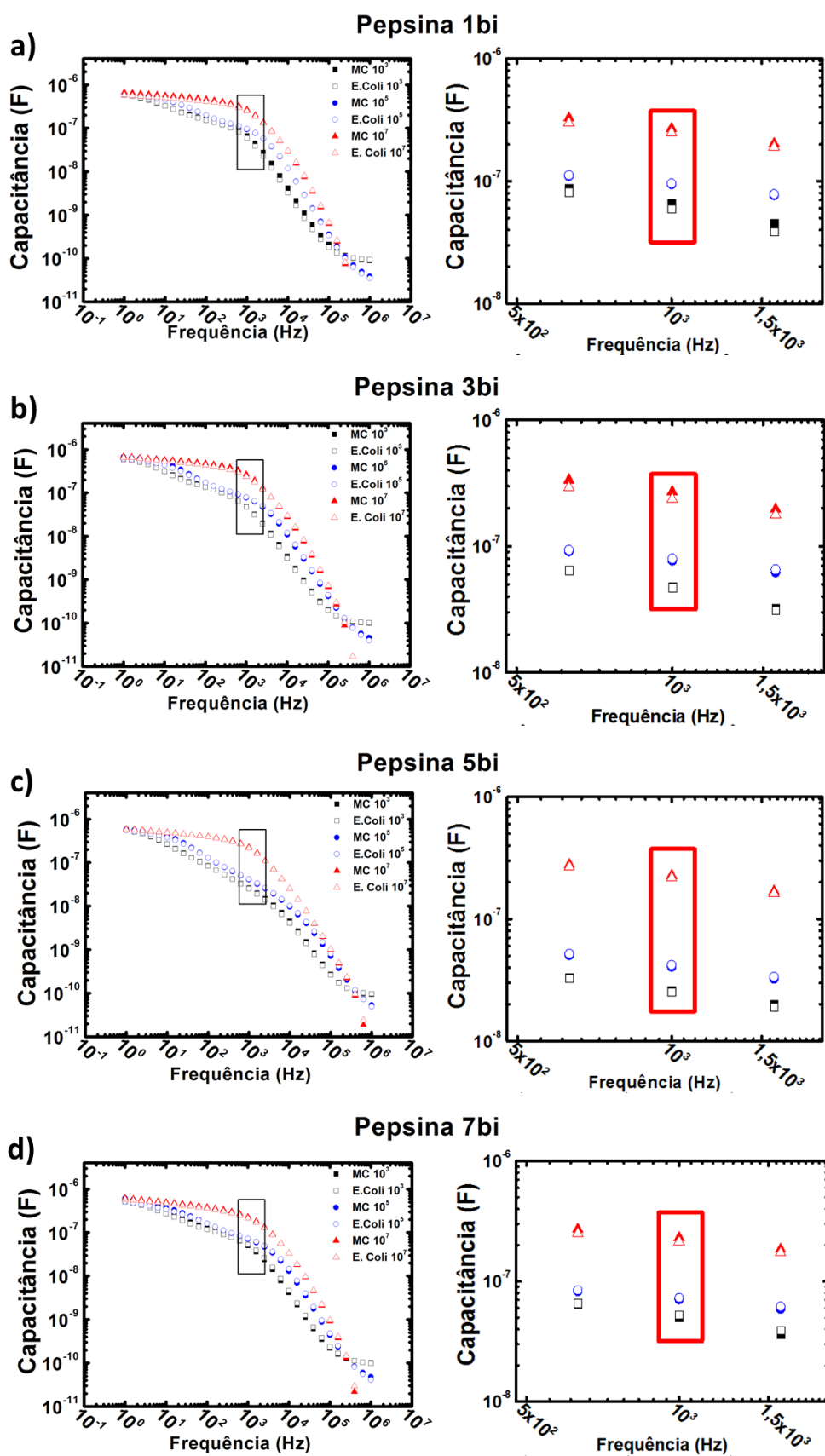


FIGURA 5.14 – Resultados de capacitância elétrica em função da frequência para eletrodos interdigitados de platina recobertos com a) 1; b) 3; c) 5 e d) 7 bicamadas de PSS/Pepsina em 3 concentrações de *E. coli*. (UFC = 10^3 , 10^5 e 10^7) e concentrações correspondentes do Meio de Cultura (MC). Ampliada na segunda coluna região em 1 kHz. Tempo de estabilização = 10 minutos. T = 25°C.

Observa-se um comportamento similar entre as curvas de capacitância inter-eletrodos com diferentes arquiteturas, assim como entre as três enzimas utilizadas. Para cada concentração específica, comparando as respostas entre as curvas da bactéria e do meio de cultura (MC) em 1 kHz (destacadas na imagem e ampliadas na segunda coluna de cada figura), pode-se observar que na maioria dos casos as soluções com bactérias apresentam valores de capacitância ligeiramente maiores.

Como descrito na literatura ^{41, 65, 107}, é conhecido que membranas celulares de 5 - 10 nm apresentam uma capacitância de $0.5 - 1.3 \mu\text{F}\cdot\text{cm}^{-2}$ e uma resistência de $10^2 - 10^5 \Omega\cdot\text{cm}^{-2}$. Porém, apenas se a bicamada lipídica estiver depositada diretamente sobre a superfície do eletrodo, a capacitância da membrana celular poderá influenciar na impedância de interface. Entretanto, as bactérias quando aderidas sobre a superfície do eletrodo, geralmente estão distantes cerca de 10 - 20 nm da superfície ^{41, 117}. Este *gap* aquoso entre a membrana celular e a superfície do eletrodo previne uma influência direta da capacitância da membrana celular na impedância de interface do eletrodo. Considerando que a espessura da dupla camada é da ordem de algumas centenas de angstroms, teoricamente estas bactérias aderidas não chegam a penetrar a dupla camada do eletrodo. Em consequência, a variação na capacitância verificada com os MEI's não é resultado da adesão bacteriana, e sim da mudança da composição iônica do meio. Ou seja, a bactéria reage com o meio, transformando proteínas em moléculas menores. Estas substâncias, por possuírem menor tamanho, reduzem a espessura da dupla camada, reduzindo assim a resistência interfacial, aumentando a capacitância da dupla camada. Se as bactérias estivessem alocadas sobre os eletrodos, elas iriam bloquear o fluxo de corrente, aumentando os valores de impedância ^{65, 117}.

Ainda, a clara separação entre as curvas com diferentes concentrações pode estar relacionada à maior quantidade de íons provenientes do meio de cultura, resultando em uma maior capacitância para as soluções mais concentradas. Dependendo da magnitude da influência no sistema, a resposta na detecção de bactérias pode ser encoberta pela resposta do meio de cultura. Este efeito pode ser atenuado realizando a re-suspensão das bactérias com a solução de análise, conforme discutido na seção 4.3.1.1, e que foi realizado no estudo com as arquiteturas da seção 5.3.

Os resultados, de modo geral, apresentam uma tênue diferença entre as respostas das bactérias e as dos respectivos meios de cultura. Para obter-se uma análise mais precisa do sistema, utilizou-se a metodologia estatística de Análise das Componentes Principais (PCA), a qual é adequada para extração de informações e visualização gráfica de um grande conjunto de dados amostrais nos quais há pequenas variações de resposta ^{98, 118}. A FIGURA 5.15 mostra os PCA's obtidos utilizando os resultados de capacitância na frequência de 1 kHz (indicadas nas FIGURAS 5.12 - 5.14) que, conforme discutido na seção 2.3.4, situa-se na região intermediária de frequência da resposta do filme, ou seja, a resposta da camada sensorial.

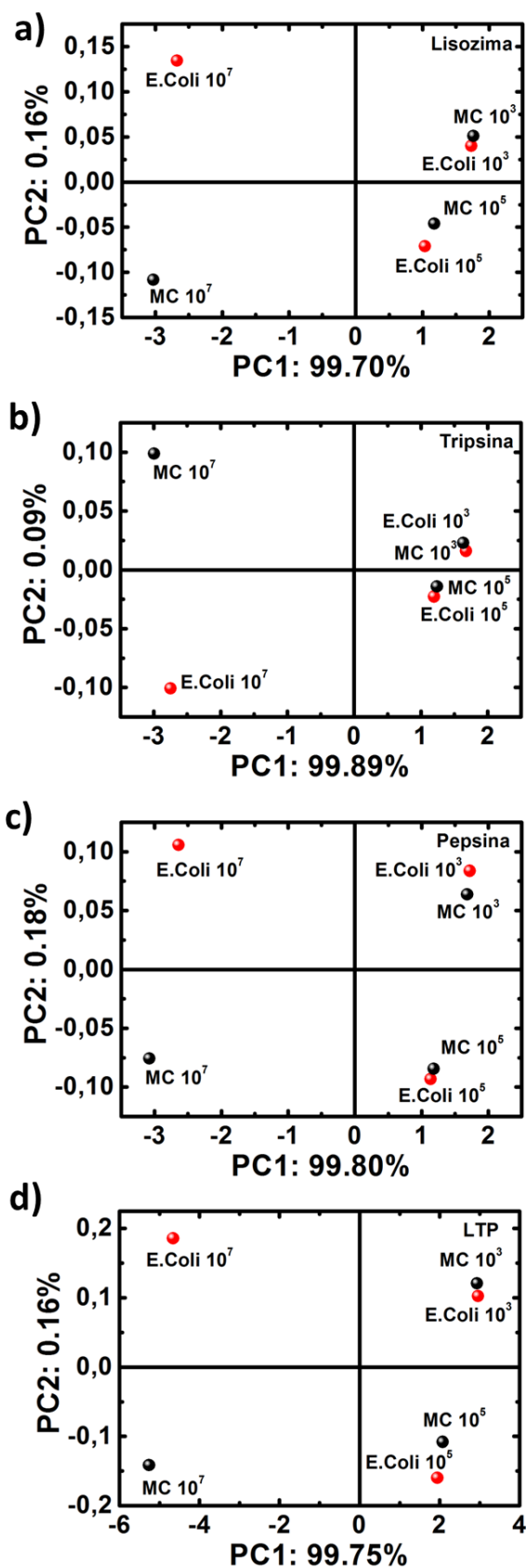


FIGURA 5.15 – Análise das Componentes Principais (PCA) dos conjuntos de unidades sensoriais a) lisozima; b) tripsina; c) pepsina e d) todas as unidades juntas. Dados obtidos a partir dos valores de capacitância a 1 kHz. Indicadas as concentrações de *E. coli* com UFC = 10^3 , 10^5 e 10^7 e dos respectivos Meios de Cultura (MC).

Os PCA's da FIGURA 5.15 a), b) e c) correspondem, individualmente, ao resultado do conjunto de 4 unidades sensoriais com 1, 3, 5 e 7 bicamadas de cada enzima sendo lisozima, tripsina e pepsina, respectivamente. Cada ponto do PCA corresponde a uma concentração (10^3 , 10^5 , 10^7) de analito (*E. coli* e Meio de Cultura (MC)). Já a figura d) apresenta a análise da resposta de todas as 12 arquiteturas propostas frente a cada solução. Em todos os casos, observa-se uma ótima representatividade do sistema em análise, em termos da variabilidade, quando somadas as componentes principais PC1 + PC2, resultando em valores acima de 99%.

Analisando os conjuntos individuais, observa-se que as arquiteturas contendo as enzimas lisozima e tripsina (a e b) apresentaram baixa distinção na contaminação com 10^3 UFC de *E. coli*. Já em concentrações de 10^5 UFC, as arquiteturas contendo lisozima conseguem realizar uma baixa discriminação da amostra contaminada (com bactéria) em relação ao meio de cultura. O resultado foi muito satisfatório, em todos os casos, para discriminar amostras contaminadas com concentrações de 10^7 UFC de *E. coli*.

Observando a PCA referente ao conjunto de todas as enzimas (FIGURA 5.15 d)) é possível realizar a detecção da presença de *E. coli* a partir de concentrações de 10^5 UFC, resultado este impulsionado pela contribuição das arquiteturas contendo lisozima.

De um modo geral, todas as PCA's obtidas demonstraram boa discriminação das 3 diferentes concentrações, estando cada uma localizada em quadrantes opostos, sendo que: a concentração de 10^3 ficou no quadrante positivo em relação a ambas PC's (PC1 e PC2); a concentração de 10^5 UFC ficou localizada no quadrante positivo de PC1 e negativo de PC2; a concentração de 10^7 UFC ficou localizada no quadrante negativo de PC1, sendo a solução contaminada no quadrante positivo de PC2 e a solução contendo o meio de cultura no quadrante negativo de PC2.

Com o intuito de se analisar e comparar dois diferentes métodos na imobilização de enzimas, na próxima seção também será apresentado o estudo empregando glutaraldeído para a formação de ligações covalentes entre as enzimas e a superfície dos eletrodos. Ainda, será analisada a detecção de duas classes de bactérias, a gram-positiva *S. aureus* e a gram-negativa *Salmonella*, assim como a mistura de ambas.

5.3 - Imobilização de Enzimas via Ligação Covalente

Diferente das imobilizações enzimáticas empregadas nas arquiteturas anteriores, que consistiam em interações de adsorção eletrostática, nesta seção é descrito o estudo da resposta na detecção das bactérias através da imobilização das enzimas Tripsina e Lisozima via ligação covalente com o auxílio de glutaraldeído, conforme metodologia descrita a seguir e inspirada no trabalho de GENG et al. ¹¹⁹. Neste tipo de imobilização, o glutaraldeído forma ligações covalentes com grupos amina residuais livres na enzima e se ligam também a grupos funcionais na superfície do eletrodo previamente modificado, formando uma rede polimérica. Para realizar este tipo de ligação, foram inicialmente crescidos, via *LbL*, a camada colchão dos polímeros PAH/PSS (2 bi camadas), finalizando com o PAH. Crescido esse filme inicial, foram depositados 10 μ L de glutaraldeído 2.5% via *drop-coating* (1 gota), suficiente para recobrir por completo todos os dígitos do eletrodo. Após esta etapa, aguardou-se 2 horas para evaporação do solvente do glutaraldeído. A FIGURA 5.16 ilustra as etapas realizadas para modificação do eletrodo.

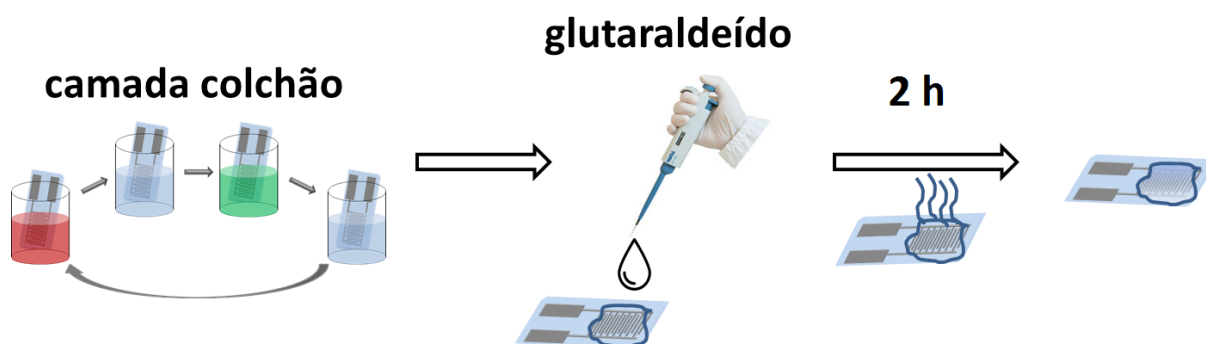


FIGURA 5.16 – Ilustração das etapas envolvidas na modificação do eletrodo com glutaraldeído.

A interação entre glutaraldeído e o PAH pode ser representada pela reação a seguir ¹²⁰:

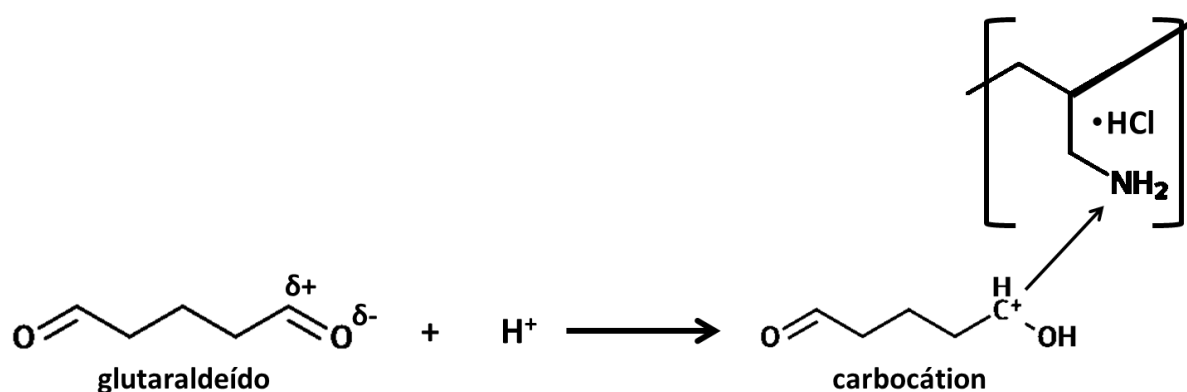


FIGURA 5.17 – Esquema da reação entre o glutaraldeído e o polímero PAH (Adaptado da ref. ¹²⁰).

O glutaraldeído em solução está presente na forma de um carbocátion que interage com as aminas primárias do PAH, formando uma ligação covalente. Após o tempo de espera de 2 horas, foram depositados, via *drop-coating*, 20 µL das soluções enzimáticas de Lisozima e Tripsina 1 mg/mL em cada eletrodo separadamente, sendo posteriormente mantidos em geladeira por pelo menos 12 horas. O glutaraldeído liga-se às enzimas segundo a reação abaixo ¹²¹:

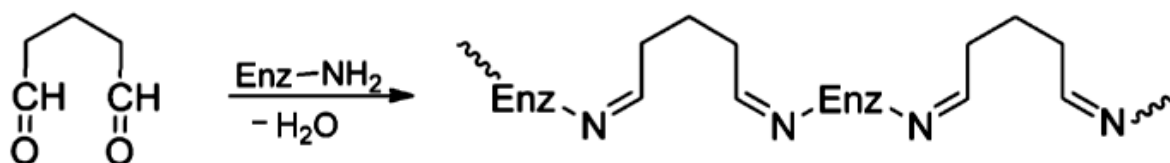


FIGURA 5.18 – Esquema da reação de interação entre o glutaraldeído com enzimas. (Fonte ref. ¹²¹)

Como as enzimas também possuem grupos amina em sua estrutura, a outra extremidade do glutaraldeído forma uma ligação covalente, tornando possível a imobilização das enzimas em superfícies modificadas.

Selecionou-se a enzima Tripsina pela sua característica em reagir com os sub-produtos oriundos da interação das bactérias com o meio, e a Lisozima por clivar o peptidoglicano, resultando, de ambas as formas, a possibilidade de se coletar uma resposta mensurável.

5.3.1 - Medidas de Espectroscopia de Impedância Elétrica (*Samonella* e *S. aureus*)

Nesta etapa, o conjunto de unidades sensoriais foi composto por 5 microeletrodos interdigitados de ouro: um eletrodo sem modificação (*bare*); 4 diferentes combinações de arquiteturas superficiais sendo 2 com enzimas imobilizadas de forma covalente e 2 tendo como base a imobilização por *LbL*. As unidades sensoriais formadas estão mostradas abaixo:

[1] eletrodo sem recobrimento (*bare*)

[2] colchão // PAH // glutaraldeído // lisozima

[3] colchão // PAH // glutaraldeído // tripsina

[4] colchão // (lisozima // PSS // lisozima) - até atingir 5 camadas de enzima

[5] colchão // (tripsina // PSS // tripsina) - até atingir 5 camadas de enzima

Como realizado nos experimentos anteriores, as medidas de espectroscopia de impedância foram realizadas no intervalo de frequência de 1 MHz a 1 Hz com amplitude de 50 mV. As soluções contendo, separadamente, concentrações de 10^3 , 10^5 e 10^7 UFC das bactérias *S. aureus*, *Salmonella* e a mistura de ambas, foram preparadas utilizando a metodologia de re-suspensão em PBS, conforme descrito na seção 4.3.1.1. Como solução de referência (branco), utilizou-se o próprio PBS.

A seguir, serão apresentados os resultados de capacitância em função da frequência para cada eletrodo modificado, contendo os resultados referentes às soluções de PBS com e sem as respectivas bactérias em suas distintas concentrações. Serão agrupados os resultados por tipo de bactéria: *S. aureus*, *Salmonella* e a mistura de ambas (*A + S*).

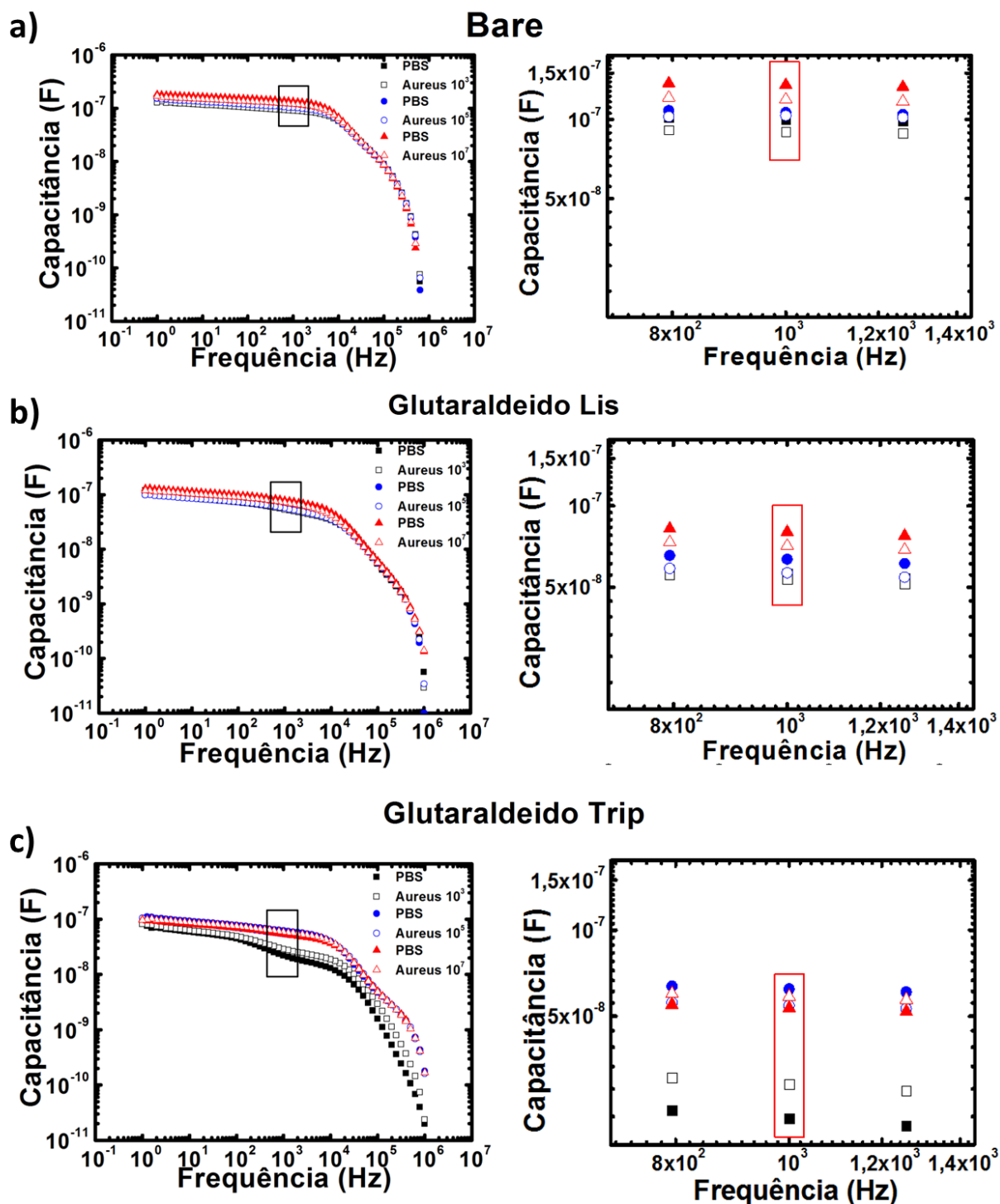


FIGURA 5.19 – Resultados de capacitância elétrica para eletrodos interdigitados de ouro: a) bare (sem modificação superficial); e modificados superficialmente com: b) lisozima imobilizada via ligação covalente; c) tripsina imobilizada via ligação covalente. Foram empregadas 3 concentrações de *S. aureus* (UFC = 10^3 , 10^5 e 10^7) preparadas via re-suspensão em PBS 0.1 M. Solução branco: PBS 0.1 M. Ampliada região de 1 kHz na segunda coluna. Tempo de estabilização = 10 minutos. T = 25°C.

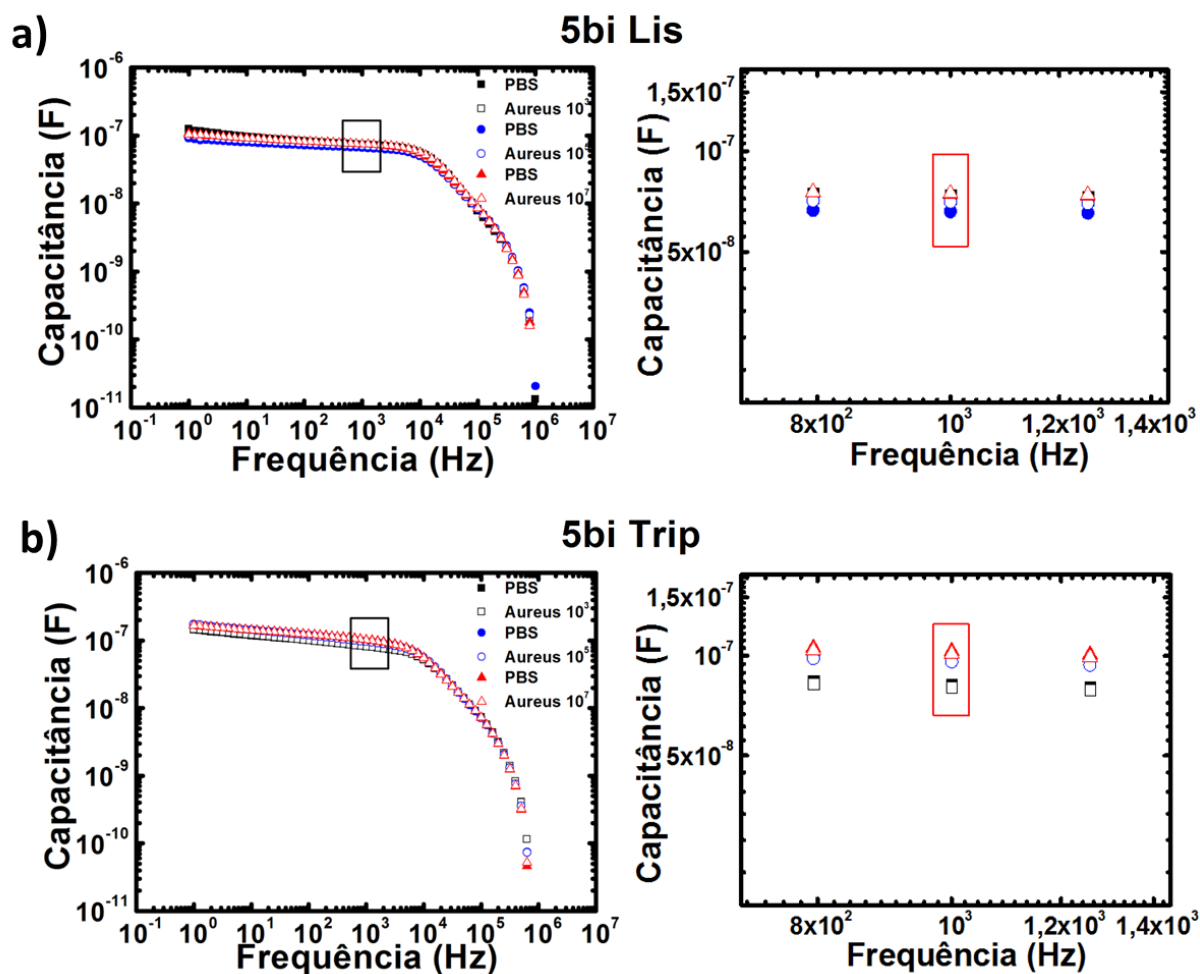


FIGURA 5.20 - Resultados de capacitância elétrica para eletrodos interdigitados de ouro modificados superficialmente com: a) lisozima imobilizada eletrostaticamente (5 bicamadas de *LbL*); b) tripsina imobilizada eletrostaticamente (5 bicamadas de *LbL*). Foram empregadas 3 concentrações de *S. aureus* (UFC = 10^3 , 10^5 e 10^7) preparadas via re-suspensão em PBS 0.1 M. Solução branco: PBS 0.1 M. Ampliada região de 1 kHz na segunda coluna. Tempo de estabilização = 10 minutos. T = 25°C.

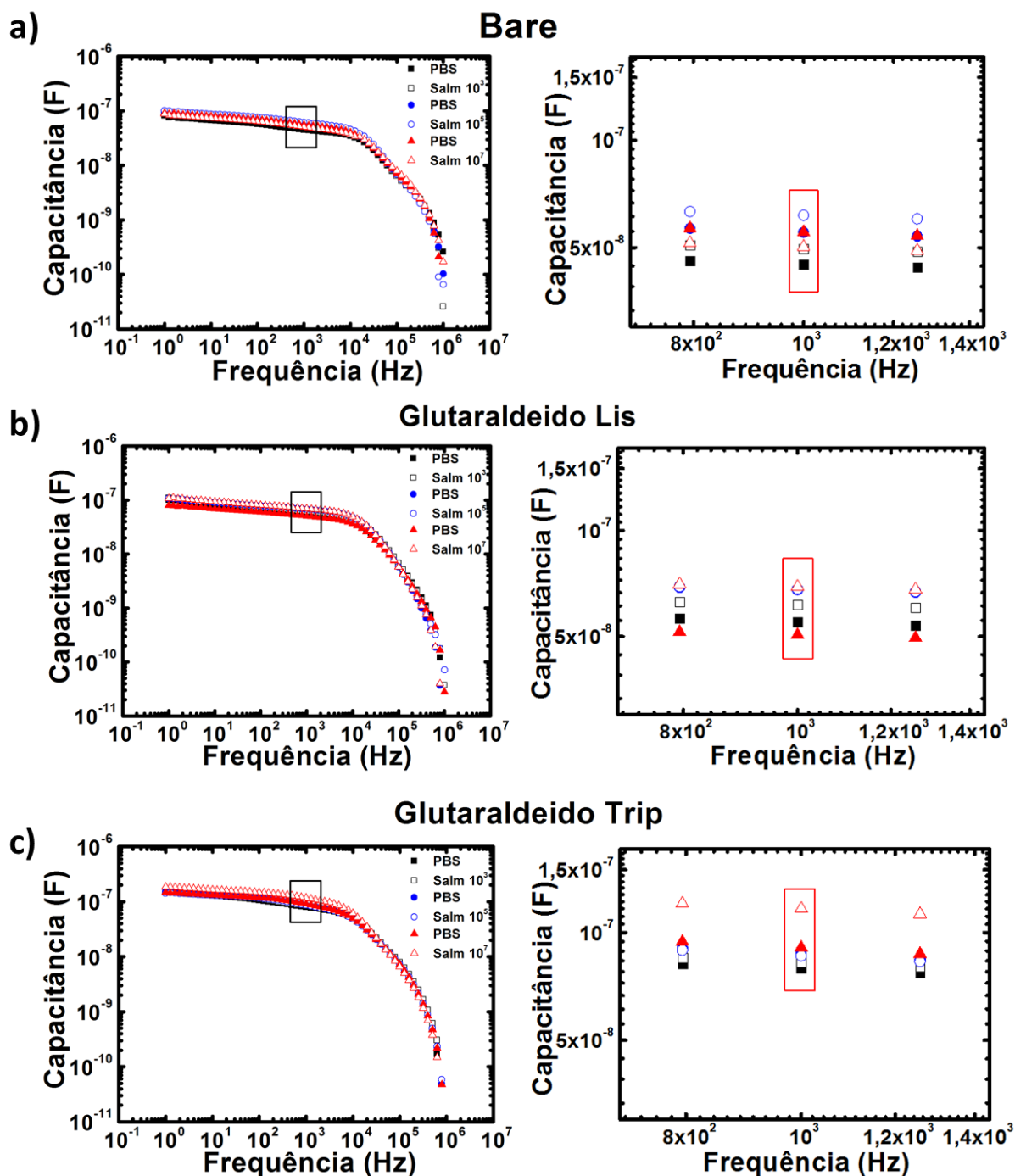


FIGURA 5.21 – Resultados de capacitância elétrica para eletrodos interdigitados de ouro: a) bare (sem modificação superficial); e modificados superficialmente com: b) lisozima imobilizada via ligação covalente; c) tripsina imobilizada via ligação covalente. Foram empregadas 3 concentrações de *Salmonella* (UFC = 10^3 , 10^5 e 10^7) preparadas via re-suspensão em PBS 0.1 M. Solução branco: PBS 0.1 M. Ampliada região de 1 kHz na segunda coluna. Tempo de estabilização = 10 minutos. $T = 25^\circ\text{C}$.

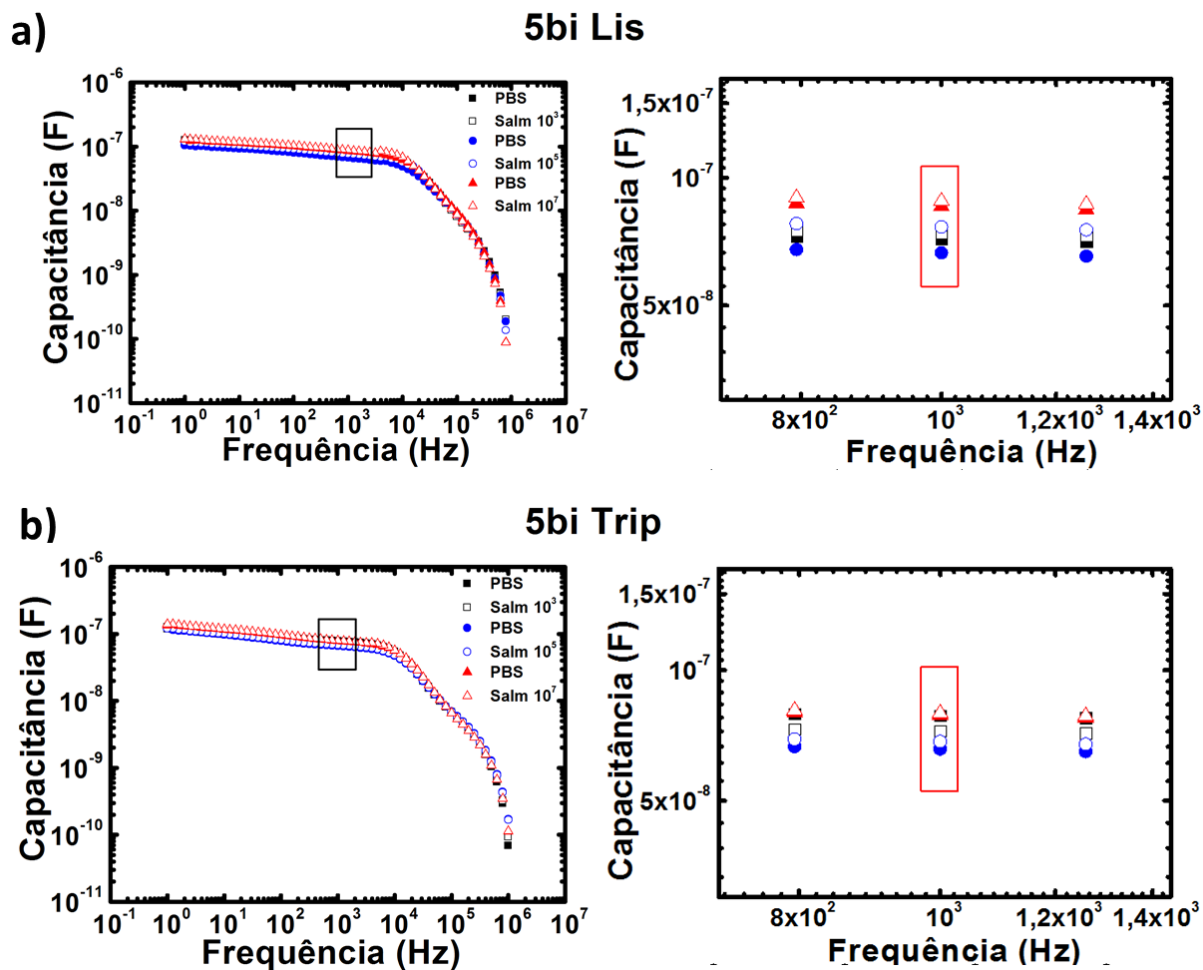


FIGURA 5.22 - Resultados de capacitância elétrica para eletrodos interdigitados de ouro modificados superficialmente com: a) lisozima imobilizada eletrostaticamente (5 bicamadas de *LbL*); b) tripsina imobilizada eletrostaticamente (5 bicamadas de *LbL*). Foram empregadas 3 concentrações de *Salmonella* (UFC = 10^3 , 10^5 e 10^7) preparadas via re-suspensão em PBS 0.1 M. Solução branco: PBS 0.1 M. Ampliada região de 1 kHz na segunda coluna. Tempo de estabilização = 10 minutos. T = 25°C.

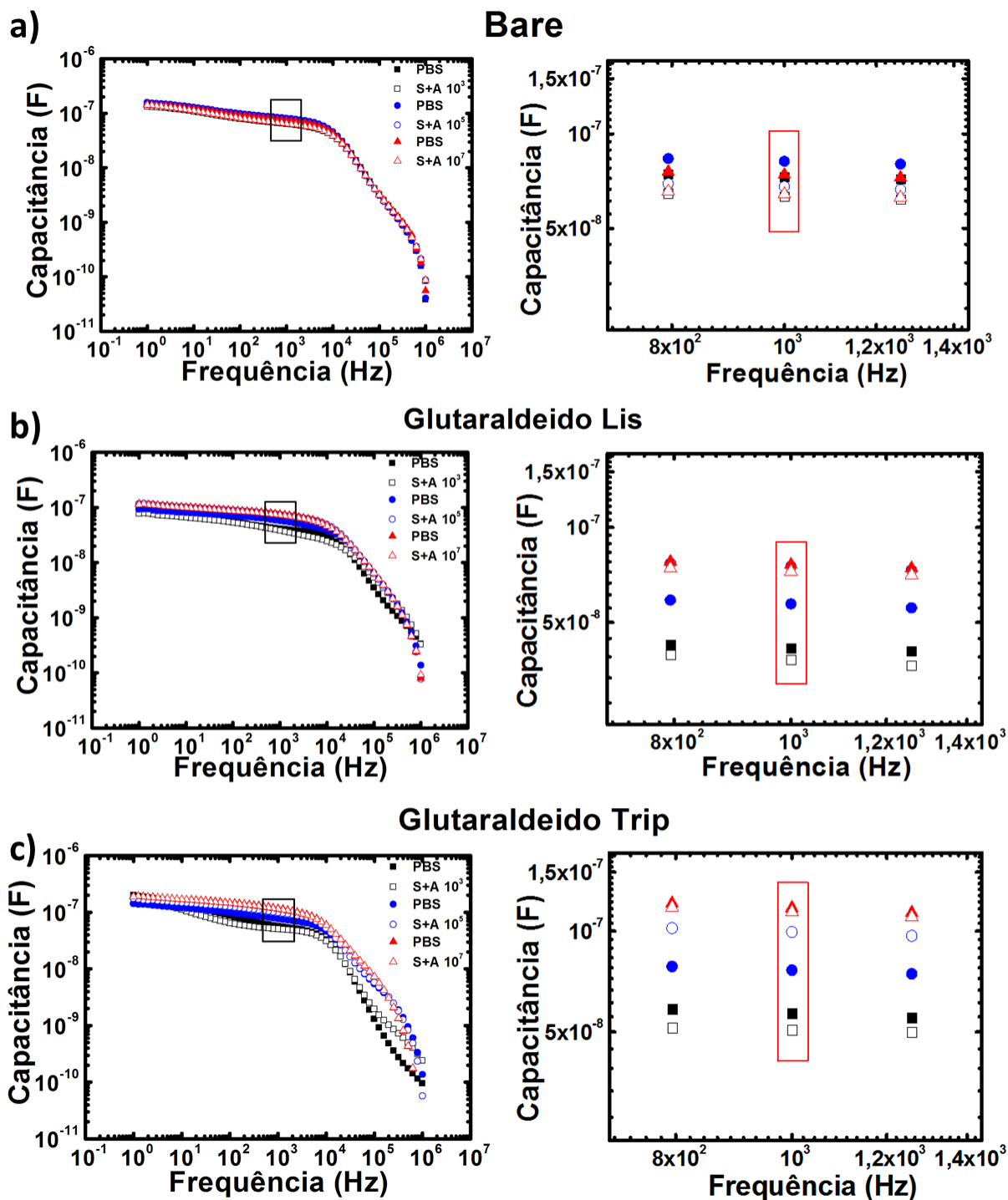


FIGURA 5.23 – Resultados de capacitância elétrica para eletrodos interdigitados de ouro: a) bare (sem modificação superficial); e modificados superficialmente com: b) lisozima imobilizada via ligação covalente; c) tripsina imobilizada via ligação covalente. Analisadas 3 concentrações da mistura de *S. aureus* e *Salmonella* (UFC = 10^3 , 10^5 e 10^7) preparadas via re-suspensão em PBS 0.1 M. Solução branco: PBS 0.1 M. Ampliada região de 1 kHz na segunda coluna. Tempo de estabilização = 10 minutos. T = 25°C.

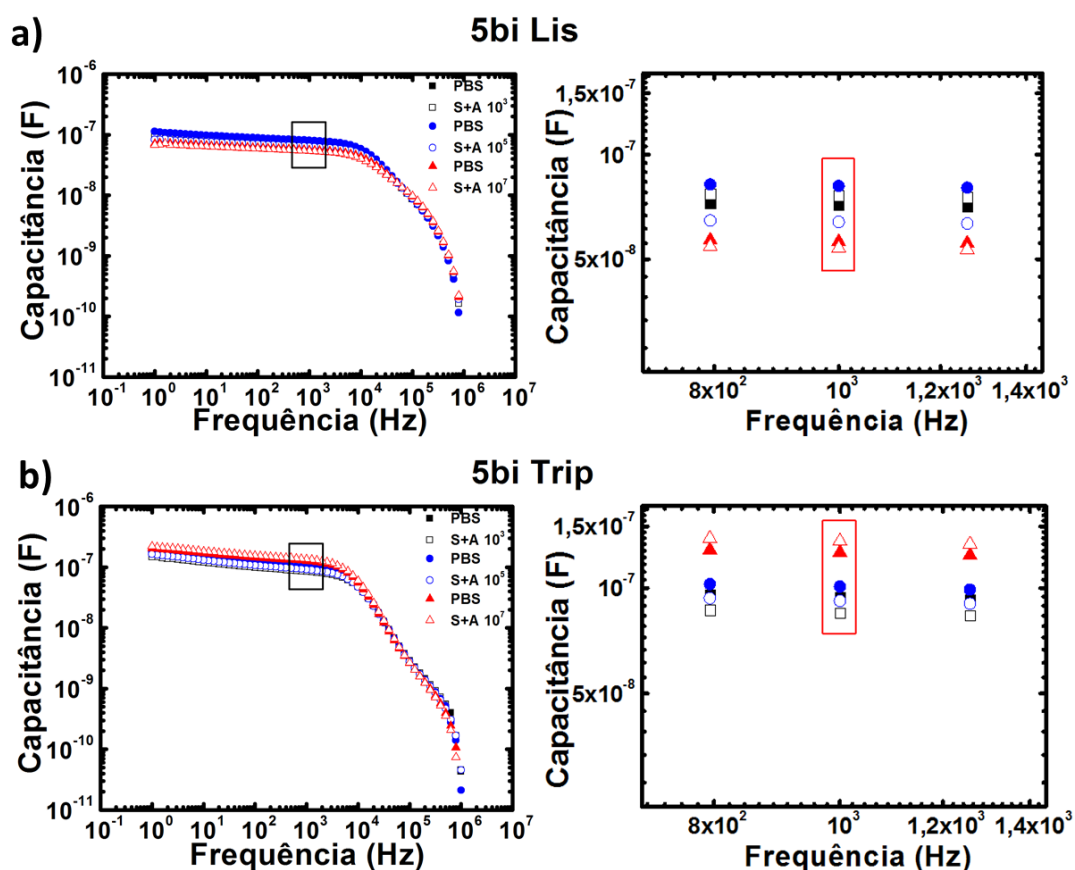


FIGURA 5.24 – Resultados de capacitância elétrica para eletrodos interdigitados de ouro modificados superficialmente com: a) lisozima imobilizada eletrostaticamente (5 bicamadas de *LbL*); b) tripsina imobilizada eletrostaticamente (5 bicamadas de *LbL*). Analisadas 3 concentrações da mistura de *S. aureus* e *Salmonella* ($UFC = 10^3$, 10^5 e 10^7) preparadas via re-suspensão em PBS 0.1 M. Solução branco: PBS 0.1 M. Ampliada região de 1 kHz na segunda coluna. Tempo de estabilização = 10 minutos. $T = 25^\circ\text{C}$.

O primeiro ponto a analisar no conjunto de medidas das FIGURAS 5.19 - 5.24 é a supressão entre as respostas das diferentes concentrações, ocasionado pela re-suspensão das bactérias e eliminação da presença do meio de cultura. Quando analisados os dados em 1 kHz é possível observar uma melhor distinção entre as soluções contaminadas com bactérias frente aos respectivos brancos, corroborando com os dados apresentados na seção 5.2.4.

Novamente, para representar todos os dados de cada conjunto de eletrodos em apenas um gráfico de fácil visualização e representativo para cada bactéria, utilizou-se a metodologia estatística de PCA. Serão apresentadas as análises obtidas utilizando-se os resultados de capacitância elétrica coletados na frequência de 1 kHz, extraídas na segunda coluna das FIGURAS 5.19 - 5.25.

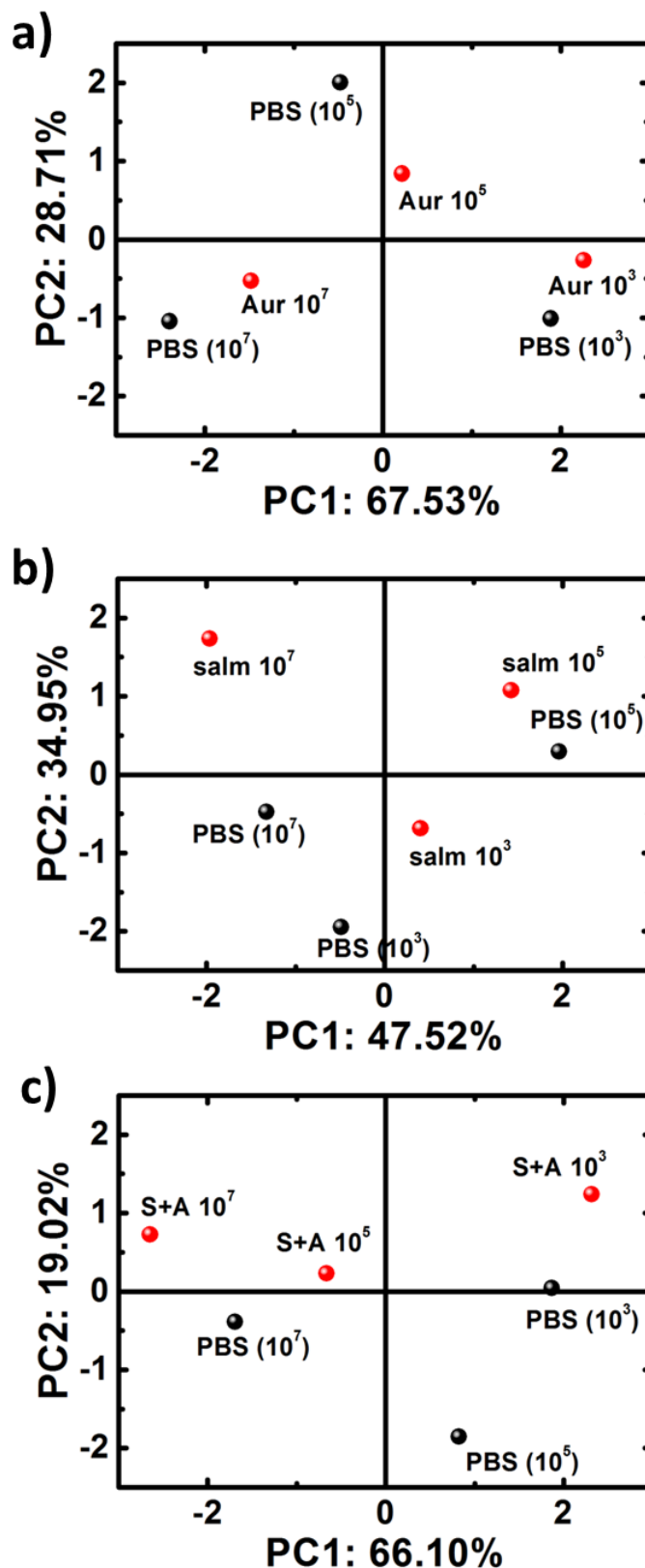


FIGURA 5.25 - Análise das Componentes Principais (PCA) dos conjuntos de unidades sensoriais para análise de cada bactéria a) *S. aureus*; b) *Salmonella* e c) mistura de *S. aureus* + *Salmonella*. Dados obtidos a partir dos valores de capacitância em 1 kHz. Indicadas as concentrações das bactérias com UFC = 10^3 , 10^5 e 10^7 e dos respectivos brancos (PBS).

Pode-se observar que as componentes principais PC1 e PC2 (PC1 + PC2) correspondem a 80% da variância total das informações coletadas pela língua eletrônica, evidenciando uma boa representatividade do sistema. Em todos os casos a resposta do conjunto das arquiteturas propostas apresentou uma boa detecção dos patogênicos nas três concentrações utilizadas, equivalentes aos limites de detecção apresentados na literatura^{39, 70}. Pode-se discriminar amostras com relação a diferentes concentrações de bactérias, e se há ou não a presença delas, sendo gram-positivas, gram-negativas ou mesmo a mistura de ambas.

Na FIGURA 5.25 a), para a bactéria *S. aureus*, a concentração de 10^3 UFC ficou localizada no quadrante positivo de PC1 e no quadrante negativo de PC2; a concentração de 10^5 UFC localizou-se nos quadrantes positivos de PC2 e a concentração de 10^7 UFC localizou-se no quadrante negativo para ambas as PC's (PC1 e PC2). Para a bactéria *Salmonella*, na FIGURA 5.25 b), a concentração de 10^3 UFC localizou-se no quadrante positivo de PC1 e negativo de PC2; 10^5 UFC localizou-se no quadrante positivo da PC1 (oposto a 10^3 UFC) e positivo de PC2 (oposto a 10^7 UFC); já a concentração de 10^7 UFC ficou isolada no negativo de PC1 e positivo de PC2. Ainda, no caso da mistura dos patogênicos, FIGURA 5.25 c), houve a completa separação da presença de contaminantes em dois grupos frente a PC2, estando as soluções contaminadas nos quadrantes positivos de PC2 e as soluções de PBS no quadrante negativo.

6 - CONCLUSÕES

No presente trabalho, foram desenvolvidos e comparados dois sistemas utilizando o conceito de Língua Eletrônica para a detecção de bactérias.

No primeiro conjunto de unidades sensoriais utilizou-se a técnica de *LbL* para o crescimento de filmes nanoestruturados e imobilização das enzimas lisozima, tripsina e pepsina. A fabricação dos filmes apresentaram padrões de crescimento das bicamadas bem definidos e lineares, possibilitando um alto controle da quantidade de massa depositada. Pode-se validar e aplicar a função cinética de Johnson-Mehl-Avrami para descrever o processo por adsorção controlado por difusão no início do crescimento dos filmes enzimáticos, assim como o tempo necessário para o crescimento. Após o crescimento dos filmes, verificou-se que as enzimas continuaram ativas após a imobilização, pela presença de bandas observadas pela técnica de dicroísmo circular referentes às estruturas alfa hélice. Foram propostas arquiteturas utilizando as três enzimas com 1, 3, 5 e 7 bicamadas, e testadas na detecção do patógeno *Escherichia coli* por meio da técnica de Espectroscopia de Impedância Elétrica. Com a análise dos dados de capacitância utilizando a ferramenta estatística da Análise das Componentes Principais (PCA), foi possível realizar uma pequena detecção do patógeno em concentrações de 10^5 UFC e uma detecção satisfatória com concentrações de 10^7 UFC. As análises foram realizadas comparando soluções contaminadas com a bactéria frente a soluções com as respectivas concentrações de meio de cultura.

No segundo conjunto de unidades sensoriais, foram imobilizadas as enzimas lisozima e tripsina por meio de ligações covalentes com o auxílio do glutaraldeído. Propôs-se uma segunda configuração de Língua Eletrônica, contendo dois eletrodos modificados por *LbL* (similares aos utilizados na primeira etapa) em conjunto com dois eletrodos com enzimas imobilizadas de forma covalente. Foram analisadas soluções contaminadas com *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* assim como a mistura das duas bactérias. O desempenho do segundo conjunto de arquiteturas foi superior ao primeiro, possibilitando distinguir baixas concentrações de bactérias a partir de 10^3 UFC.

O segundo conjunto de arquiteturas propostas mostrou-se satisfatório para a detecção global de bactérias, possibilitando detecções na ordem de concentrações de 10^3 UFC, após tratamento da solução. Não foi possível

discriminar/classificar as bactérias como Gram-positiva e/ou Gram-negativas, mas apenas a presença ou não destas no meio em análise.

O sistema de Língua Eletrônica apresentado pode ser utilizado na triagem inicial de amostras na qual se deseja saber se há algum tipo de contaminação, antes da realização de testes/ensaios mais específicos, visando a detecção de contaminantes que podem auxiliar na prevenção de surtos epidêmicos causados por bactérias.

7 - SUGESTÕES DE TRABALHOS FUTUROS

Como sugestões de trabalhos futuros, propomos:

- estudar em detalhes as interações que ocorrem entre as bactérias e a superfície modificada;
- avaliar o efeito do pH e da temperatura da solução e sua influência na detecção das bactérias;
- empregar estas arquiteturas em outros tipos de eletrodos para medidas eletroquímicas;
- empregar o conjunto de arquiteturas para análise de amostras reais;
- avaliar um potencial uso das diferentes unidades sensoriais na detecção de substâncias químicas, como agrotóxicos, além de verificar sua toxicidade;
- acoplar as unidades sensoriais em um sistema microfluídico / nanofluídico para miniaturização do sistema;
- analisar os dados utilizando o *software* PEx-Sensors.

REFERÊNCIAS

1. http://www.anrbrasil.org.br/new/pdfs/2014/3_PAINEL_1_ApresentacaoRejaneAlvesVigilanciaEpidemiologica-VE-DTA-Agosto_2014_PDF.pdf. Acessado em 29 de junho de 2016 às 09hrs.
2. SPARBIER, K.; WELLER, U.; BOOGEN, C. & KOSTRZEWA, M. "Rapid detection of *Salmonella* sp. by means of a combination of selective enrichment broth and MALDI-TOF MS". *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, **31** : 767, 2012.
3. ZHANG, D.; YAN, Y.; LI, Q.; YU, T.; CHENG, W.; WANG, L.; JU, H. & DING, S. "Label-free and high-sensitive detection of *Salmonella* using a surface plasmon resonance DNA-based biosensor". *J. Biotechnol.*, **160** : 123, 2012.
4. DAUM, L. T.; BARNES, W. J.; MCAVIN, J. C.; NEIDERT, M. S.; COOPER, L. A.; HUFF, W. B.; RIGGINS, W. S.; MORRIS, S.; SALMEN, A.; LOHMAN, L.; GAUL, L. & LOHMAN, K. L. "Real-Time PCR detection of *Salmonella* in suspect foods from a gastroenteritis outbreak in Kerr County , Texas". *J. Clin. Microbiol.*, **40** : 3050, 2002.
5. PERELLE, S.; DILASSER, F.; MALORNY, B.; GROUT, J.; HOORFAR, J. & FACH, P. "Comparison of PCR-ELISA and LightCycler real-time PCR assays for detecting *Salmonella* spp. in milk and meat samples". *Mol. Cell. Probes*, **18** : 409, 2004.
6. LAN, Y.; WANG, S.; YIN, Y.; HOFFMANN, W. C. & ZHENG, X. "Using a surface plasmon resonance biosensor for rapid detection of *Salmonella* Typhimurium in chicken carcass". *J. Bionic Eng.*, **5** : 239, 2008.
7. SU, X. L. & LI, Y. "A QCM immunosensor for *Salmonella* detection with simultaneous measurements of resonant frequency and motional resistance". *Biosens. Bioelectron.*, **21** : 840, 2005.
8. PARK, I. S.; KIM, W. Y. & KIM, N. "Operational characteristics of an antibody-immobilized QCM system detecting *Salmonella* spp". *Biosens. Bioelectron.*, **15** : 167, 2000.
9. FUNG, Y. S. & WONG, Y. Y. "Self-assembled monolayers as the coating in a quartz piezoelectric crystal immunosensor to detect *Salmonella* in aqueous solution". *Anal. Chem.*, **73** : 5302, 2001.
10. HORVATH, R.; PEDERSEN, H. C.; SKIVESEN, N.; SELMECZI, D. & LARSEN, N. B. "Optical waveguide sensor for on-line monitoring of bacteria". *Opt. Lett.*, **28** : 1233, 2003.
11. KO, S. & GRANT, S. A. "A novel FRET-based optical fiber biosensor for rapid detection of *Salmonella typhimurium*". *Biosens. Bioelectron.*, **21** : 1283, 2006.
12. JAIN, S.; CHATTOPADHYAY, S.; JACKERAY, R.; ABID, C. K. V. Z.; KOHLI, G. S. & SINGH, H. "Highly sensitive detection of *Salmonella typhi* using surface aminated polycarbonate membrane enhanced-ELISA". *Biosens. Bioelectron.*, **31** : 37, 2012.
13. FILHO, O. F. & CAPELATO, M. D. "Biossensores". *Química nova*, **15** : 28 1992.

14. CORREA, D. S.; MEDEIROS, E. S.; OLIVEIRA, J. E.; PATERNO, L. G. & MATTOSO, L. H. C. "Nanostructured conjugated polymers in chemical sensors: synthesis, properties and applications". *J. Nanosci. Nanotechnol.*, **14** : 6509, 2014.
15. BURATTI, S.; BALLABIO, D.; GIOVANELLI, G.; ZULUANGA DOMINGUEZ, C. M.; MOLES, A.; BENEDETTI, S. & SINELLI, N. "Monitoring of alcoholic fermentation using near infrared and mid infrared spectroscopies combined with electronic nose and electronic tongue. *Anal. Chim. Acta*, **697** : 67, 2011.
16. TOKO, K.; MATSUNO, T.; YAMAFUJI, K.; HAYASHI, K.; IKEZAKI, H.; SATO, K.; TOUKUBO, R. & KAWARAI, S. "Multichannel taste sensor using electric potential changes in lipid membranes". *Biosens. Bioelectron.*, **9** : 359, 1994.
17. LIU, N.; LIANG, Y.; BIN, J.; ZHANG, Z.; HUANG, J.; SHU, R. & YANG, K. "Classification of green and black teas by PCA and SVM analysis of cyclic voltammetric signals from metallic oxide-modified electrode". *Food Anal. Methods*, **7** (2) : 472, 2014.
18. WINQUIST, F.; BJORKLUND, R.; KRANTZ-RÜLCKER, C.; LUNDSTRÖM, I.; ÖSTERGREN, K. & SKOGLUND, T. "An electronic tongue in the dairy industry". *Sensors and Actuators B*, **111** : 299, 2005.
19. RIUL JR., A.; MALMEGRIM, R. R.; FONSECA, F. J. & MATTOSO, L. H. C. "Nano-assembled films for taste sensor application". *Artif. Organs*, **27** : 469, 2003.
20. KATAOKA, M.; MIYANAGA, Y.; TSUJI, E. & UCHIDA, T. "Evaluation of bottled nutritive drinks using a taste sensor". *Int. J. Pharm.*, **279** : 107, 2004.
21. KOBAYASHI, Y.; HABARA, M.; IKEZAKI, H.; CHEN, R., NAITO, Y. & TOKO, K. "Advanced taste sensors based on artificial lipids with global selectivity to basic taste qualities and high correlation to sensory scores". *Sensors*, **10** (4) : 3411, 2010.
22. NIDZWORSKI, D.; PRANSZKE, P.; GRUDNIEWSKA, M.; KRÓL, E. & GROMADZKA, B. "Universal biosensor for detection of influenza virus". *Biosens. Bioelectron.*, **59** : 239, 2014.
23. YANG, L. & BASHIR, R. "Electrical/electrochemical impedance for rapid detection of foodborne pathogenic bacteria". *Biotechnol. Adv.*, **26** : 135, 2008.
24. SERGEEV, N.; DISTLER, M.; COURTNEY, S.; AL-KHALDI, S. F.; VOLOKHOV, D.; CHIZHIKOV, V. & RASOOLY, A. "Multipathogen oligonucleotide microarray for environmental and biodefense applications". *Biosens. Bioelectron.*, **20** (4) : 684, 2004.
25. YANG, L. & LI, Y. "Detection of viable *Salmonella* using microelectrode-based capacitance measurement coupled with immunomagnetic separation". *J. Microbiol. Methods*, **64** : 9, 2006.
26. YANG, L.; RUAN, C. & LI, Y. "Detection of viable *Salmonella typhimurium* by impedance measurement of electrode capacitance and medium resistance". *Biosens. Bioelectron.*, **19** : 495, 2003.
27. JANEGITZ, B. C.; CANCINO, J. & ZUCOLOTTO, V. "Disposable biosensors for

- clinical diagnosis". *J. Nanosci. Nanotechnol.*, **14** : 378, 2014.
28. RIUL JR., A.; DANTAS, C. A. R.; MIYAZAKI, C. M. & OLIVEIRA, O. N. "Recent advances in electronic tongues". *Analyst*, **135** : 2481, 2010.
29. MARCH, G.; NGUYEN, T. & PIRO, B. "Modified electrodes used for electrochemical detection of metal ions in environmental analysis". *Biosensors*, **5** : 241, 2015.
30. OLIVEIRA, J. E.; CONSOLIN-FILHO, N.; PATERNO, L. G.; MATTOSO, L. H. C. & MEDEIROS, E. S. "Uso de polímeros condutores em sensores. Parte 3: Biossensores". *Rev. Eletrônica Mater. e Process.*, **8** : 1, 2013.
31. MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; STAHL, D. A. & CLARK, D. P. *Brock Biology of Microorganisms*. 13a ed. San Fransisco, Benjamin Cummings, 2012.
32. DE MORAIS, L. C.; BERNARDES-FILHO, R. & ASSIS, O. B. G. "Wettability and bacteria attachment evaluation of multilayer proteases films for biosensor application". *World J. Microbiol. Biotechnol.*, **25** : 123, 2009.
33. VOET, D.; VOET, J. G. & PRATT, C. W. *Fundamentos de Bioquímica*. Porto Alegre, Artmed, 2000.
34. [http://chem.libretexts.org/Textbook_Maps/Introductory_Chemistry_Textbook_Maps/Map%3A_The_Basics_of_GOB_Chemistry_\(Ball_et_al.\)/20%3A_Energy_Metabolism/20.2%3A_Stage_I_of_Catabolism](http://chem.libretexts.org/Textbook_Maps/Introductory_Chemistry_Textbook_Maps/Map%3A_The_Basics_of_GOB_Chemistry_(Ball_et_al.)/20%3A_Energy_Metabolism/20.2%3A_Stage_I_of_Catabolism). Acessado em 24 de agosto de 2016 às 10hrs.
35. KAYUSHINA, R. L.; STEPINA, N. D.; BELYAEV, V. V. & KHURGIN, Y. I. "X-ray reflectivity study of the self-assembly of ordered lysozyme films". *Crystallogr. Reports*, **41** : 146, 1996.
36. BON, E. P. S.; FERRARA, M. A. & CORVO, M. L. *Enzimas em Biotecnologia : Produção, Aplicações e Mercado*. 1a ed., Interciência, 2008. p. 506.
37. MURDOCK, C. A. & MATTHEWS, K. R. "Antibacterial activity of pepsin-digested lactoferrin on foodborne pathogens in buffered broth systems and ultra-high temperature milk with EDTA". *J. Appl. Microbiol.*, **93** : 850, 2002.
38. GUEDIDI, S.; PORTUGAL, C. A. M.; INNOCENT, C.; JANOT, J. M.; DERATANI, A. & CRESPO, J. G. "Fluorescence monitoring of trypsin adsorption in layer-by-layer membrane systems". *Enzyme Microb. Technol.*, **51** (6) : 325, 2012.
39. VARSHNEY, M. & LI, Y. "Interdigitated array microelectrodes based impedance biosensors for detection of bacterial cells". *Biosens. Bioelectron.*, **24** : 2951, 2009.
40. YANG, L.; LI, Y. & ERF, G. F. "Interdigitated array microelectrode-based electrochemical impedance immunosensor for detection of *Escherichia coli* O157:H7". *Anal. Chem.*, **76** : 1107, 2004.
41. YANG, L. & GUISEPPI-ELIE, A. "Impedimetric biosensors for nano- and microfluidics". IN: *Encyclopedia of Microfluidics and Nanofluidics*. LI, D. (Eds.). Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Springer, 2008. p. 811–823.
42. VAN GERWEN, P.; LAUREYS, W.; HUYBERECHTS, G.; DE BAECK, M.; BAERT,

- K.; SULLS, J.; VARLAN, A.; SANSEN, W.; HERMANS, L.; MERTENS, R. "Nanoscaled interdigitated electrode arrays for biochemical sensors". Proceedings of International Solid State Sensors and Actuators Conference (Transducers '97), **2** : 907, 1998.
43. RONKAINEN, N. J.; HALSALL, H. B. & HEINEMAN, W. R. "Electrochemical biosensors". Chem. Soc. Rev., **39** : 1747, 2010.
44. VARSHNEY, M. & LI, Y. "Interdigitated array microelectrode based impedance biosensor coupled with magnetic nanoparticle-antibody conjugates for detection of Escherichia coli O157:H7 in food samples". Biosens. Bioelectron., **22** : 2408, 2007.
45. 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, **210** : 831, 1992.
46. DECHER, G.; ECKLE, M.; SCHMITT, J. & STRUTH, B. "Layer-by-layer assembled multicomposite films". Curr. Opin. Colloid Interface Sci., **3** : 32, 1998.
47. XU, H. & SCHLENOFF, J. B. "Kinetics, isotherms, and competition in polymer adsorption using the quartz crystal microbalance". Langmuir, **10** : 241, 1994.
48. SCHLENOFF, J. B.; RMAILE, A. H. & BUCUR, C. B. "Hydration contributions to association in polyelectrolyte multilayers and complexes: visualizing hydrophobicity". J. Am. Chem. Soc., **130** : 13589, 2008.
49. CLARK, S. L. & HAMMOND, P. T. "The role of secondary interactions in selective electrostatic multilayer deposition". Langmuir, **16** : 10206, 2000.
50. IOST, R. M. & CRESPILO, F. N. "Layer-by-layer self-assembly and electrochemistry: Applications in biosensing and bioelectronics". Biosens. Bioelectron., **31** : 1, 2012.
51. LVOV, Y.; ARIGA, K.; ICHINOSE, I. & KUNITAKE, T. "Assembly of multicomponent protein films by means of electrostatic layer-by-layer adsorption". J. Am. Chem. Soc., **117** : 6117, 1995.
52. DENG, C.; CHEN, J.; NIE, Z. & SI, S. "A sensitive and stable biosensor based on the direct electrochemistry of glucose oxidase assembled layer-by-layer at the multiwall carbon nanotube-modified electrode". Biosens. Bioelectron., **26** : 213, 2010.
53. LVOV, Y.; DECHER, G. & SUKHORUKOV, G. "Assembly of thin films by means of successive deposition of alternate layers of DNA and Poly(allylamine)". Macromolecules, **26** : 5396, 1993.
54. COSNIER, S. & HOLZINGER, M. "Biosensors based on electropolymerized films". IN: Electropolymerization: Concepts, Materials and Applications. COSNIER, S. & KARYAKIN, A. (Eds.). Wiley-Verlag, Wiley, 2010. p. 189-213.
55. SOARES, J. C.; SHIMIZU, F. M.; SOARES, A. C.; CASELI, L.; FERREIRA, J. & OLIVEIRA, O. N. "Supramolecular control in nanostructured film architectures for detecting breast cancer". ACS Appl. Mater. Interfaces, **7** (22) : 11833, 2015.
56. ZABORSKY, O. "Immobilized enzymes". Science, **184** : 56, 1974.

57. KENNEDY, J. F. & ROIG, M. G. "Principles of immobilization of enzymes". IN: Handbook of Enzyme Biotechnology. London, T. P. Press, 1995. p. 235-310.
58. JIN, W.; BIER, F.; WOLLENBERGER, U. & SCHELLER, F. "Construction and characterization of a multi-layer enzyme electrode: Covalent binding of quinoprotein glucose dehydrogenase onto gold electrodes". Biosens. Bioelectron., **10** : 823, 1995.
59. ANZAI, J. I.; KOBAYASHI, Y.; NAKAMURA, N. & HOSHI, T. "Use of Con A and mannose-labeled enzymes for the preparation of enzyme films for biosensors". Sensors and Actuators B, **65** : 94, 2000.
60. KOBAYASHI, Y. & ANZAI, J. I. "Preparation and optimization of bienzyme multilayer films using lectin and glyco-enzymes for biosensor applications". J. Electroanal. Chem., **507** : 250, 2001.
61. HUANG, T.; GENG, T.; STURGIS, J.; LI, H.; GOMEZ, R.; BASHIR, R.; BHUNIA, A. K.; ROBINSON, J. P. & LADISCH, M. R. "Lysozyme for capture of microorganisms on protein biochips". Enzyme Microb. Technol., **33** (7) : 958, 2003.
62. ASSIS, O. B. G. & CLARO, L. C. "Immobilized lysozyme protein on fibrous medium: Preliminary results for microfiltration applications". Electron. J. Biotechnol., **6** : 69, 2003.
63. BALL, V. & RAMSDEN, J. J. "Absence of surface exclusion in the first stage of lysozyme adsorption is driven through electrostatic self-assembly". J. Phys. Chem. B, **101** : 5465, 1997.
64. GOLE, A.; SASTRY, M.; DASH, C. & RAO, M. "Encapsulation and biocatalytic activity of the enzyme pepsin in fatty lipid films by selective electrostatic interactions". Chem. Commun., **4** : 297, 2000.
65. EHRET, R.; BAUMANN, W.; BRISCHWEIN, M.; SCHWINDE, A.; STEGBAUER, K. & WOLF, B. "Monitoring of cellular behaviour interdigitated AG Medizinische impedance measurements on electrode structures". Biosens. Bioelectron., **12** (1) : 29, 1997.
66. DAMOS, F. S.; MENDES, R. K. & KUBOTA, L. T. "Aplicações de QCM, EIS e SPR na investigação de superfícies e interfaces para o desenvolvimento de (bio)sensores". Quim. Nova, **27** : 970, 2004.
67. <https://www.photophysics.com/resources/tutorials/circular-dichroism-cd-spectroscopy>. Acessado em 19 novembro 2016 às 14hrs.
68. STRASSBURGER, J.; HOSSBACH, J. & SEIDEL, R. "Application of impedimetry to rapid assessment of liquid culture media". Zentralblatt für Bakteriologie, **274** : 481, 1991.
69. SHEPPARD, N. F.; TUCKER, R. C. & WU, C. "Electrical conductivity measurements using microfabricated interdigitated electrodes". Anal. Chem., **65** : 1199, 1993.
70. IVNITSKI, D.; ABDEL-HAMID, I.; ATANASOV, P. & WILKINS, E. "Biosensors for detection of pathogenic bacteria". Biosens. Bioelectron., **14** : 599, 1999.

71. TAYLOR, D. M. & MACDONALD, A. G. "AC admittance of the metal / insulator / electrolyte interface". *J. Phys. D. Appl. Phys.*, **20** : 1277, 1987.
72. RIUL JR.; A. GALLARDO SOTO, A. M.; MELLO, S. V.; BONE, S.; TAYLOR, D. M. & MATTOSO, L. H. C. "An electronic tongue using polypyrrole and polyaniline". *Synth. Met.*, **132** (2) : 109, 2003.
73. RIUL JR., A.; DOS SANTOS, D. S.; WOHNATH, K.; DI TOMMAZO, R.; CARVALHO, A. C. P. L. F.; FONSECA, F. J.; OLIVEIRA JR., O. N.; TAYLOR, D. M. & MATTOSO, L. H. C. "Artificial taste sensor: Efficient combination of sensors made from Langmuir-Blodgett films of conducting polymers and a ruthenium complex and self-assembled films of an azobenzene-containing polymer". *Langmuir*, **18** : 239, 2002.
74. GOMEZ, R.; BASHIR, R. & SARIKAYA, A. "Microfluidic biochip for impedance spectroscopy of biological species". *Biomed. Microdevices*, **3** : 201, 2001.
75. HAYASHI, K.; YAMANAKA, M.; TOKO, K. & YAMAFUJI, K. "Multichannel taste sensor using lipid membranes". *Sensors and Actuators B*, **2** : 205, 1990.
76. VLASOV, Y.; LEGIN, A. & RUDNITSKAYA, A. "Electronic tongues and their analytical application". *Anal. Bioanal. Chem.*, **373** : 136, 2002.
77. DYMINSKI, D. S.; TAKEDA, H. H.; MATTOSO, L. H. C. & CANDIDO, L. M. B. "Revisão: Aplicações e funcionamento das Línguas Eletrônicas e a Língua Eletrônica Brasileira". *Braz. J. Food Technol.*, **8** : 312, 2005.
78. RIUL JR., A.; MATTOSO, L. H. C.; FONSECA, F. J.; TAYLOR, D. M.; MELLO, S. V. & VENANCIO, E. C. "Sensor à base de Plásticos Condutores e Lipídios para Avaliação de Paladar de Bebidas (Língua Eletrônica)". 2001 (PI: 0103502-9).
79. RIUL JR., A.; MALMEGRIM, R. R.; FONSECA, F. J. & MATTOSO, L. H. C. "An artificial taste sensor based on conducting polymers". *Biosens. Bioelectron.*, **18** : 1365, 2003.
80. BRAGA, G. S.; PATERNO, L. G. & FONSECA, F. J. "Performance of an electronic tongue during monitoring 2-methylisoborneol and geosmin in water samples". *Sensors and Actuators B*, **171** : 181, 2012.
81. SIQUEIRA, J. R.; CASELI, L.; CRESPILO, F. N.; ZUCOLOTTI, V. & OLIVEIRA, O. N. "Immobilization of biomolecules on nanostructured films for biosensing". *Biosens. Bioelectron.*, **25** : 1254, 2010.
82. FERREIRA, M.; RIUL JR., A.; WOHNATH, K.; FONSECA, F. J.; OLIVEIRA JR., O. N. & MATTOSO, L. H. C. "High-performance taste sensor made from Langmuir – Blodgett films of conducting polymers and a ruthenium complex". *Anal. Chem.*, **75** (4) : 953, 2003.
83. D'AMICO, A.; DI NATALE, C. & PAOLESSE, R. "Portraits of gasses and liquids by arrays of nonspecific chemical sensors: trends and perspectives". *Sensors and Actuators B*, **68** : 324, 2000.
84. TOKO, K. "Taste sensor". *Sensors and Actuators B*, **64** : 205, 2000.

85. TUREK, M.; HEIDEN, W.; RIESEN, A.; CHHABDA, T. A.; SCHUBERT, J.; ZANDER, W.; KRÜGER, P.; KEUSGEN, M. & SCHÖNING, M. J. "Artificial intelligence/fuzzy logic method for analysis of combined signals from heavy metal chemical sensors". *Electrochim. Acta*, **54** : 6082, 2009.
86. PAULOVICH, F. V.; MORAES, M. L.; MAKI, R. M.; FERREIRA, M.; OLIVEIRA JR., O. N. & DE OLIVEIRA, M. C. F. "Information visualization techniques for sensing and biosensing". *Analyst*, **136** : 1344, 2011.
87. VOLPATI, D.; AOKI, P. H. B.; DANTAS, C. A. R.; PAULOVICH, F. V.; DE OLIVEIRA, M. C. F.; OLIVEIRA JR., O. N.; RIUL JR., A.; AROCA, R. F. & CONSTANTINO, C. J. L. "Toward the optimization of an e-tongue system using information visualization: A case study with perylene tetracarboxylic derivative films in the sensing units". *Langmuir*, **28** : 1029, 2012.
88. RIUL JR., A.; DE SOUSA, H. C.; MALMEGRIM, R. R.; DOS SANTOS, D. S.; CARVALHO, A. C. P. L. F.; FONSECA, F. J.; OLIVEIRA JR., O. N. & MATTOSO, L. H. C. "Wine classification by taste sensors made from ultra-thin films and using neural networks". *Sensors and Actuators B*, **98** : 77, 2004.
89. TAHARA, Y.; NAKASHI, K.; JI, K.; IKEDA, A. & TOKO, K. "Development of a portable taste sensor with a lipid/polymer membrane". *Sensors*, **13** : 1076, 2013.
90. HERAS, J. Y.; PALLAROLA, D. & BATTAGLINI, F. "Electronic tongue for simultaneous detection of endotoxins and other contaminants of microbiological origin". *Biosens. Bioelectron.*, **25** : 2470, 2010.
91. KIRSANOV, D.; ZADOROZHNYAYA, O.; KRASHENINNIKOV, A.; KOMAROVA, N.; POPOV, A. & LEGIN, A. "Water toxicity evaluation in terms of bioassay with an Electronic Tongue". *Sensors and Actuators B*, **179** : 282, 2013.
92. SÖDERSTRÖM, C.; WINQUIST, F. & KRANTZ-RÜLCKER, C. "Recognition of six microbial species with an electronic tongue". *Sensors and Actuators B*, **89** : 248, 2003.
93. CAMPOS, I.; PASCUAL, L.; SOTO, J.; GIL-SÁNCHEZ, L. & MARTÍNEZ-MÁEZ, R. "An Electronic Tongue designed to detect ammonium nitrate in aqueous solutions". *Sensors*, **13** : 14064, 2013.
94. KHAN, R. R.; KHALILIAN, A. & KANG, S.-W. "A high sensitivity IDC-Electronic Tongue using dielectric/sensing membranes with solvatochromic dyes". *Sensors*, **16** : 668, 2016.
95. ESCUDER-GILABERT, L. & PERIS, M. "Review: Highlights in recent applications of electronic tongues in food analysis". *Anal. Chim. Acta*, **665** : 15, 2010.
96. CALBO, A. G.; CORRÊA, D. S. & HERRMANN JR., P. S. DE P. "Sensores para líquidos e gases". IN: *Conceitos e Aplicações da Instrumentação para o Avanço da Agricultura*. NAIME, J. M.; MATTOSO, L. H. C.; SILVA, W. T. L.; CRUVINEL, P. E.; MARTIN-NETO, L. & CRESTANA, S. (Eds.). Brasília, Embrapa, 2014. p. 243–281.
97. VICINI, L. *Análise Multivariada Da Teoria À Prática*. Santa Maria, Centro de Ciências Naturais e Exatas – UFSM, 2005. Monografia, 215 p.

98. LYRA, W. S.; SILVA, E. C.; ARAÚJO, M. C. U.; FRAGOSO, W. D. & VERAS, G. "Classificação periódica: um exemplo didático para ensinar análise de componentes principais". *Quim. Nova*, **33** : 1594, 2010.
99. RAYMUNDO-PEREIRA, P. A.; SHIMIZU, F. M.; COELHO, D.; PIAZZETA, M. H. O.; GOBBI, A. L.; MACHADO, S. A. S. & OLIVEIRA JR., O. N. "A nanostructured bifunctional platform for sensing of glucose biomarker in artificial saliva: synergy in hybrid Pt/Au surfaces". *Biosens. Bioelectron.*, **86** : 369, 2016.
100. MANAHAN, S. E. *Environmental Chemistry*. 8a ed. Boca Raton, CRC Press, 2000. p. 743.
101. ABRAHÃO, D. S.; TOLEDO PIZA, A. R.; MARTINS, M. A.; SILVA NETO, J. C.; FERREIRA, E. C. J.; RAPADO, L. N.; HOSODA, T. M.; SILVA, R. C.; AZZUZ, A. C.; TANIWAKI, N. N. & PIRES, M. F. C. "Estudo comparativo com diversos fixadores para aplicação em microscopia eletrônica de transmissão". *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, **63** : 248, 2004.
102. BORATO, C. E.; HERRMANN, P. S. P.; COLNAGO, L. A.; OLIVEIRA JR., O. N. & MATTOSO, L. H. C. "Using the self-assembly technique for the fabrication of ultra-thin films of a protein". *Brazilian J. Chem. Eng.*, **14** (1) : 1997.
103. LVOV, Y.; ARIGA, K.; ONDA, M.; ICHINOSE, I. & KUNITAKE, T. "A careful examination of the adsorption step in the alternate layer-by-layer assembly of linear polyanion and polycation". *Colloids and Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.*, **146** : 337, 1999.
104. RAPOSO, M. & OLIVEIRA, O. N. "Adsorption of poly(o-methoxyaniline) in layer-by-layer films". *Langmuir*, **18** : 6866, 2002.
105. LVOVICH, V. F. *Impedance spectroscopy : applications to electrochemical and dielectric phenomena*. Hoboken, Wiley, 2012.
106. VETTER, K. J. *Electrochemical kinetics : theoretical and experimental aspects*. New York, Academic Press, 1967.
107. YANG, L.; LI, Y.; GRIFFIS, C. L. & JOHNSON, M. G. "Interdigitated microelectrode (IME) impedance sensor for the detection of viable *Salmonella typhimurium*". *Biosens. Bioelectron.*, **19** : 1139, 2004.
108. SCHMID, F.-X. "Biological macromolecules: UV-visible spectrophotometry in encyclopedia of life sciences". IN: *Encyclopedia of Life Sciences*. MACMILLAN PUBLISHERS (Eds.). London, Nature Publishing Group, 2001. p. 1-4.
109. ARIGA, K.; JI, Q. & HILL, J. P. "Enzyme-encapsulated Layer-by-Layer assemblies: current status and challenges toward ultimate nanodevices". IN: *Advances in Polymer Science*. CARUSO, F. (Eds.). Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Springer, 2010. p. 51–87.
110. FERREIRA, M. & RUBNER, M. F. "Molecular-level processing of conjugated polymers. 1. Layer-by-layer manipulation of conjugated polyions". *Macromolecules*, **28** (21) : 7107, 1995.

111. CONSTANTINE, C. A.; MELLO, S. V.; DUPONT, A.; CAO, X.; SANTOS, D.; OLIVEIRA JR., O. N.; STRIXINO, F. T.; PEREIRA, E. C.; CHENG, T.; DEFRANK, J. J. & LEBLANC, R. M. "Layer-by-Layer self-assembled chitosan/poly(thiophene-3-acetic acid) and organophosphorus hydrolase multilayers". *J. Am. Chem. Soc.*, **125** : 1805, 2003.
112. RAPOSO, M.; PONTES, R. S.; MATTOSO, L. H. C. & OLIVEIRA, O. N. "Kinetics of adsorption of Poly(o-methoxyaniline) self-assembled films". *Macromolecules*, **30** : 6095, 1997.
113. MANZOLI, A.; SHIMIZU, F. M.; MERCANTE, L. A.; PARIS, E. C.; OLIVEIRA JR., O. N.; CORREA, D. S. & MATTOSO, L. H. C. "Layer-by-layer fabrication of AgCl–PANI hybrid nanocomposite films for electronic tongues". *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **16** : 24275, 2014.
114. KELLY, S. M.; JESS, T. J. & PRICE, N. C. "How to study proteins by circular dichroism". *Biochim. Biophys. Acta*, **1751** : 119, 2005.
115. OLIVEIRA, J. E.; SCAGION, V. P.; GRASSI, V.; CORREA, D. S. & MATTOSO, L. H. C. "Modification of electrospun nylon nanofibers using layer-by-layer films for application in flow injection electronic tongue: Detection of paraoxon pesticide in corn crop". *Sensors and Actuators B*, **171** : 249, 2012.
116. ZOU, Z.; KAI, J.; RUST, M. J.; HAN, J. & AHN, C. H. "Functionalized nano interdigitated electrodes arrays on polymer with integrated microfluidics for direct bio-affinity sensing using impedimetric measurement". *Sensors and Actuators A*, **136** : 518, 2007.
117. EHRET, R.; BAUMANN, W.; BRISCHWEIN, M.; SCHWINDE, A. & WOLF, B. "On-line control of cellular adhesion with impedance measurements using interdigitated electrode structures". *Med. Biol. Eng. Comput.*, **36** : 365, 1998.
118. ABDI, H. & WILLIAMS, L. J. "Principal component analysis". *Wiley Interdiscip. Rev. Comput. Stat.*, **2** : 433, 2010.
119. GENG, L.; LI, N.; XIANG, M.; WEN, X.; XU, D.; ZHAO, F. & LI, K. "The covalent immobilization of trypsin at the galleries of layered γ -zirconium phosphate". *Colloids Surfaces B Biointerfaces*, **30** : 99, 2003.
120. FARRIS, S.; SCHAICH, K. M.; LIU, L.; PIERGIOVANNI, L. & YAM, K. L. "Development of polyion-complex hydrogels as an alternative approach for the production of bio-based polymers for food packaging applications: a review". *Trends Food Sci. Technol.*, **20** : 316, 2009.
121. BARBOSA, O.; ORTIZ, C.; BERENQUER-MURCIA, A.; TORRES, R.; RODRIGUES, R. C. & FERNANDEZ-LAFUENTE, R. "Glutaraldehyde in bio-catalysts design: a useful crosslinker and a versatile tool in enzyme immobilization". *RSC Adv.*, **4** : 1583, 2014.
122. SOARES, J. C.; SOARES, A. C.; PEREIRA, P. A. R.; RODRIGUES, V. C.; SHIMIZU, F. M.; MELENDEZ, M. E.; SCAPULATEMPO NETO, C.; CARVALHO, A. L.; LEITE, F. L.; MACHADO, S. A. S. & OLIVEIRA JR., O. N. "Adsorption according to the Langmuir–Freundlich model is the detection mechanism of the antigen p53 for

early diagnosis of cancer". *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **18** : 8412, 2016.

123. HAMAD, E. M.; BILATTO, S. E. R.; ADLY, N. Y.; CORREA, D. S.; WOLFRUM, B.; SCHÖNING, M. J.; OFFENHÄUSSER, A. & YAKUSHENKO, A. "Inkjet printing of UV-curable adhesive and dielectric inks for microfluidic devices". *Lab Chip*, **16** : 70, 2016.

TRABALHOS PRODUZIDOS NO PERÍODO

Estágio no Forschungszentrum Jülich (Alemanha)

Um resumo referente ao período de estágio no exterior será apresentado no APÊNDICE II.

Artigos Publicados em Periódicos

- HAMAD, E. M.; BILATTO, S. E. R.; ADLY, N. Y.; CORREA, D. S.; WOLFRUM, B.; SCHÖNING, M. J.; OFFENHÄUSSER, A. AND YAKUSHENKO, A., “Inkjet printing of UV-curable adhesive and dielectric inks for microfluidic devices”. *Lab Chip*, **16** : 70, 2016.

Artigos Submetidos para Publicação

- BILATTO, S. E. R.; ADLY, N.; CORREA, D. S.; WOLFRUM, B.; OFFENHAUSSER, A. & YAKUSHENKO, A. “Printed microfluidic filter for heparinized blood”. *Biomedical Microdevices*.
- HOFFMEISTER, C.; FANDARUFF, C.; COSTA, M.; CABRAL, L.; PITTA, L.; BILATTO, S. E. R.; PRADO, L.; CORREA, D. S.; TASSO, L.; SILVA, M. & ROCHA, H. “Efavirenz dissolution enhancement iii: colloid milling, pharmacokinetics and electronic tongue evaluation”. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*.

Artigos em andamento

- SHIMIZU, F. M.; BILATTO, S. E. R.; CORREA, D. S.; MATTOSO, L. H. C. & OLIVEIRA JR., O. N. “Fabrication and characterization of LbL enzymatic film for using on electronic tongue bacteria detection”.

Trabalhos Publicados em Anais de Congressos

- STANLEY BILATTO; ALEXEY YAKUSHENKO; DANIEL CORREA; BERNHARD WOLFRUM; ANDREAS OFFENHAUSSER. *3D printed microfluidics for blood filtration*. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, v.4, p.2016.01.00959, (2016).

Resumos Publicados em Anais de Congressos

- SHIMIZU, F. M.; BILATTO, S. E. R.; CORREA, D. S.; ASSIS, O. B. G.; MATTOSO, L. H. C.; OLIVEIRA JR., O. N. *Nanostructured biosensor based on Layer-by-Layer films for use in an e-tongue to detect E. coli. XV Brazilian MRS Meeting*, Campinas (2016).
- BILATTO, S. E. R.; SHIMIZU, F. M.; OLIVEIRA JR, O. N.; ASSIS, O. B. G.; MATTOSO, L. H. C.; CORREA, D. S. *Development of nanostructured architectures to electrochemical biosensors using self-assembly technique. VIII Workshop de Nanotecnologia Aplicada ao Agronegócio*, Juiz de Fora (2014).
- BILATTO, S. E. R.; MANZOLI, A.; OLIVEIRA, J. E.; PASCHOALIN, R. T.; SCAGION, V. P.; SHIMIZU, F. M.; CORREA, D. S.; MATTOSO, L. H. C. *Physico-chemical characterization of conductive Nylon/Polypyrrole electrospun nanofibers. 2nd INTERNATIONAL CONFERENCE on Bioinspired and Biobased Chemistry & Materials*, Nice (2014).
- BILATTO, S. E. R.; DANIEL S. CORRÊA; COSTA, M. A.; CRISTIANE R. D. HOFFMEISTER; HELVÉCIO ROCHA; LUIZ H.C. MATTOSO. *Electronic tongue application to drug analysis: modifications in efavirenz formulations. VII Workshop de Nanotecnologia Aplicada ao Agronegócio*, São Carlos (2013).
- BILATTO, S. E. R.; DANIEL S. CORRÊA; COSTA, M. A.; CRISTIANE R. D. HOFFMEISTER; HELVÉCIO ROCHA; LUIZ H.C. MATTOSO. *Electronic Tongue based in conductive polymers to drug analysis: modifications in Efavirenz formulations. 12° Congresso Brasileiro de Polímeros (12° CBPol)*, Florianópolis (2013).

APÊNDICE I

Projection Explorer for Sensors / Interactive Document Mapping (PEX-Sensors/IDMAP)^{86, 122}

Introdução

PexSensors é um *software* livre que emprega técnicas para criar representações visuais de dados de grande dimensão gerados por unidades sensoriais, conhecidas como técnicas de projeção multidimensional. Este *software*, como no caso da PCA, permite visualizar uma grande quantidade de dados, principalmente quando estão envolvidas características de classificação e *clustering*, como sensores e biossensores.

Este *software* livre foi especialmente desenvolvido para analisar dados de espectroscopia de impedância elétrica em línguas eletrônicas e demais sensores. A vantagem de sua utilização deve-se a possibilidade de analisar-se de uma só vez todas as curvas de impedância vs frequência obtidas por várias unidades sensoriais em uma variedade de amostras.

O PexSensors utiliza técnicas de projeção não-linear, como *Interactive Document Map* ou IDMAP, que proporcionam melhor habilidade de distinção do que métodos lineares, quando utilizados em conjuntos de sensores capazes de realizar reconhecimentos moleculares. Há a possibilidade de otimização na escolha do intervalo de frequência a ser analisado a partir dos dados de impedância, possibilitando uma melhor caracterização do sistema.

Resultados

Para a análise com o *PEX-Sensors*, foram utilizados conjuntos de dados de capacitância elétrica obtidas com 10 unidades sensoriais do primeiro conjunto de arquiteturas, contendo filmes formados pela técnica de *LbL*:

- 3, 5 e 7 bicamadas contendo a enzima lisozima;
- 3, 5 e 7 bicamadas contendo a enzima tripsina;
- 3, 5 e 7 bicamadas contendo a enzima pepsina e
- bare (eletrodo sem modificação superficial).

A correlação dos dados multidimensionais pode ser observada na representação do *IDMAP* abaixo:

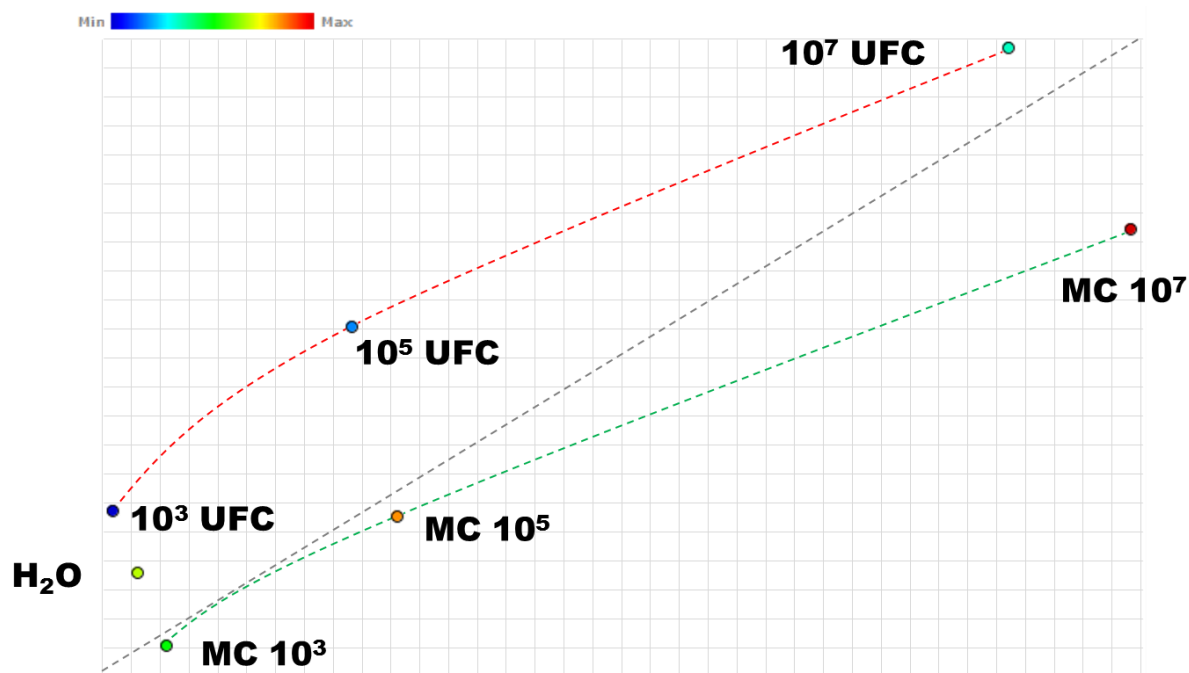


FIGURA AI.1 - Gráfico de *IDMAP* para os dados de capacitância vs. frequência de 10 unidades sensoriais modificadas superficialmente com filmes de *LbL* contendo 3, 5 e 7 bicamadas de lisozima, tripsina e pepsina. Indicadas as concentrações de *E. coli* em 10^3 , 10^5 e 10^7 UFC e os respectivos meios de cultura (MC).

Observa-se claramente a separação entre as soluções contaminadas com *E. coli* dos respectivos Meios de Cultura em todas as concentrações, assim como a proximidade da menor concentração de 10^3 UFC com a água (que está abaixo de limite de contaminação, considerado para concentrações a partir de 10^5 UFC). Observa-se uma grande otimização dos resultados quando comparados aos apresentados na seção 5.2.4, o que pode ser justificado pela análise do espectro de capacitância em todas as faixas de frequência. Este tipo de análise leva em consideração todas as modificações presentes no sistema (superfície, interface e solução), não apenas em uma frequência ou uma faixa de frequência, o que gera resultados mais precisos.

APÊNDICE II

Medidas de estabilização do Sistema: medidas de Espectroscopia de Impedância Elétrica realizadas no intervalo de frequência de 1 MHz a 1 Hz em soluções contendo a bactéria *Salmonella* na concentração CFU = 10^5 e na solução tampão fosfato (PBS). Tempos de medida em 0, 5 e 10 minutos mostrando a estabilidade do sistema.

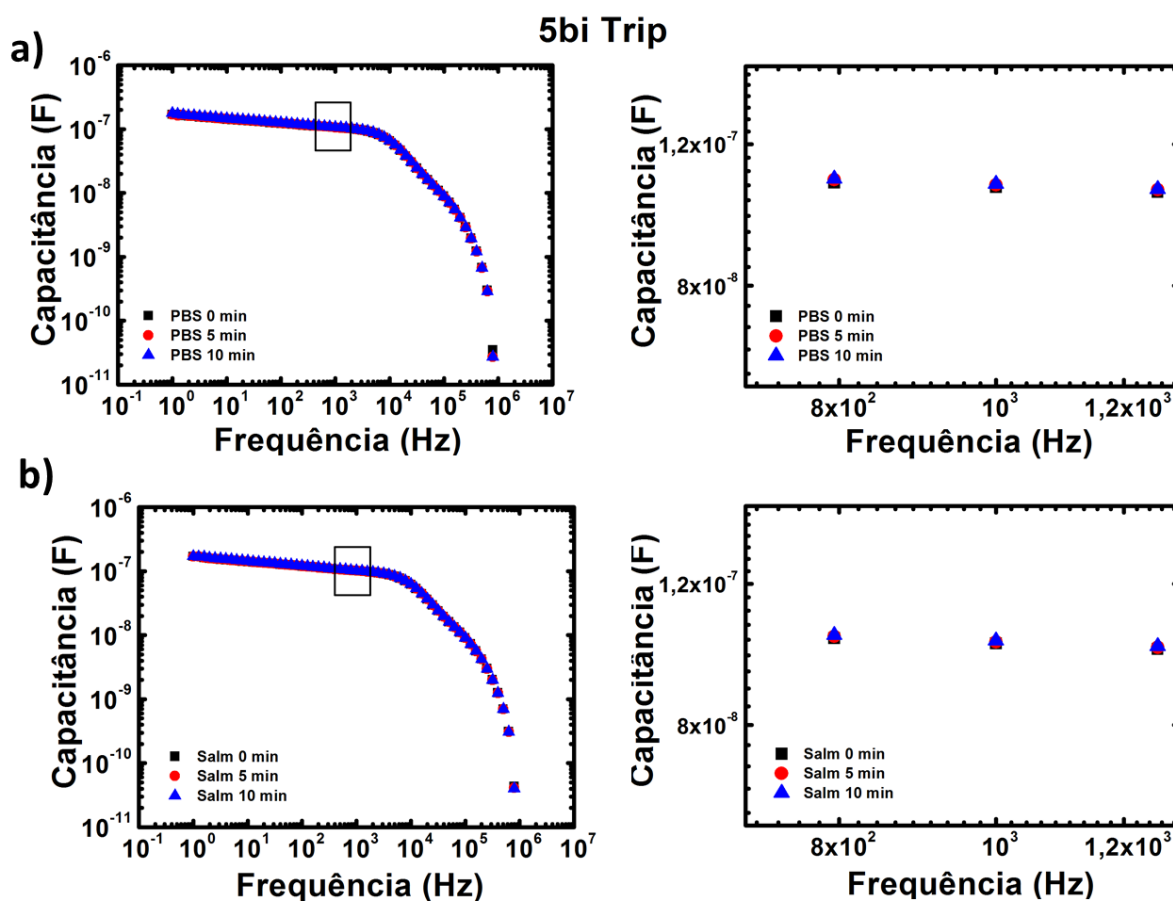


FIGURA AII. 2 - Resultados de capacitância elétrica em função da frequência para eletrodos interdigitados de ouro recobertos com 5 bicamadas de Tripsina em: a) solução tampão fosfato (PBS); b) concentração de 10^5 UFC de *Salmonella*. Tempos de medida = 0, 5 e 10 minutos sem a retirada do eletrodo da solução. Ampliada na segunda coluna região em 1 kHz. T = 25°C.

APÊNDICE III

Estágio no Forschungszentrum Jülich (Alemanha)

Foi realizado o estágio de 10 meses no Centro de Pesquisas – Jülich (Alemanha), no período de 03.2015 a 12.2015 pelo Programa CAPES-PDSE, processo 10585-14-1.

O projeto consistiu no desenvolvimento de tecnologias impressas para biossensores incluindo eletrônica funcional e impressão estereolitográfica 3D com processamento de luz digital (SLA/DLP), com objetivo na obtenção de um filtro de sangue integrado a um sensor impresso.

A primeira etapa consistiu em integrar estruturas microfluídicas obtidas por uma impressora 3D (Miiicraft, Hsinchu, Taiwan) com um substrato de polietileno-naftaleno PQA1-M (Teijin DuPont Films), utilizado na impressão de dispositivos eletroquímicos. Para isso, imprimiu-se sob o substrato uma fina camada da tinta dielétrica PVP-co-PMMA, que possui propriedades adesivas quando exposta a radiação UV. Após a cura, comprovou-se a aderência e a eficiência da metodologia proposta, apresentados no trabalho de HAMAD et al. ¹²³. Um resumo pode ser verificado na FIGURA AIII. ¹²³:

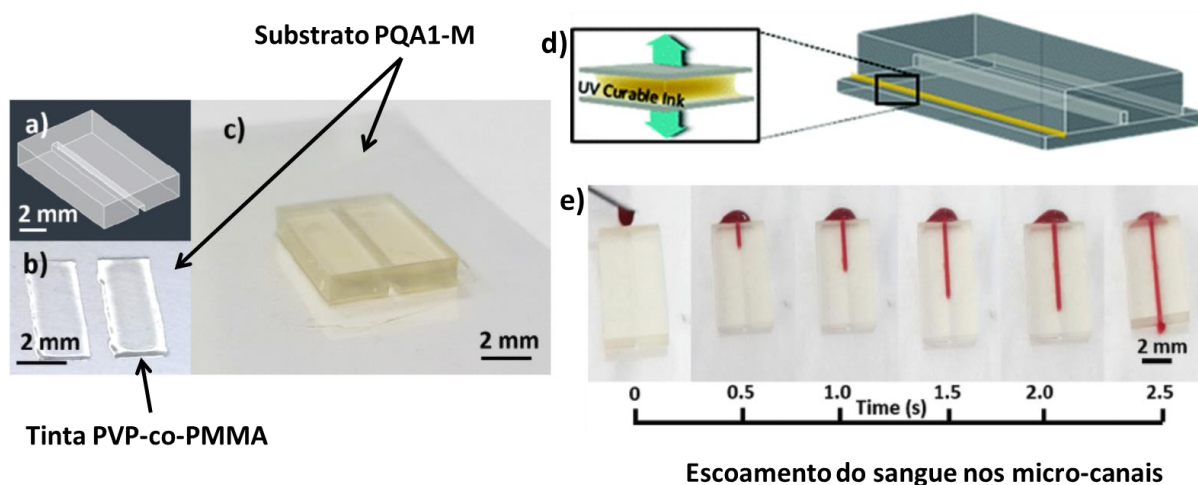


FIGURA AIII. 1 – Integração entre estruturas microfluídicas e o substrato polietileno-naftaleno PQA1-M. a) CAD design utilizado para a impressão 3D; b) tinta PVP-co-PMMA impressa sob o substrato PQA1-M no formato da área que será aderida na estrutura 3D; c) estrutura microfluídica colada sobre o substrato flexível PQA1-M após cura do PVP-co-PMMA; d) ilustração do sistema proposto; e) escoamento capilar de sangue em função do tempo para o sistema proposto. (Fonte: ¹²³).

A segunda etapa consistiu em projetar uma estrutura capaz de separar o plasma dos glóbulos vermelhos e imprimir os protótipos do sistema de filtração utilizando a impressora 3D. Resultados podem ser observados na FIGURA AIII.2.

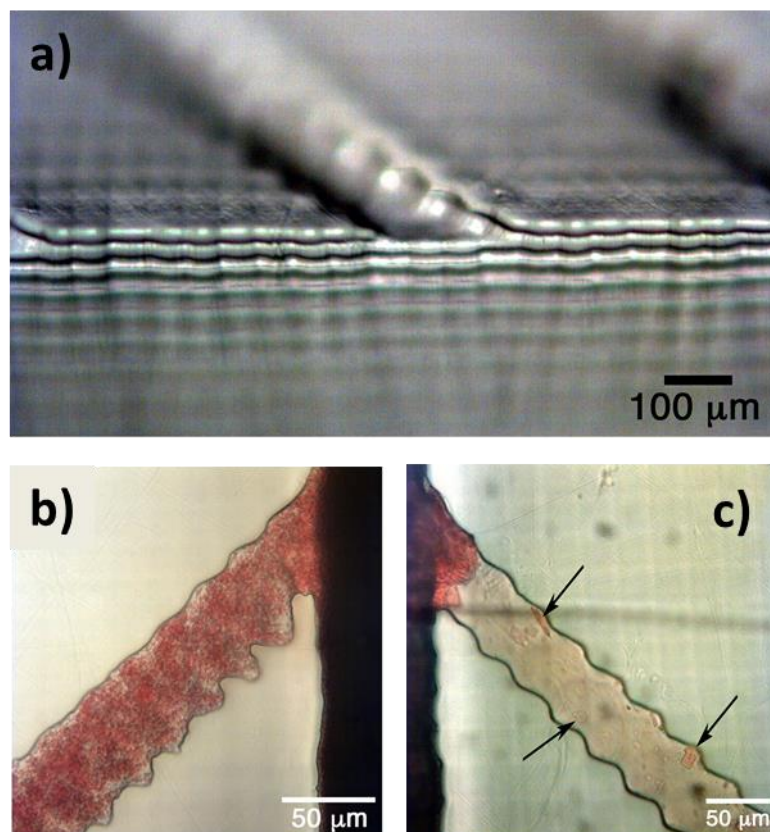


FIGURA AIII. 2 – a) Vista diagonal da estrutura microfluídica impressa; b) micro canal com sangue puro; c) micro canal apresentando processo de filtração utilizando sangue com heparina.

Foi desenvolvido um sistema microfluídico utilizando os limites de impressão 3D do equipamento disponível, com camadas de 50 μm e resolução de 56 × 56 μm. Observou-se que o sangue contendo o anticoagulante heparina forma pequenos cristais que bloqueiam as entradas dos micro-canais, resultando em uma filtração eficiente (acima de 80%). Quando adicionado sangue puro, o mesmo passa direto pelos micro-canais antes mesmo de coagular.

ANEXO

Análise das Componentes Principais (PCA) (retirado da ref. ⁹⁸)

A realização da PCA consiste em fatorar a matriz de dados \mathbf{X} , de modo que $\mathbf{X} = \mathbf{TL}^T + \mathbf{E}$, onde \mathbf{L} é a matriz dos pesos, \mathbf{T} a matriz dos escores e \mathbf{E} a matriz dos resíduos. O símbolo \mathbf{T} (\mathbf{T} sobrescrito) é o operador de transposição de matriz.

A primeira componente principal é $\mathbf{PC1} = \mathbf{t}_1\mathbf{l}_1^T$, que é a melhor aproximação de posto 1 para \mathbf{X} e corresponde à direção de maior variância no espaço multivariado. $\mathbf{E}_1 = \mathbf{X} - \mathbf{t}_1\mathbf{l}_1^T$ é o resíduo de \mathbf{X} , descontado $\mathbf{PC1}$.

A segunda componente principal é $\mathbf{PC2} = \mathbf{t}_2\mathbf{l}_2^T$, que é a melhor aproximação de posto 1 para \mathbf{E}_1 e corresponde à direção de maior variância no espaço multivariado não modelada por $\mathbf{PC1}$, ou seja, ortogonal a ela. $\mathbf{E}_2 = \mathbf{E}_1 - \mathbf{t}_2\mathbf{l}_2^T$ é o resíduo deixado por $\mathbf{PC1}$ e $\mathbf{PC2}$. Comumente utiliza-se um número pequeno de PCs, por responderem por uma parcela significativa da informação total contida na estrutura de dados.

De maneira direta, na análise de componentes principais, calcula-se inicialmente a matriz de covariância, \mathbf{C} , para dados centrados na média, ou a matriz de correlação, \mathbf{R} , para dados autoescalados.

$$\mathbf{C} \text{ (ou } \mathbf{R}) = \mathbf{E}_0^T \mathbf{E}_0 / (\mathbf{n}-1)$$

onde \mathbf{E}_0 é a matriz pré-processada e \mathbf{n} é o número de linhas da matriz. Em seguida são calculados os autovalores e autovetores normalizados de \mathbf{C} ou \mathbf{R} .

$$\mathbf{CL} = \mathbf{\Lambda L}$$

onde $\mathbf{\Lambda}$ é a matriz diagonal dos autovalores. Cada autovetor \mathbf{l} é um vetor de pesos de uma componente principal. Cada autovalor λ fornece a quantidade de variância explicada pela respectiva componente, de modo que PC1 tem o maior autovalor, PC2 o segundo maior, e assim por diante.

Geometricamente, os pesos correspondem aos cossenos dos ângulos que as componentes principais fazem com as variáveis originais. São os pesos das variáveis originais na combinação linear que definem cada Componente Principal. Na interpretação dos gráficos, os elementos de uma mesma classe tendem a agrupar-se, ocupando a mesma região dos escores.