

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

**DESENVOLVIMENTO DE BIOSSENSOR
BASEADO EM MICROCANTILEVER
FUNCIONALIZADO COM BIOMOLÉCULAS PARA A
DETECÇÃO DE ALCOOIS DE CADEIA CURTA**

ALEXANDRE MARGARIDO

ORIENTADORES: PROF. DR. PAULO SÉRGIO DE PAULA HERRMANN JÚNIOR

PROF. DR. FERNANDO M. ARAUJO-MOREIRA

São Carlos - SP
Julho/2016

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

**DESENVOLVIMENTO DE BIOSSENSOR
BASEADO EM MICROCANTILEVER
FUNCIONALIZADO COM BIOMOLÉCULAS PARA A
DETECÇÃO DE ALCOOIS DE CADEIA CURTA**

ALEXANDRE MARGARIDO

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de São Carlos, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Biotecnologia.

Orientadores: Prof. Dr. Paulo Sérgio De Paula
Herrmann Júnior
Prof. Dr. Fernando M. Araujo-
Moreira

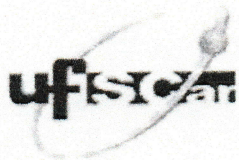
São Carlos - SP
Julho/2016

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

M327d Margarido, Alexandre
Desenvolvimento de biossensor baseado em
microcantilever funcionalizado com biomoléculas para
a detecção de alcoois de cadeia curta / Alexandre
Margarido. -- São Carlos : UFSCar, 2016.
141 p.

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

1. Biossensor. 2. Microscópio de força atômica. 3.
Álcool desidrogenase. 4. Tensão superficial. 5.
Microcantilever. I. Título.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia

Folha de Aprovação

Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Tese de Doutorado do candidato Alexandre Margarido, realizada em 11/07/2016:

Prof. Dr. Paulo Sergio de Paula Herrmann Junior
Embrapa

Prof. Dr. Antonio Carlos Guastaldi
UNESP

Prof. Dr. Rubens Bernardes Filho
UFSCar

Prof. Dr. Marcelo Assumpção Pereira da Silva
IFSC/USP

Prof. Dr. Fábio de Lima Leite
UFSCar

Dedicatória

*A minha amada esposa Livia Regina Manzine Margarido, por me aturar
ensinar, apoiar e acima de tudo, me inspirar a resiliência necessária para concretizar este trabalho.*

AGRADECIMENTOS

Aos meus orientadores Paulo S. P. Herrmann, Fernando M. Araujo-Moreira, pela orientação, apoio e amizade durante a realização deste trabalho.

Ao CNPq (141267/2013-5) pelo auxílio financeiro disponibilizado para realização deste trabalho.

Aos professores e as secretárias do programa de pós-graduação em Biotecnologia, aos pesquisadores e colegas da Embrapa Instrumentação, que de alguma forma contribuíram para realização deste trabalho.

À Embrapa Instrumentação pela disponibilidade dos laboratórios e da infraestrutura utilizados para execução do trabalho experimental.

Ao pesquisador Rubens Bernardes Filho pela ajuda com os equipamentos e interpretação de vários resultados. À pesquisadora Elaine C. Paris pela ajuda no entendimento de diversos experimentos.

Ao Professor Fabio de Lima Leite da UFSCar, Campus Sorocaba, pelo auxílio científico;

Ao Professor Renato Vitalino Gonsalves do Grupo Crescimento de Cristais e Materiais Cerâmicos (IFSC-USP)/Centro de Desenvolvimento de Materiais Cerâmicos (CDFM- Processo FAPESP N. 2013/07296-2) pela realização das medidas de XPS.

Ao Marcelo de Assumpção Pereira da Silva, pelo auxílio na aquisição de imagens de AFM do IFSC da USP de São Carlos.

Aos Carlos A. Costa e Evandro Martin Lanzoni pelos ensaios de AFM no LNNano do CNPEM - Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais.

Aos técnicos da Embrapa Instrumentação Viviane Faria Soares, Silviane Zanni Hubinger, Alice Raabe, Adriana Coatrini Thomazi, Marcelo Simões e Luiz Aparecido de Godoy pela ajuda na realização dos experimentos.

A todos que contribuíram diretamente ou indiretamente com equipamentos, metodologias, análises, críticas, sugestões e discussões para realização deste trabalho.

A todos o meu sincero muito obrigado.

Que os vossos esforços desafiem as impossibilidades, lembrai-vos de que as grandes coisas do homem foram conquistadas do que parecia impossível.

Charles Chaplin

O sucesso torna as pessoas modestas, amigáveis e tolerantes; é o fracasso que as faz ásperas e ruins.

W. Somerset Maugham

RESUMO

Este trabalho apresenta o desenvolvimento de um biossensor, utilizando a haste de microcantilever e a detecção de sua resposta por intermédio do modo dinâmico da microscopia de força atômica (AFM). Foram investigadas as respostas de diferentes métodos para imobilização da enzima Álcool Desidrogenase, a fim de realizar a detecção seletiva de etanol, metanol e isopropanol, empregando como matrizes monocamadas auto-organizadas (SAM – *Self Assembled Monolayer*) e outros arranjos formados sobre a superfície de microcantilevers de Si e Si₃N₄. Além disso, objetivou-se a avaliação da influência do processo de imobilização do elemento biológico no desempenho analítico do biossensor. O processo de desenvolvimento do biossensor iniciou-se com a ativação de sua superfície por meio de deposição de tióis e silanos com diferentes comprimentos de cadeias carbônicas, mas com os mesmos grupos terminais amina (NH₂). A ativação de microcantilevers somente é possível com a oxidação de sua superfície e para verificação desse processo foi empregada a técnica “High-resolution Xray Photoelectron Spectroscopy (XPS)”. A ativação da superfície foi obtida utilizando metodologias diferentes para o recobrimento dos microcantilevers construídos somente com Si (100) e Si₃N₄. Posteriormente ao processo de oxidação, segue-se a ligação da biomolécula à superfície ativada pela utilização do agente bifuncional Glutaraldeído. Foram investigados microcantilevers em que ambos os lados foram revestidos com as biomoléculas e, foi constatado o efeito da tensão superficial a partir de 0,3 mL/L do analito alvo. Ao analisar o desempenho do biossensor para a determinação do analito alvo, verificou-se que nos biossensores a metodologia de ativação por vapor de (3-Aminopropyl)triethoxysilane (APTES) e com montagem em monocamadas auto-organizada foi a mais adequada para a imobilização da biomolécula de reconhecimento, com esta preparação o biossensor foi menos susceptível a umidade relativa e variações de temperatura apresentando elevado fator de qualidade, menor período de tempo de resposta, seletividade, durabilidade e sensibilidade.

Palavras-chave: Biossensor, Biotecnologia, Microscópio de Força Atômica, AFM, Álcool Desidrogenase, Tensão Superficial, Microcantilever, Sensor.

ABSTRACT

This study presents the development of a biosensor using a microcantilever stem and its detecting response through dynamic mode of atomic force microscopy (AFM). Responses of different methods for immobilization of alcohol dehydrogenase enzyme were investigated in order to accomplish a selective detection of ethanol, methanol and isopropanol, using as arrays: self-assembly monolayer (SAM) and others arrangements formed on Si and Si₃N₄ microcantilevers surface. In addition, we aimed to evaluate the influence of the biological element immobilization process in the analytical performance of the biosensor. The process to development of a biosensor began with the activation of its surface by means of thiols and silanes with different carbon length chains, however with the same amine terminal groups (NH₂). The microcantilevers activation is only possible with the oxidation of its surface and to check this process, the "High-resolution Xray Photoelectron Spectroscopy (XPS)" technique was used. Activation of the surface was obtained using different methods for coating of microcantilevers made only with Si (100) and Si₃N₄. Subsequently to the oxidation process, the binding of the biomolecule to the surface activated was performed using the bifunctional agent glutaraldehyde. Microcantilevers with both sides coated by biomolecules were investigated and a tension effect of surface was observed at a 0,3 mL/L of the target analyte. By analyzing the performance of the biosensor for the determination of the target analyte, it was realized that APTES activation methodology for biosensors steam and self-assembled monolayers were the most suitable techniques for immobilizing the recognition biomolecule. With this preparation, the biosensor it showed less susceptible to humidity and the temperature variations, presenting a high quality factor, a faster response time, selectivity, sensitivity and durability.

Keywords: Biossensor, Biotecnologia, Microscópio de Força Atômica, AFM, Álcool Desidrogenase, Tensão Superficial, Microcantilever, Sensor.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 – Principais aplicações da microscopia de força atômica, adaptado de (LANG et al., 2002).28
- Figura 2 - Método de detecção da deflexão ótica. A deflexão do μC é detectada utilizando um feixe de laser, que é refletido pela superfície do microcantilever. Z, F, h, l e w são respectivamente o comprimento da haste, força detectada, espessura, comprimento e largura do μC respectivamente (STEFFENS et al., 2012).30
- Figura 3 – Interações biomoleculares específicas entre a molécula alvo e os receptores (imobilizados na superfície do microcantilever). Em (a) analisado em modo dinâmico, onde a adsorção das moléculas em ambas superfícies provoca uma alteração na frequência de ressonância e em (b) o modo estático, onde a adsorção em apenas uma das superfícies provoca uma flexão no μC (STEFFENS et al., 2012).32
- Figura 4 – (A) Fator Q em função da potência/media a meia altura e (B) comportamento do gráfico em função dos valores de Fator Q, adaptado de (BRUKER, 2009).36
- Figura 5 – Em (A), tensão de tração de superfície (tensão de superfície positiva) contrai a área de uma placa fina induzindo uma curvatura côncava. Em (B), a tensão de compressão de superfície (tensão superficial negativa) expande a superfície superior de uma placa fina induzindo uma curvatura convexa. Adaptado de (GODIN et al., 2004).38
- Figura 6 – Ligação do APTES na superfície de nitreto de silício do microcantilever, adaptado de (OLIVEIRA et al., 2013).41
- Figura 7 – Possíveis ligações do APTES com o Silício, adaptado de Acres (ACRES et al., 2012).42
- Figura 8 – Processo de ativação dos microcantilevers por TIOL, adaptado de (BAIN; EVALL; WHITESIDES, 1989; BENSEBAA et al., 1997; KAWASAKI; SATO; YOSHIMOTO, 2000; UOSAKI, 1999).43
- Figura 9 - Esquema das moléculas de tiol (marrom) adsorvidas no Au (111) (azul), adaptado de (Yamada e Uosaki, 1997).44
- Figura 10 - Enzima Álcool Desidrogenase, em (A) estrutura do aminoácido lisina, (B) em cinza, resíduo de lisina na superfície da enzima e (C) todos os 95 resíduos de lisina disponíveis na superfície da enzima (em amarelo), possibilitando diversas ligações com o reagente bifuncional glutaraldeído.46

Figura 11 – (A) Distâncias em torno de 0,9 a 2,5nm dos terminais NH ₂ dos resíduos de lisina em uma face da biomolécula. Em (B), encontram-se as dimensões de uma subunidade enzimática (em torno de 9,05x6,95nm).	46
Figura 12 – Modelo de encaixe induzido. A ligação do ligante S a enzima E induz uma mudança conformacional, adaptado de (MOTTA, 2011).....	47
Figura 13 – A linha continua significa ligação covalente e a linha tracejada significa apenas ligações fracas, em (A) ligação covalente e formação de monocamadas sobre a superfície do microcantilever, (B) Adsorção, apenas interações fracas entre a molécula e a superfície, (C) Ligação covalente cruzada entre as moléculas e a superfície e em (D) Oclusão, ocorre ligações covalentes somente entre as moléculas e ligações fracas com a superfície do microcantilever.	49
Figura 14 – Ensaio 1 – teste de atividade da enzima Álcool Desidrogenase monitorada em UV a 340nm – Solução com 1mM de β-NAD e 1mg/ml de BSA.	54
Figura 15 - Ensaio 2 – teste de atividade da enzima Álcool Desidrogenase em UV a 340,0 nm – Solução com 0,5 mM de β-NAD e 1,0 mg/ml de BSA.	55
Figura 16 - Ensaio 3, 4 e 5 – teste de atividade da enzima Álcool Desidrogenase em UV a 340 nm – Solução com 0,5 mM de β-NAD e sem BSA.	55
Figura 17 – Efeito do tratamento térmico na superfície do μC de Si ₃ N ₄ revestido com ouro em (A) Novo (sem tratamento), (B) tratamento térmico a 500 °C por 8 h e (C) tratamento térmico a 500 °C por 16 h.....	59
Figura 18 – Efeito da solução piranha na superfície do μC de Si ₃ N ₄ revestido com ouro no espalhamento do laser para (A) 2,5, (B) 5 e (C) 10 minutos de exposição.	59
Figura 19 – Ligação covalente da enzima em monocamada auto-organizada (SAM) ativada com APTES (quadro serrilhado), seguido de glutaraldeído e a enzima.....	61
Figura 20 – Ligação covalente da enzima em monocamada auto-organizada ativada com TIOL (quadro serrilhado), seguido de glutaraldeído e enzima.....	61
Figura 21 – Dessecador adaptado para vaporização do APTES e ativação da superfície dos microcantilever.	62
Figura 22 – Tela μC Tune do software Nanoscope V, utilizada para verificar a frequência de ressonância para um microcantilever.	65
Figura 23 – Resposta de ressonância de μC na faixa de 50 a 1000MHz para os modelos (A) NT-MDT NSG10, (B) NT-MDT NSG03 e (C) NanoWorld 38763f17l497.....	66
Figura 24 – Resposta da frequência de ressonância para diferentes fatores Q. Nota-se que com valores de fator Q mais baixos, o espectro fica ruidoso e a	

ponta do pico deixa de ser aguda e tornando-se arredondada, diminuindo a acuracidade da leitura.	68
Figura 25 – (A) Cella, (B) <i>Scanner</i> do AFM com a Cella em sua posição e em (C) Sistema circulatório de gás fechado para a diluição controlada dos VOCs, composto de 2 abafadores, bomba e Cella.....	73
Figura 26 – Em (A) porta amostra com a amostra no topo do bloco de cobre com capacidade de 15mL e em (B) realização da leitura da amostra.....	74
Figura 27 – Lâmina de vidro contendo 10 μ L de etanol inserida a 5mm do microcantilever (elipse em amarelo). A gota se evapora completamente em 5 minutos, o vapor chega ao biossensor em uma concentração elevada e vai reduzindo até o etanol ser totalmente evaporado e carregado para fora do sistema.....	74
Figura 28 – Ensaio de curva de força para determinar a deflexão do μ C cuja sensibilidade é determinada em [nm/V].	75
Figura 29 – Em amostras 1 e 4 de Si e Si ₃ N ₄ após 30 min e 5 min em solução Piranha, 2 e 5 ativações com tratamento por 20min em solução de APTES a 2% em tolueno e em 3 e 6 ativações com tratamento em vapor de APTES com trietilamina por 1h.....	82
Figura 30 – Em (A) Microcantilever novo, modelo TAP300G de silício (100), (B) TAP300G funcionalizado por vapor de APTES e em (C) TAP300G funcionalizado por imersão em solução de APTES, (D) Microcantilever novo, modelo HA_NC de nitreto de silício Si ₃ N ₄ , (E) HA_NC funcionalizado por vapor de APTES e em (C) HA_NC funcionalizado por imersão em solução de APTES.	83
Figura 31 – Variação da frequência de ressonância para cada passo do processo de funcionalização. A diminuição da frequência de ressonância indica o aumento de massa na superfície da haste do microcantilever.....	84
Figura 32 – Variação da frequência de ressonância e fator Q a cada passo do processo de funcionalização com ativação de Tiol.....	85
Figura 33 – Ensaio em modo estático para determinação da tensão superficial de expansão ou de tração. Em (A) o biossensor encontra-se em repouso e em (B) o biossensor foi exposto ao analito alvo. O deslocamento do ponto vermelho para baixo indica que o μ C curvou-se para baixo, resultando em tensão expansiva.	86
Figura 34 – Microcantilever ativado com solução de APTES a 2 % por imersão, com espessura média em torno de 19,39+-4,7 nm. Em (A), vista superior, em (B), vista em 3D e em (C) um perfil da topografia com a espessura de 10 pixels.	88

- Figura 35 – Microcantilever ativado com vapor de APTES, com espessura média em torno de $14,68 \pm 1,19$ nm. Em (A), vista superior, em (B), vista em 3D e em (C) um perfil da topografia com a espessura de 10 pixels.90
- Figura 36 – Resposta do μ C novo às condições de: ar-ambiente com 50 % de umidade relativa, ar-isento com 15 % de umidade relativa, nitrogênio 5.0 e gás de nitrogênio líquido.93
- Figura 37 – Resposta do μ C funcionalizado em camadas auto-organizadas (SAM) às condições de: ar-ambiente com 50 % de umidade relativa, ar-isento com 15 % de umidade relativa, nitrogênio 5.0 e gás de nitrogênio líquido. ...94
- Figura 38 – Resposta do μ C funcionalizado com ligações covalentes cruzadas às condições de: ar-ambiente com 50 % de umidade relativa, ar-isento com 15 % de umidade relativa, nitrogênio 5.0 e gás de nitrogênio líquido. ...95
- Figura 39 – Resposta do μ C funcionalizado em camadas auto-organizadas às condições de: ar-ambiente com 50% de umidade relativa, ar-isento com 15% de umidade relativa, nitrogênio 5.0 e gás de nitrogênio líquido.96
- Figura 40 – Resposta da frequência de ressonância do μ C NT_MDT HA_NC em três ensaios seguidos utilizando 5,0 μ L de etanol 99,9 % a uma distância de 5,0 mm da haste, depositado em uma lâmina de vidro.98
- Figura 41- Comparativo da resposta do μ C novo (BRANCO) com um funcionalizado por intermédio de SAM exposto ao vapor de 10 μ L de etanol, região (A) influência da tensão superficial, (B) adsorção com diminuição da frequência de ressonância e (C) recuperação do biossensor.99
- Figura 42 - Três biossensores diferentes ambos ativados por imersão em APTES a 2 % por 30 min. 101
- Figura 43 - Três biossensores diferentes ambos ativados por vapor de APTES. A camada mais fina e uniforme torna os biossensores mais eficientes e diminui a diferença entre os comportamentos..... 102
- Figura 44 – Os gráficos exibem o espectro da variação da frequência de ressonância com o aumento da concentração de etanol de 100 a 230,000 ppm em um sistema circulatório fechado para três biossensores funcionalizados em monocamadas (SAM)..... 103
- Figura 45 – Teste de seletividade com diferentes VOCs em concentrações fixas. Em preto, baixa concentração e em vermelho alta concentração dos VOCs, equivalente as extremidades do gráfico da Figura 44. Biossensor de μ C funcionalizado por SAM. 104
- Figura 46 – São comparados a resposta da frequência de ressonância nas condições: Em (A) são comparados: BRANCO – NOVO, resposta de um μ C novo sem funcionalização ao vapor da mistura dos voláteis (etanol, diclorometano, hexano e tolueno); BRANCO – Biossensor, μ C funcionalizado colocado em exposição ao vapor da mistura dos voláteis

(diclorometano, hexano e tolueno); 10,0 µL Etanol (1), µC funcionalizado colocado a exposição de 10,0 µL de etanol e; 61,7 µL Mistura (1) µC funcionalizado colocado na exposição do vapor da mistura dos 4 voláteis. Em (B), resposta do biossensor a 3 ensaios em sequência com a exposição de 10,0 µL de etanol e em (C), resposta do biossensor a 3 ensaios seguidos com a exposição de 61,7 µL da mistura dos quatro voláteis.	106
Figura 47 – Período de tempo de utilização do biossensor com enzima Álcool Desidrogenase. Após 22 dias, o biossensor continuou ativo, porém ocorreu um aumento da opacidade da superfície impedindo o equipamento de realizar a leitura, a variação (KHz) foi a sensibilidade nos 22 ensaios, realizados com vapor de 10,0 µL de etanol.	108
Figura 48 – Variação da frequência de ressonância em µC funcionalizado pela técnica de oclusão com adição de vapor de 10µL de etanol em três repetições em sequência a cada 20 minutos, com apenas ligações fracas entre a camada sensível e a superfície do microcantilever.	109
Figura 49 – Ligação Covalente Cruzado, com três ensaios de 20 minutos em sequência, com a adição de 10µL de vapor de etanol em cada repetição.	110
Figura 50 – Superfície de Si ₃ N ₄ funcionalizada ativada com APTES. Em (A-B) nota-se a esquerda a superfície lisa e mais escura (risco) e marcado com círculos em azul a mesma região em ambas as imagens de 30x30 µm.	112
Figura 51 – Imagem da topografia da superfície funcionalizada em 3D sem a presença de vapor de etanol.....	113
Figura 52 - – Imagem da topografia da superfície funcionalizada em 3D com a presença de vapor de etanol.....	114
Figura 53 – Análise da topografia em recorte de 70 pontos na mesma região, com e sem a presença do vapor de etanol.	115
Figura 54 - Em (A) Enzima álcool Desidrogenase ligada em monocamada na superfície de silício na ausência de vapor de etanol e em (B) com vapor de etanol ligado ao sítio ativo, imagens de 200x200 nm.....	117
Figura 55 - Leitura sem etanol (50x50 nm): média dos diâmetros das enzimas de 5,98 nm, desvio padrão de ±0,539 e erro experimental de 9,01 %.	118
Figura 56 - Leitura com etanol (50x50 nm): média dos diâmetros das enzimas de 8,64 nm, desvio médio padrão de ±0,71 e erro experimental de 8,29 %.	118
Figura 57 – (A) Descolamento do banho de ouro da superfície dos microcantilevers novos quando retirados da caixa de armazenamento (posições de 6 a 20), (B) tratamento térmico dos microcantilevers.	121

Figura 58 – (A) Microcantilever novo, (B) funcionalizado e recuperado por tratamento térmico 500 °C 8h e limpo com solução Piranha (C) funcionalizado e recuperado por tratamento térmico 500 °C 16 h limpo com piranha. ...	122
Figura 59 – Em (A) Superfície funcionalizada, (B) Superfície funcionalizada e depois tratamento térmico por 500 °C por 8 h e limpa somente com etanol, (C) Tratamento térmico por 900 °C por 8 h.	123
Figura 60 – Valores de Curtose para diferentes curvas, em (A) Curtose = 1.8, (B) Curtose = 3 e em (C) Curtose = 4.2	138
Figura 61 – Pipetadoras, reagentes e estufas de uso comum, potenciais itens para contaminação.....	140
Figura 62 – Reagentes de lotes diferentes podem apresentar comportamentos diferentes em algumas situações.....	141

LISTA DE TABELAS

Tabela 1– Características físicas dos microcantilevers utilizados.	56
Tabela 2 – VOCs organizados por ordem de Polaridade Relativa	71
Tabela 3 – Concentração de diferentes VOCs para um reservatório de 2L de ar.	72
Tabela 4 – Porcentagem dos componentes em cada amostra	81
Tabela 5 – Deflexão no modo estático do μ C funcionalizado somente na superfície refletora, para diferentes voláteis na concentração 240kppm.	86
Tabela 6 – Microcantilever NSG10 – novo sem recobrimento	93
Tabela 7 - Microcantilever NSG10 – funcionalizado por intermédio de monocamadas (SAM)	94
Tabela 8 - Microcantilever NSG10- ligação covalente cruzada.....	95
Tabela 9 - Microcantilever NSG10- com recobrimento de ouro e funcionalizado em monocamadas (SAM), ativado com Tiol.....	96
Tabela 10 – Informações estatísticas da superfície funcionalizada com e sem vapor de etanol.....	114
Tabela 11 – Análise estatística da superfície sem a presença do vapor de etanol, o substrato equivale a região demarcada em azul e a camada funcional a região demarcada em verde no gráfico.....	115
Tabela 12 – Análise estatística da superfície com a presença do vapor de etanol, o substrato equivale a região demarcada em azul e a camada funcional a região demarcada em verde no gráfico.....	116
Tabela 13 – Ponto de Fusão e Ebulição dos principais componentes de um biossensor (WHITESELL, 1998).....	120
Tabela 14 – Características e parâmetros do biossensor desenvolvido na obtenção dos melhores resultados (SAM), considerando distúrbios provocados pelo ambiente.....	128

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

μC – *Microcantilever [-]*

GLD – *Glutaraldeído [-]*

APTES - *(3-Aminopropyl)triethoxysilane [-]*

AFM – *Atomic Force Microscopy [-]*

XPS - *High-resolution Xray Photoelectron Spectroscopy [-]*

UR (%) – *Umidade Relativa [%]*

VOC – *Compostos Orgânicos Voláteis [-]*

ppm – *Partes Por Milhão [-]*

SAM – *Self Assembly Monolayer [-]*

DNA – *Deoxyribonucleic acid [-]*

$\Delta\sigma$ - *Tensão de flexão diferencial induzida pelo analito [N/m]*

SiO_2 – *Dióxido de silício [-]*

E- *Módulo de Young [N/m²]*

F- *Força [N]*

Fres- *Frequência de ressonância [kHz]*

h- *Horas [h]*

k- *Constante de mola [N/m]*

l – *Largura [μm]*

m- *Massa [kg]*

min- *Minutos [min]*

ppm- *Partes por milhão [-]*

ppb- *Partes por bilhão [-]*

ppt- *Partes por trilhão [-]*

s- *Segundos [s]*

t- *Espessura [μm]*

v - *Taxa de Poisson [-]*

Z- *Deflexão [nm]*

w- *Largura [μm]* **ρ** - *Densidade [kg/m³]*

V- *Volume [L]*

MW- *Massa molecular [kg/mol]*

R- Constante dos gases [Latm/Kmol]

COVs- Compostos orgânicos voláteis [-]

UR- Umidade relativa [%]

T- Temperatura [°C]

Q- Fator de qualidade [-]

a- Amplitude de vibração térmica [Å]

Kb- Constante de Boltzmann [J/K]

MFA- Microscopia de força atômica [-]

FE-MEV- Microscopia eletrônica de varredura e por [-]

UV-Vis- UV-Visível [-]

MEMs- Sistemas microeletromecânicos [-]

ppmv- Partes por milhão em volume [-]

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 - INTRODUÇÃO.....	22
1.1 Contexto.....	22
1.2 Objetivo Geral.....	24
1.3 Objetivos Específicos.....	25
1.3.1 Biomolécula de reconhecimento.....	25
1.3.2 Biossensor de Microcantilever.....	25
CAPÍTULO 2 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	27
2.1 Microscopia de Força Atômica (AFM).....	27
2.1.1 Microcantilever utilizado como Biossensor na Microscopia de Força Atômica.....	29
2.1.2 Modos de detecção no microscópio de força atômica (AFM).....	34
2.1.3 Fator Qualidade (Q).....	35
2.1.4 Biossensores por detecção de tensão superficial.....	37
2.2 Imobilização de biomoléculas na superfície de um microcantilever.....	39
2.2.1 Limpeza e oxidação dos microcantilevers.....	40
2.2.2 Ativação da superfície do microcantilever.....	40
2.2.2.1 Ativação por APTES.....	40
2.2.2.2 Ativação por TIOL.....	42
2.2.3 Ligação da Biomolécula a superfície.....	44
2.3 Diferentes configurações para imobilização da biomolécula.....	47
2.3.1 Ligação Covalente em Monocamadas (SAM).....	47
2.3.2 Adsorção.....	48
2.3.3 Ligação Covalente Cruzada.....	48
2.3.4 Oclusão – Gel/Polímero de aprisionamento.....	48
2.4 Vantagens da formação de monocamadas auto-organizadas (Self-Assembly Monolayer (SAM)) para biossensores.....	49
2.4.1 Limitações de SAM para biossensores.....	50
CAPÍTULO 3 - MATERIAIS E MÉTODOS.....	51
3.1 Considerações Iniciais.....	51
3.2 Instrumentação e reagentes utilizados.....	51

3.2.1 Reagentes Utilizados.....	51
3.2.2 Características da enzima Álcool Desidrogenase	52
3.2.2.1 Estrutura da enzima Álcool Desidrogenase.....	52
3.2.2.2 Ensaio de atividade da enzima Álcool Desidrogenase	53
3.2.3 Microcantilevers	56
3.2.4 Instrumentação utilizada.....	56
3.3 Metodologia para funcionalização do microcantilever	57
3.3.1 Ativação por intermédio de Vapor de APTES.....	61
3.3.2 Ativação por Imersão em APTES.....	62
3.3.3 Ativação por imersão em TIOL.....	62
3.3.4 Técnicas de funcionalização testadas.....	63
3.4 Análise de detecção de frequência	64
3.5 Técnica de Espectroscopia de fotoelétrons excitados por raios-x (XPS)	70
3.6 Teste de Seletividade do biossensor.....	71
3.6.1 Método para obtenção da imagem topográfica com e sem a interação com vapor de etanol.....	73
3.6.2 Método rápido para checar a atividade e sensibilidade do biossensor	74
3.6.3 Método para analisar a deflexão de um microcantilever em modo estático	75
CAPÍTULO 4 - RESULTADOS E DISCUSSÕES	77
4.1 Caracterização da Ativação.....	77
4.2 Funcionalização dos microcantilevers	83
4.2.1 Tensão superficial – Medidas de Deflexão (modo estático)	85
4.2.2 Caracterização da superfície funcionalizada com a enzima Álcool Desidrogenase	87
4.3 Comparação da susceptibilidade a temperatura e umidade para diferentes formas de funcionalização.....	91
4.3.1 Comparação dos diferentes métodos de funcionalização	92
4.3.1.1 Microcantilever NSG10 – Novo, sem qualquer recobrimento.....	92
4.3.1.2 Microcantilever NSG10 – Funcionalizado em monocamadas auto-organizadas (SAM) pela ativação em vapor de APTES.	94
4.3.1.3 Microcantilever NSG10 – ativado por vapor de APTES e funcionalizado por Ligação Covalente Cruzada	95

4.3.1.4 Microcantilever NSG10 – revestido com 20nm de ouro e funcionalizado por SAM com Tiol.....	96
4.4 Resposta dos biossensores a analito alvos.....	97
4.4.1 Ligação em camadas auto-organizadas (SAM).....	97
4.4.2 Oclusão	108
4.4.3 Ligação covalente cruzada.....	110
4.5 Caracterização da superfície do biossensor.....	111
4.6 Recuperando Microcantilevers	119
CAPÍTULO 5 - CONCLUSÕES E SUGESTÕES	124
5.1 Enzima Álcool Desidrogenase.....	124
5.2 Resultados experimentais	125
5.3 Contribuições e Limitações	128
5.4 Lições aprendidas	129
5.5 Trabalhos Futuros	129
REFERÊNCIAS.....	131
ANEXO A*	137

Capítulo 1

INTRODUÇÃO

Serão abordados os principais tópicos para entendimento do funcionamento de um Microscópio de Força Atômica (AFM) assim como a teoria para a construção de um biossensor e as características desejáveis.

1.1 Contexto

O etanol é um composto importante na medicina, biotecnologia e principalmente na indústria de alimentos onde alguns procedimentos podem envolver a fermentação e a destilação, a concentração de etanol volatilizado pode atingir níveis tóxicos, causando inflamação da membrana mucosa nasal e conjuntiva, irritação de pele, até mesmo envenenamento em níveis elevados, e é altamente inflamável. Dadas estas circunstâncias, o monitoramento da concentração do etanol volatilizado no ar é de extrema importância (CAI et al., 1997; PONCE et al., 2015).

A detecção de compostos químicos voláteis por intermédio de sensores é uma das áreas da ciência e da tecnologia que vem sendo mais intensamente investigadas, devido à importância, variedade e potencialidade de aplicações em diversas áreas. Para a detecção de compostos voláteis orgânicos (VOC) difundidos em meio gasoso em pequenas porções, na ordem de ppm, é necessária a utilização de um sensor altamente sensível. Neste sentido, o desenvolvimento de biossensores, baseados em microcantilevers (μC), tem se mostrado uma solução eficiente para estas aplicações (MANAI et al., 2014; STEFFENS et al., 2012).

Um biossensor é um sensor que, quando exposto a um tipo particular de substância (a substância a analisar – analito alvo), transforma uma informação química, por exemplo, como a polaridade ou a diferença de concentração, em um sinal analiticamente mensurável, tal como resistência elétrica, condutividade, diferença de potencial, frequência de ressonância, entre outros. Esta transformação é chamada de transdução de sinal e é de importância central para o funcionamento de qualquer sensor e/ou biossensor (OLIVEIRA et al., 2013; STEFFENS et al., 2012; STEFFENS et al., 2014).

Entre os dispositivos disponíveis no mercado, os quais são capazes de detectar com seletividade e precisão quantidades muito pequenas (poucas moléculas, ppm) do analito dispersas em meio gasoso, observa-se que os biossensores piezoelétricos, antenogramas e os obtidos por técnicas de AFM com μC funcionalizado com polianilina (PANI) (STEFFENS et al., 2014) são os mais utilizados para realizar esta mensuração e detecção (FAEGH; JALILI; SRIDHAR, 2015; IMAMURA; SHIBA; YOSHIKAWA, 2016; MENDOZA-MADRIGAL et al., 2013).

A antenografia é uma metodologia que utiliza as antenas de um inseto como um biossensor na identificação de moléculas eletroativas para o inseto. A antena ou até mesmo a própria cabeça do inseto é fixada entre dois eletrodos por intermédio de um gel condutor. Ao receber um estímulo químico ao qual tenha sensibilidade, é registrada uma variação no potencial elétrico entre as extremidades da antena, gerado pelo movimento de íons por intermédio do sistema condutor formado pela membrana neuronal. Esta técnica tem alta resolução e sensibilidade para análise de misturas complexas obtidas diretamente de insetos ou de plantas. Alguns cuidados são necessários para a realização de tais medidas, como por exemplo, é necessário um fluxo de ar umedecido continuamente para evitar a desidratação da antena, o curto período de tempo de vida para os ensaios é um fator limitante (em torno de 20 minutos), bem como a dificuldade para remover e fixar a antena no equipamento (MORAES et al., 2008; SCHOTT et al., 2013).

Sensores baseados em sistemas piezoelétricos são dispositivos que têm sido amplamente investigados como plataformas de biossensores, devido ao fato de apresentarem uma alta sensibilidade. Este dispositivo comporta-se como um ressonador mecânico e a sua variação da frequência de ressonância (Hz) é utilizada como sinal de detecção. O princípio de funcionamento desses dispositivos baseia-se na alteração da frequência de ressonância em uma membrana piezoelétrica causada

pela carga de massa introduzida com a reação entre as espécies alvo e o elemento de detecção imobilizado sobre a superfície da plataforma do sensor, tendo como principal vantagem a utilização em meio líquido não transparente, com resolução menor que um μC convencional funcionalizado, e desempenho similar (BAUSELLS, 2015; LU et al., 2012).

Biossensores de ressonância consistem em uma haste de silício micro fabricada. A tecnologia empregada nos biossensores de μC é uma técnica de detecção com sensibilidade extremamente alta (podendo chegar a ppt) e com amplas aplicações na física, química e biologia. Devido as suas dimensões reduzidas e características físicas, estes biossensores têm sensibilidade sem precedentes para a detecção de analitos biológicos (BUCHAPUDI et al., 2011; FAEGH et al., 2015). Margarido e colaboradores (MARGARIDO et al., 2014) apresentaram o desenvolvimento de um biossensor com μC utilizando a enzima Álcool Desidrogenase, para detecção de etanol, utilizando para isso um microscópio de força atômica. Os biossensores de μC têm várias vantagens sobre outras tecnologias de sensores, incluindo o rápido período de tempo de resposta na ordem de milissegundos, a possibilidade de matrizes de sensores com pequenas dimensões gerais, capacidade de explorar microambientes, e a portabilidade, a qual pode ser projetada para aplicações em campo. A adsorção de moléculas na superfície do μC ou mudanças extremas no ambiente, como por exemplo, densidade e viscosidade, são fatores que alteram sua frequência de ressonância (BUCHAPUDI et al., 2011).

1.2 Objetivo Geral

Este trabalho tem como objetivo principal o desenvolvimento de um biossensor de μC funcionalizado com enzima Álcool Desidrogenase sendo sua funcionalidade para a detecção de álcoois de cadeia curta (Metanol, Etanol e Propanol) em condições ambiente com alto grau de precisão (erro de leitura $< 0,01\%$) monitorada por intermédio da variação da frequência de ressonância por meio de um AFM.

1.3 Objetivos Específicos

Para a obtenção de um biossensor capaz de operar em condições ambiente, vários requisitos foram analisados, como se segue:

- Desenvolver um biossensor de μC funcionalizado com a enzima Álcool Desidrogenase para detecção de vapor de álcoois de cadeia curta em condições ambiente;
- Avaliar o biossensor, utilizando técnicas de análise de superfície;
- Detectar compostos específicos com alto grau de precisão;
- Monitorar por intermédio da variação da frequência de ressonância por meio de um AFM.

1.3.1 Biomolécula de reconhecimento

Dentre as várias opções comerciais foi escolhida a enzima Álcool Desidrogenase (Sigma Aldrich A7011). Para sua aplicação como biomolécula de reconhecimento foi necessário confirmar experimentalmente algumas condições:

- Verificar a atividade da enzima por intermédio de espectroscopia UV-Visível;
- Identificar quais os reagentes necessários para que a enzima seja ativa;
- Averiguar a capacidade da enzima de reconhecer o analito alvo em ambiente não aquoso;
- Estabelecer o mecanismo de ligação da enzima ao biossensor, sem que comprometa a atividade;
- Identificar as condições ideais para a atividade da enzima, como pH, temperatura, umidade e concentração do analito alvo.

1.3.2 Biossensor de Microcantilever

Existem disponíveis no mercado uma infinidade de marcas e modelos de microcantilevers utilizados para diferentes aplicações e condições. Para identificar a melhor opção de μC , alguns requisitos foram analisados:

-
- Avaliar a resposta da frequência de ressonância dos biossensores de μC variando-se as condições de umidade relativa UR(%), temperatura e compostos orgânicos voláteis (VOC);
 - Verificar a forma de oxidação necessária e suficiente para realizar a ativação (modificação química) da superfície do μC para acoplar a biomolécula;
 - Avaliar a sensibilidade em diferentes condições de funcionalização;
 - Determinar o limite detectável de diferentes compostos orgânicos voláteis (VOCs), em condições ambiente – temperatura de 25°C e umidade relativa de 50%.
 - Avaliar a sensibilidade, repetitividade, reversibilidade, período de tempo de resposta, durabilidade e o limite de detecção dos biossensores.

Capítulo 2

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Este capítulo apresentará a revisão bibliográfica, que cobrirá os conceitos básicos para o entendimento do trabalho executado, e o desenvolvimento de um biossensor, ressaltando aspectos relacionados à ativação de microcantilevers e possíveis configurações para imobilização de biomoléculas na superfície ativada.

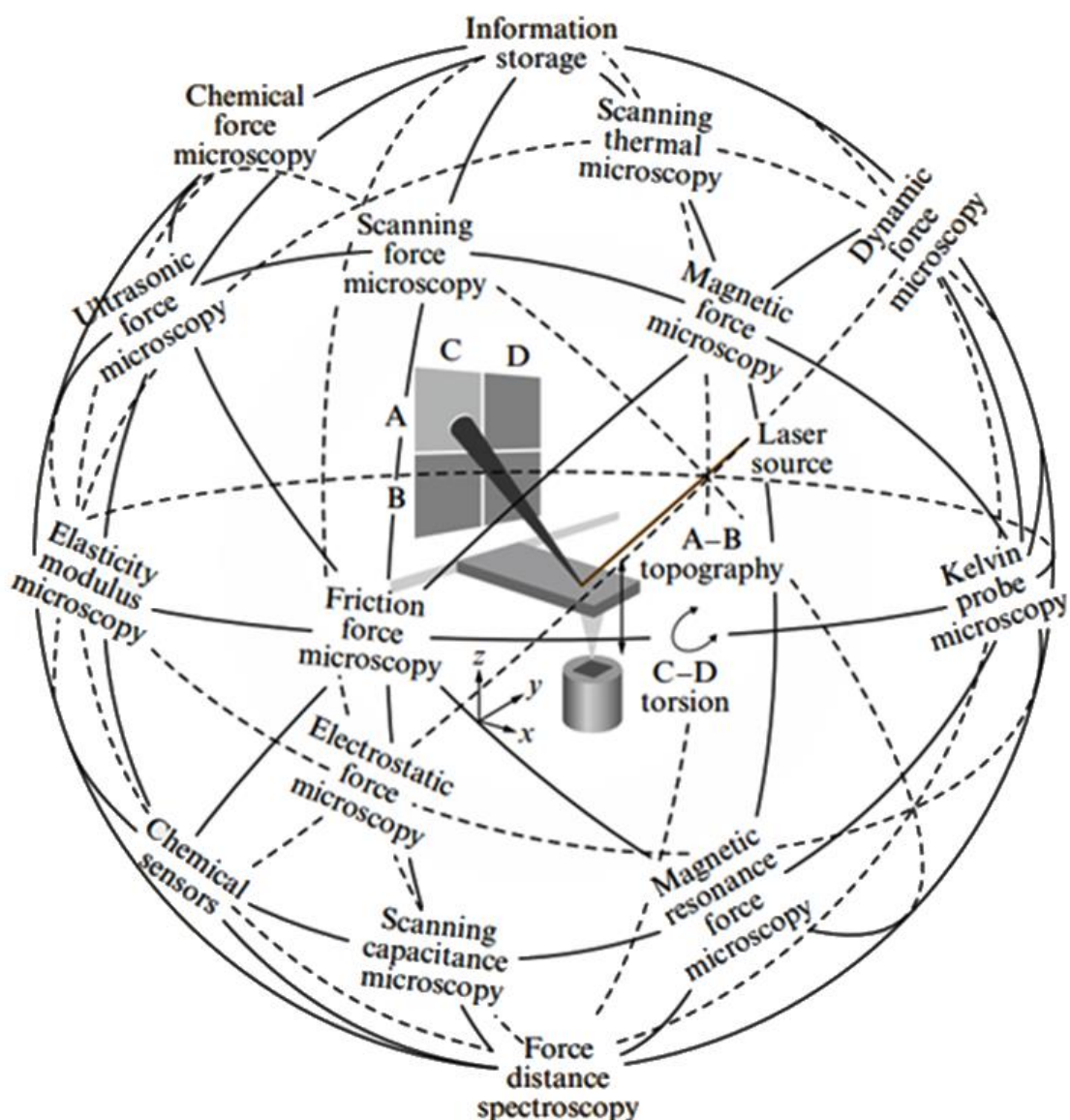
2.1 Microscopia de Força Atômica (AFM)

A microscopia de força atômica (AFM do inglês, *Atomic Force Microscopy*) é uma metodologia derivada da família do SPM, (do inglês, *Scanning Probe Microscopy*) que consiste na varredura de uma sonda sobre uma superfície. Tal técnica vem proporcionando grandes conquistas em nanociência e nanotecnologia, destacando-se por ser uma técnica que permite mapear a topografia de uma amostra condutora, semicondutora e isolante, bem como moléculas biológicas em solução, desde a escala micrométrica até a atômica (SINGAMANENI et al., 2008).

Muitas técnicas foram derivadas da AFM, aproveitando-se de interações locais entre uma ponta de um μC a superfície do material a ser analisado (Figura 1). No entanto, microcantilevers funcionalizados ou não também podem ser utilizados para aplicações de detecção, chamados micro-sensores; esses apresentam extrema sensibilidade para a detecção de vapores químicos ou adsorção de moléculas. Após a adsorção à superfície do μC , as moléculas ligadas podem causar deformação no microcantilever, assim, tais processos físicos, bioquímicos ou químicos são diretamente traduzidos em um movimento nano-mecânico (LANG et al., 2002).

O princípio básico do AFM consiste no emprego de uma haste (microcantilever) com uma agulha (tip) de um lado e uma parte refletiva na outra face. Normalmente a haste do μC recebe uma fina camada de ouro, alumínio e outros materiais para aumentar a reflexão do laser para um fotodetector de quatro quadrantes (Figura 2). O feixe refletido atinge uma posição sensível do fotodetector, onde a distância percorrida é proporcional à deflexão da haste. Dessa forma, pode-se também estipular a deflexão com grande precisão por intermédio de interferometria da reflexão da haste (RAITERI; GRATTAROLA; BERGER, 2002).

Figura 1 – Principais aplicações da microscopia de força atômica, adaptado de (LANG et al., 2002).



Ao tocar a superfície da amostra, ocorre a deflexão do μC monitorada pelo sistema de detecção com sensibilidade suficiente para medir as forças de interação entre os átomos da ponta do μC (tip) com a superfície a ser mapeada. Um sistema de realimentação ajusta a distância entre a ponta do μC (tip) e a superfície da amostra de forma que a força aplicada seja sempre constante. Todo o processo é monitorado por um computador que armazena as informações de força, e conhecidas às características físicas do microcantilever, é possível a conversão do sinal obtido em uma imagem (HERRMANN et al., 2006).

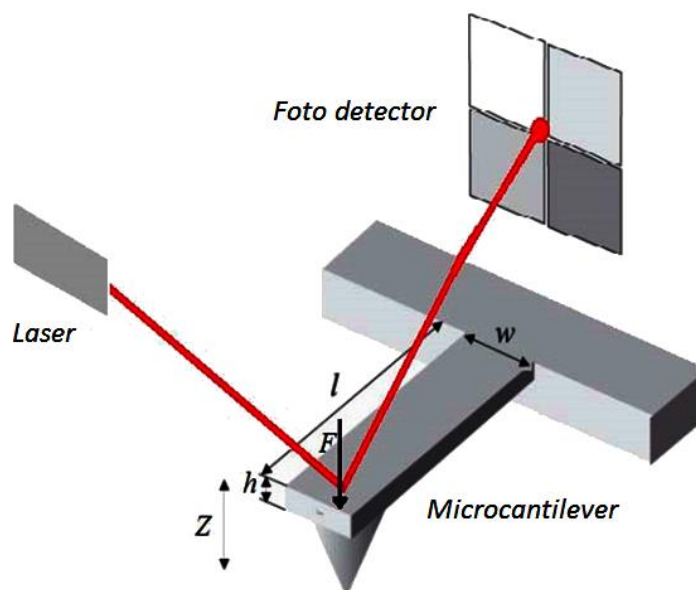
2.1.1 Microcantilever utilizado como Biossensor na Microscopia de Força Atômica

Uma nova metodologia de construção de biossensores consiste na resposta mecânica de uma micro haste de silício, chamado microcantilever, que pode ser classificada como uma técnica derivada das aplicações em AFM.

A capacidade dos microcantilevers usados em AFM, em mudar a frequência vibracional ou sofrer deflexão devido à adsorção de moléculas sobre sua superfície, os torna excelentes transdutores que podem atuar como sensores químicos, físicos ou biológicos (LI, X.; LEE, 2012; OLIVEIRA et al., 2013; STEFFENS et al., 2012; STEFFENS et al., 2014).

Vários métodos para a detecção da deflexão do μC com resolução de angstroms são conhecidos, dentre eles os métodos óticos e elétricos, que podem ser considerados úteis na detecção do movimento de biossensores de microcantilever. O método ótico é o mais utilizado, pois a luz visível que parte de um diodo laser de baixa potência e é focada na ponta do μC que atua como um espelho (Figura 2). O feixe refletido atinge uma posição sensível de um fotodetector, onde a distância percorrida do feixe sobre o detector é proporcional à deflexão da haste. Dessa forma, pode-se também estipular a deflexão com grande precisão por intermédio de interferometria da reflexão da haste (RAITERI et al., 2002).

Figura 2 - Método de detecção da deflexão ótica. A deflexão do μC é detectada utilizando um feixe de laser, que é refletido pela superfície do microcantilever. Z , F , h , l e w são respectivamente o comprimento da haste, força detectada, espessura, comprimento e largura do μC respectivamente (STEFFENS et al., 2012).



A constante de mola “ k ” do μC , traduz a rigidez da haste, ou seja, representa uma medida de sua dureza, e é estritamente dependente à sua geometria e material, para microcantilevers retangulares pode ser calculado de acordo com a Equação 1:

Equação 1

$$k = \frac{E \cdot w \cdot h^3}{4l^3} \quad [1]$$

onde k é a constante de mola do μC (N/m), E é o módulo de Young ($E_{\text{Si}} = 1.3 \cdot 10^{11} \text{ N} \cdot \text{m}^{-2}$ e $E_{\text{Si}_3\text{N}_4} = 3 \cdot 10^{11} \text{ N} \cdot \text{m}^{-2}$), l é o comprimento, h a espessura (m) e w a largura (m) (IMAMURA et al., 2016; SINGAMANENI et al., 2008).

Devido à elevada especificidade de determinadas biomoléculas (anticorpos, enzimas, DNA, etc.) há um grande interesse no desenvolvimento de biossensores por meio da transdução com microcantilever. Estes biossensores apresentam em relação aos demais métodos de transdução, alta sensibilidade, procedimento de detecção simples, necessidade de utilização de baixas concentrações de analito e resposta rápida (HANSEN; THUNDAT, 2005).

Devido a estes fatos, os biossensores micromecânicos tem a função de detectar e verificar de forma qualitativa e/ou quantitativa a interação que ocorre de

uma dada molécula ou composto químico em tempo real e de forma contínua num meio de interesse.

Neste trabalho, foram utilizados dois modelos mais básicos de microcantilevers distintos para detecção e aplicação, o de modo estático e o de modo dinâmico. O modo estático permite a análise do μC em diferentes condições ambientais por medir mudanças de tensão de superfície por intermédio da deflexão. Alterações na tensão superficial são resultantes da adsorção ou das interações eletrostáticas entre moléculas sobre a superfície do microcantilever, bem como alterações na hidrofobicidade de superfície e mudanças conformacionais nas moléculas adsorvidas. Já no modo dinâmico, monitoram-se variações na frequência de ressonância dos microcantilevers, que podem indicar alterações na constante de mola k ou adsorção de massa. O modo de operação dinâmico é o mais apropriado para utilização em biossensor de μC para a detecção do analito em meio gasoso, pois permite a detecção de pequenas alterações de massa resultante de adsorção ou dessorção de moléculas (SANG et al., 2014; VASHIST, 2007).

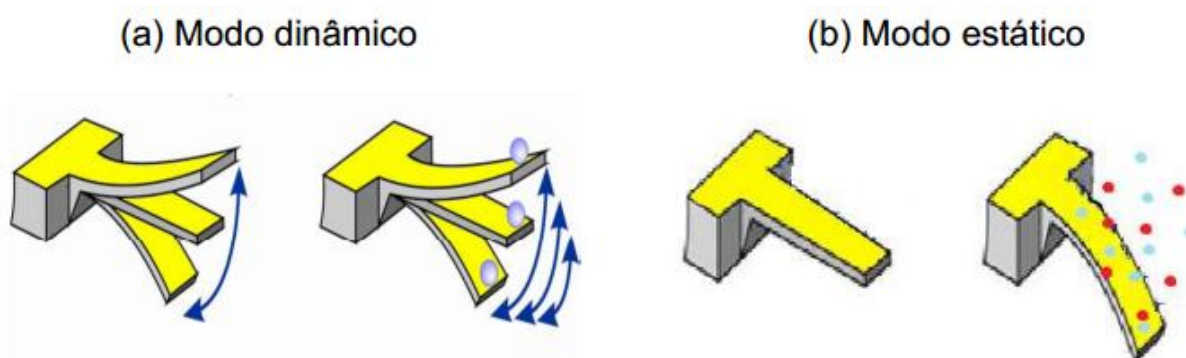
Embora o campo de biossensores micromecânicos esteja crescendo rapidamente, um dos desafios chave é a integração entre os componentes biológicos e não biológicos (funcionalização). Esta etapa, ou seja, a etapa de funcionalização é considerada crítica, uma vez que os componentes biológicos podem perder a funcionalidade natural quando imobilizados sobre a superfície do microcantilever. A hibridização de DNA (HANSEN; THUNDAT, 2005) e o reconhecimento específico antígeno-anticorpo (GROGAN et al., 2002) são alguns exemplos de aplicação dos biossensores baseados em microcantilevers.

A funcionalização pode ser realizada por intermédio da imersão do μC nos reagentes para modificação química, cobrindo-se ambas as faces proporcionando aumento na área de contato e, conseqüentemente, uma melhora na sensibilidade. Microcantilevers podem ser funcionalizados com diversos materiais sensíveis tais como, metais, polímeros, enzimas, entre outros. O revestimento sensível pode interagir com analitos específicos que adsorvam ou se ligam por afinidade química. Com isso o μC se torna um biossensor seletivo e sensível, que responde à substâncias específicas ou a grupos de substâncias. A interação entre o analito e a camada sensível pode ser reversível ou irreversível. No caso reversível, o analito interage com a camada sensível, produzindo uma resposta e, quando as moléculas são removidas, o biossensor retorna ao seu estado original. No caso irreversível, o analito sofre uma

reação química na camada sensível e é consumido no processo de detecção, embora o número de moléculas de reação seja muitas vezes uma pequena proporção do número total presente na amostra. Avanços na biotecnologia tornaram possível o desenvolvimento de biomoléculas para a funcionalização de superfícies, permitindo a detecção seletiva de compostos químicos, com repetitividade e reprodutibilidade (THUNDAT et al., 2003).

Melhorias recentes no design e no desenvolvimento dos biossensores de microcantilevers os tornaram capazes de detectar deflexões mecânicas muito pequenas ao se ligar ou adsorver alguma substância. Por exemplo, uma constante de mola de um μC da ordem de 10^{-3} a 40 N/m , permite a detecção de forças de magnitude muito pequenas (10^{-12} a 10^{-9} N) (THUNDAT et al., 2003). É interessante apontar, apenas como base para comparação, que a força necessária para quebrar uma ligação de hidrogênio é da ordem de 10^{-12} N (SCHALLER; BOSSET; ESCHER, 1998). A Figura 3, mostra as mudanças que ocorrem no sensor de μC quando a sua superfície funcionalizada (camada sensível) é exposta a um analito alvo (MANAI et al., 2014; WANG, C. et al., 2007).

Figura 3 – Interações biomoleculares específicas entre a molécula alvo e os receptores (imobilizados na superfície do microcantilever). Em (a) analisado em modo dinâmico, onde a adsorção das moléculas em ambas superfícies provoca uma alteração na frequência de ressonância e em (b) o modo estático, onde a adsorção em apenas uma das superfícies provoca uma flexão no μC (STEFFENS et al., 2012).



Biossensores tradicionais (JIN et al., 2009) (microbalança de cristal de quartzo, dispositivos de onda acústica de superfície e biossensores de ressonância de plasma) tendem a se degradarem em desempenho com a utilização. Como muitos dispositivos, o biossensor pode adsorver uma quantidade de substância alvo que está sendo medida e para a maioria dos produtos comerciais este problema é contornado com o emprego de lâminas descartáveis. No desenvolvimento de biossensores, existem

duas limitações principais a serem consideradas. A primeira limitação é a instabilidade do componente biológico de detecção (enzima, anticorpo, etc.), que pode perder a sua atividade em horas ou dias, dependendo da natureza da molécula e a exposição a variações ambientais, tais como temperatura, umidade e principalmente pH. A segunda limitação é o tamanho dos transdutores físico-químicos a serem utilizados em biossensores. No caso dos biossensores de microcantilever, a detecção de um analito específico requer a imobilização de uma molécula de reconhecimento com capacidade de reconhecer outra molécula ou composto, tal como um anticorpo ou uma molécula receptora na superfície do biossensor, e esse fato proporciona mudanças nas características da superfície do microcantilever. Elucidar os mecanismos de como as reações biológicas produzam essas mudanças é fundamental para vários processos fisiológicos (WANG, C. et al., 2007).

Embora as variações de tensão superficial e de frequência possam ser utilizadas de forma independente em aplicações nos sensores, a análise das mesmas pode ser realizada com a utilização dos biossensores de microcantilever, o que os torna mais versáteis na detecção e com maior sensibilidade do que tecnologias concorrentes como a microbalança de cristal de quartzo (JIN et al., 2009), dispositivos de onda acústica de superfície (DATAR et al., 2009) e biossensores de ressonância de plasma (MANERA et al., 2007).

A adsorção de moléculas na superfície do μC resulta na variação da frequência de ressonância da haste. A frequência de ressonância “f” (KHz) de um μC varia sensivelmente com a função de carregamento de massa “ Δm ”, de acordo com a Equação 2:

Equação 2

$$f = \frac{1}{2\pi} \sqrt{\frac{k}{m_{ef} + \alpha \Delta m}} \quad [2]$$

onde k é a constante de mola do μC (N/m), m_{ef} é a massa (g) efetiva do μC e α é uma constante numérica. O aumento da área de superfície de um μC leva a uma maior massa adsorvida e maior sensibilidade de detecção. A detecção de massa por meio da medida da variação da frequência de ressonância do μC é a forma mais adequada para análises em meios gasosos ou em pressões efetiva negativa (DATAR et al., 2009). Para essa aplicação, biossensores de μC foram fabricados e

caracterizados com a capacidade de detecção de massas da ordem de poucas centenas de picogramas com menos de 0,5% de incerteza relativa (LI, L., 2011).

2.1.2 Modos de detecção no microscópio de força atômica (AFM)

Microcantilevers são sondas mecânicas com formato especial para medir forças muito pequenas, com o intuito de obtenção do relevo de uma amostra em modo não contato (NC), contato intermitente com modulação de força ou contato (ALBRECHT et al., 1990).

Como dito anteriormente, a interação da superfície funcionalizada com um analito alvo pode proporcionar uma alteração na frequência de ressonância, sendo esta medida conhecida como modo dinâmico. Já no chamado modo estático, a haste do μC é revestida em somente uma das faces e pode sofrer uma flexão quando em exposição a uma substância alvo. Esta alteração é causada por variações na tensão da superfície, devido à interação do analito com o revestimento do biossensor (BERGER et al., 1998).

A camada bioativa seletiva proporciona sítios de ligação específicos para analisar a substância alvo de interesse, tais como moléculas, proteínas e células. O transdutor transforma o sinal da tensão de superfície induzida pela interação entre os analitos e a camada bioativa em outro sinal que pode ser medido e quantificado com mais facilidade por meio físico-químico, óptico, piezoelétrico, eletroquímico, entre outros (SANG; WITTE, 2010).

Uma das primeiras aplicações do μC como sensor, foi como uma balança sensível para medições de massa, atuando como um micro ressonador (modo dinâmico) e atingindo resoluções na ordem de 10^{-12} gramas. Dispositivos comerciais de microbalança de quartzo possuem resolução na ordem de até nanogramas. Utilizando microcantilevers da ordem de $10\mu\text{m}$ de comprimento, atingiu-se elevados graus de sensibilidades da ordem de sub-attogram, permitindo a detecção de partículas de vírus individuais com massa na ordem de fentograma (GUPTA; AKIN; BASHIR, 2004).

Em microbiologia, microcantilevers têm sido aplicados como micro balança em modo dinâmico para detecção de bactérias e partículas de vírus, suspensas em pressão efetiva negativa ou ar seco (GUPTA et al., 2004; ILIC et al., 2001).

2.1.3 Fator Qualidade (Q)

O fator qualidade (Q) é o fator que determina a resolução de leitura do AFM e depende dos mecanismos de amortecimento presentes no μC ou no meio físico. Para os microcantilevers de modo NC operados no ar, Q é tipicamente da ordem de algumas centenas, mas pode chegar a centenas de milhares em pressão efetiva negativa e à baixas temperaturas, onde os ruídos são minimizados (WIESENDANGER, 1994). A otimização de microcantilevers, possibilitou um aumento do fator Q para valores tão elevados como 10.000. A operação em frequências altas, da ordem de 1,5 MHz permite uma resolução de massa teórica de cerca de 20 ag/Hz (FINOT; PASSIAN; THUNDAT, 2008).

O fator Q tende a infinito quando o amortecimento sobre a haste é mínimo, e esse amortecimento pode ser ocasionado pelas partículas presentes no ambiente (meio mais denso), pressão e temperatura. O fator Q pode ser calculado a partir da Equação 3:

Equação 3

$$Q = \frac{\omega_R * m}{c} \quad [3]$$

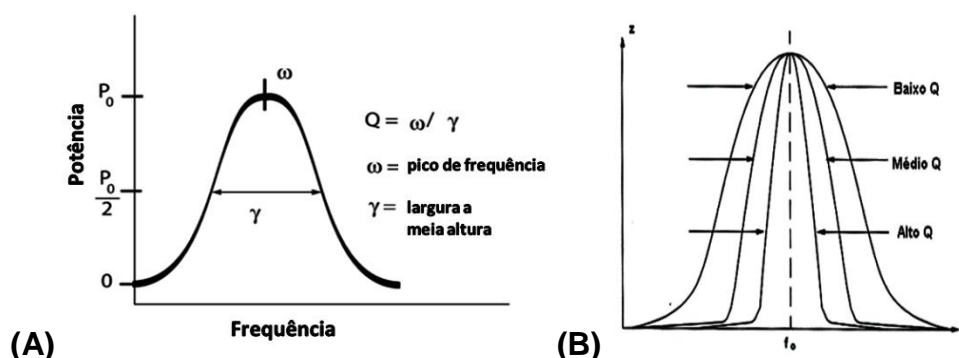
onde ω_R (Hz) é a frequência de ressonância de um oscilador amortecido, c é a constante de amortecimento e m é a massa (g) do oscilador. Aumentando-se o fator Q aumenta-se a sensibilidade das medições e valores na faixa de 100-1.000 são típicos para essas medidas (Springer Handbook of Nanotechnology (Book), 2004).

O fator Q é também considerado a medida da largura da curva de ressonância e pode ser calculado dividindo-se o pico da frequência de ressonância ω (Hz) pela largura à metade da potência máxima (γ) (Figura 4 (A)). O fator Q aumenta quanto mais agudo é o pico de ressonância (Figura 4 (B)), o que também aumenta a precisão da leitura (BRUKER, 2009).

Equação 4

$$Q = \frac{\omega}{\gamma} \quad [4]$$

Figura 4 – (A) Fator Q em função da potência/media a meia altura e (B) comportamento do gráfico em função dos valores de Fator Q, adaptado de (BRUKER, 2009).



Em modo dinâmico, uma pequena alteração na massa do μC (Δm) provoca alteração na frequência de ressonância, que pode ser calculada por intermédio da Equação 5:

Equação 5

$$\Delta m = \frac{k}{4\pi^2} \left(\frac{1}{f_1^2} - \frac{1}{f_0^2} \right) \quad [5]$$

onde k é a constante de mola do μC (N/m), f_0 e f_1 são as frequências de ressonância inicial e após adsorção de massa (Hz), respectivamente. O μC é calibrado para obter a constante de mola (k) e frequência de ressonância e o fator Q antes da adição de massa. A frequência de ressonância e o fator Q são obtidos pelo ajuste dos dados dos espectros de vibração para a resposta da amplitude, comparado com um oscilador harmônico simples (BOWEN et al., 2010; SADER; CHON; MULVANEY, 1999).

Quando ocorre adsorção na superfície de um microcantilever, a frequência de ressonância irá mudar de acordo com a lei de Hooke, que pode ser expressa pela Equação 6:

Equação 6

$$\frac{\Delta f}{f_0} \approx \frac{\Delta m}{m_{ef}} \quad [6]$$

onde Δm é a massa adsorvida, que é muito menor que a massa efetiva m_{ef} do microcantilever, Δf e f_0 são a variação da frequência de ressonância após a adsorção de massa e frequência de ressonância original, respectivamente (ONO et al., 2003).

A adsorção mínima de massa detectável Δm_{min} é dependente da alteração mínima detectável da fase do sistema de ressonância $\Delta \theta_{min}$ (valor fixo, onde o ruído

térmico e eletrônico do circuito de realimentação do AFM é levado em conta) que pode ser expresso pela Equação 7:

Equação 7

$$\Delta m_{min} = \frac{\Delta \theta_{min}}{Q} m_{ef} \quad [7]$$

O fator Q domina a resolução de detecção de massa, onde o ar e a umidade são fatores dominantes na determinação do fator Q. Diminuindo o amortecimento causado pelo ar pode melhorar significativamente o valor de Q e, desse modo, melhorar a resolução de detecção de massa do μC ressonante. Aparentemente, diminuindo as dimensões do μC pode diminuir o efeito de amortecimento do ar. Infelizmente, é bastante difícil diminuir muito a dimensão do microcantilever, porque uma área de superfície mínima é necessária para capturar especificamente os analitos alvos, que são de dimensão nanométrica. Alternativamente, estudos teóricos e experimentais ambos indicaram que a utilização de modos de ressonância de ordem superior podem efetivamente aumentar o fator Q e a resolução de detecção de massa (LI, X.; LEE, 2012).

Em medições das frequências de ressonância e os fatores de qualidade $Q = 5$, 10 , e 50 a partir da curva de ressonância das amplitudes, por exemplo, os erros processuais são -1% , $-0,25\%$ e $-0,01\%$ (ATAVIN; KURANOV; KHUDYAKOV, 2003).

2.1.4 Biossensores por detecção de tensão superficial

Biossensores baseados em tensão superficial tem um imenso potencial, pois utilizam o balanço de carga de energia livre e oferecem uma plataforma universal para detecção química e biológica (SATYANARAYANA; MCCORMICK; MAJUMDAR, 2006). Esta metodologia apresenta como vantagens: o período de tempo de resposta curto (ordem de milissegundos) e uma sensibilidade típica em nanograma (10^{-9} g), mililitro (10^{-3} l), femtojoule (10^{-15} joules) e nível attomolar (10^{-18} moles por litro) (SANG et al., 2014).

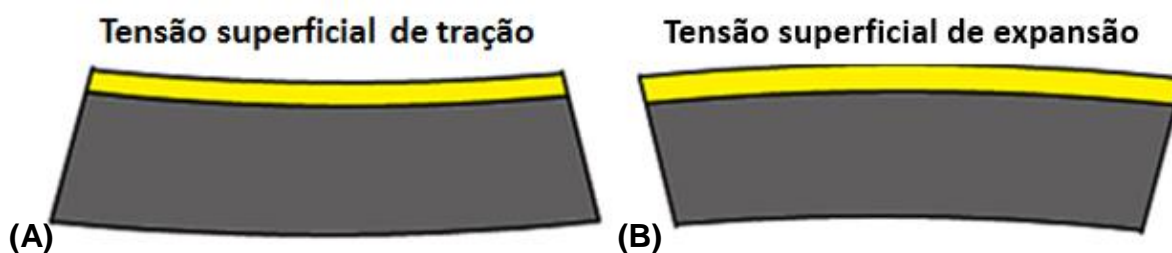
Microcantilevers funcionalizados em apenas uma das faces e micromembranas são os dois meios mais comumente utilizados para a produção de biossensores baseados em tensão superficial (SANG; WITTE, 2010; SANG et al., 2014; TSOUTI et al., 2010; YIN et al., 2013).

A tensão superficial surge a partir da ligação química entre átomos na superfície ou quando filmes finos passam por algum processo micro estrutural dinâmico, resultando em uma mudança na densidade. Se as forças de ligação entre os átomos superficiais são mais fortes do que entre os átomos de sub-superfície, uma tensão de superfície é gerada pelas forças de atração entre estes átomos, resultando em uma curvatura côncava (SANG et al., 2014).

A deformação do μC é quadrática ao comprimento para uma pequena e uniforme deflexão (Figura 5). A mudança na tensão superficial é constante ao longo da área de superfície ativa e independe da largura. Portanto, hastes longas são geralmente preferidas (ZIMMERMANN et al., 2008). Microcantilevers de silício são mais rígidos do que os de nitreto de silício devido a formação cristalina, pois esses últimos podem ser fabricados com constantes de mola suficientemente baixas para aplicações de detecção de bioquímicos (DRELICH; TORMOEN; BEACH, 2004).

Contrariamente a atração, quando os átomos de superfície repelem um ao outro por interações inter ou intra moleculares, alterações de temperatura ou de transição de fase em uma superfície, uma tensão de compressão pode ser induzida na superfície, resultando em uma curvatura convexa (Figura 5) (GODIN et al., 2004).

Figura 5 – Em (A), tensão de tração de superfície (tensão de superfície positiva) contrai a área de uma placa fina induzindo uma curvatura côncava. Em (B), a tensão de compressão de superfície (tensão superficial negativa) expande a superfície superior de uma placa fina induzindo uma curvatura convexa. Adaptado de (GODIN et al., 2004).



No modo de deflexão estático, a diferença entre a superfície funcionalizada em apenas um dos lados do μC (lado ativo) e a superfície não funcionalizada (lado passivo) causa uma mudança na tensão da superfície, ocasionando a deflexão do microcantilever. A relação teórica entre a resposta do μC (z_{max}) e a diferença da tensão entre as superfícies ativa e passiva pode ser obtida com a equação de Stoney's (BAUSELLS, 2015; IMAMURA et al., 2016; SINGAMANENI et al., 2008).

Equação 8

$$\Delta_z = \frac{3l^2(1-\nu)}{Et^2} \Delta\sigma$$

[8]

onde ν é razão de Poisson ($\nu = 0,24$ para um μC retangular) e $\Delta\sigma$ é a tensão na superfície induzida pelo analito ($\Delta\sigma$ lado ativo - $\Delta\sigma$ lado passivo (N/m)), E é o módulo de Young ($E_{\text{Si}} = 1.3 \times 10^{11} \text{ N}\cdot\text{m}^{-2}$ para Si(100)), l é o comprimento e t a espessura (m). Esta relação é válida somente para filmes finos (20% da espessura do microcantilever) (IMAMURA et al., 2016; SINGAMANENI et al., 2008).

A tensão de superfície também existe entre as moléculas, as células biológicas e alguns materiais funcionais especiais, que podem ser utilizados nos biossensores para a pesquisa biológica e médica. Quando ocorrem reações bioquímicas na superfície dos biossensores baseados em tensão superficial, mudanças nas forças intermoleculares podem criar uma tensão que altera mecanicamente a curvatura do elemento de detecção. A gama de tensão superficial em tais reações foi relatada como sendo de $5 \text{ mJ} / \text{m}^2$ a $50 \text{ mJ} / \text{m}^2$ (YUE et al., 2004) ou elevada como $900 \text{ mJ} / \text{m}^2$ (MARIE et al., 2002).

2.2 Imobilização de biomoléculas na superfície de um microcantilever

A imobilização de biomoléculas confinadas a uma superfície oferece várias características importantes para o desenvolvimento do dispositivo. Quando uma biomolécula é imobilizada, pode ser facilmente separada da mistura de reação e reutilizada. Métodos para a imobilização de biomoléculas, em superfícies, podem ser vistos como variantes com as quais estão diretamente relacionadas aos métodos clássicos, que são utilizadas para preparar as superfícies sob a designação genérica de "quimicamente modificados", como ligações em monocamadas auto organizadas (SAM - *Self Assembly Monolayer*), ligações cruzadas, adsorção entre outras (LOJOU; BIANCO, 2006).

Várias metodologias para imobilização estão disponíveis para acoplar uma biomolécula à superfície de um microcantilever, entretanto, um pré-tratamento dessa superfície é necessária para que a imobilização ocorra satisfatoriamente, como se segue.

2.2.1 Limpeza e oxidação dos microcantilevers

O processo de funcionalização inicia-se com a ativação ou modificação química da superfície dos microcantilevers, os quais devem ser meticulosamente lavados para remover contaminantes metálicos e orgânicos, além de proporcionar a oxidação da superfície (OLIVEIRA et al., 2013). Os microcantilevers de Si (100) puro são mais resistentes à oxidação, por este motivo o período de tempo de exposição deve ser maior. Este procedimento de limpeza deve ser realizado com precaução, pois somente com a oxidação correta da superfície será possibilitada a ocorrência da ligação dos demais reagentes e formação da camada funcional. Imediatamente após o processo de limpeza e oxidação, os microcantilevers devem passar pelo processo de ativação e modificação da superfície (ACRES et al., 2012; RASTEGAR et al., 2013).

2.2.2 Ativação da superfície do microcantilever

A modificação química ou ativação das superfícies de microcantilevers para a ligação de biomoléculas, comumente são realizadas por intermédio de silanos como o reagente APTES ((3-Aminopropyl)triethoxysilane) e alquióis como o 11-Amino-1-undecanethiol hydrochloride (TIOL). Dependendo do material encontrado na superfície utilizam-se metodologias diferentes para a modificação química da mesma. Abaixo segue alguns processos de ativação de superfície, discutidos a seguir.

2.2.2.1 Ativação por APTES

A ativação pode ser realizada diretamente no microcantilever, por meio de vaporização ou imersão de APTES. Nesse processo, a formação de compostos de silano em monocamadas (SAM) ocorrerá por intermédio da ligação de grupos silanol (Si-OH) dispostos na superfície do μC oxidado com grupos silanol ativos do reagente APTES. A formação de grupos silanol no reagente APTES é proveniente do processo de hidrólise química dos grupos terminais etoxi desse composto quando na presença de solventes orgânicos. Dessa forma, a extremidade NH_2 do APTES permanecerá livre permitindo a adesão de moléculas por biocompatibilidade, carga, hidrofiliabilidade ou hidrofobicidade superficial. O silano amino-funcionalizado, pode formar ligações

covalentes entre seu grupo amino e demais reagentes, como: (glutaraldeído (GLD) reação mediada) ou grupos carboxila (1-etil-3-[3-dimetilaminopropil]-carbodiimida (EDC) mediada por reticulação) de biomoléculas (VASHIST, S. K. et al., 2014).

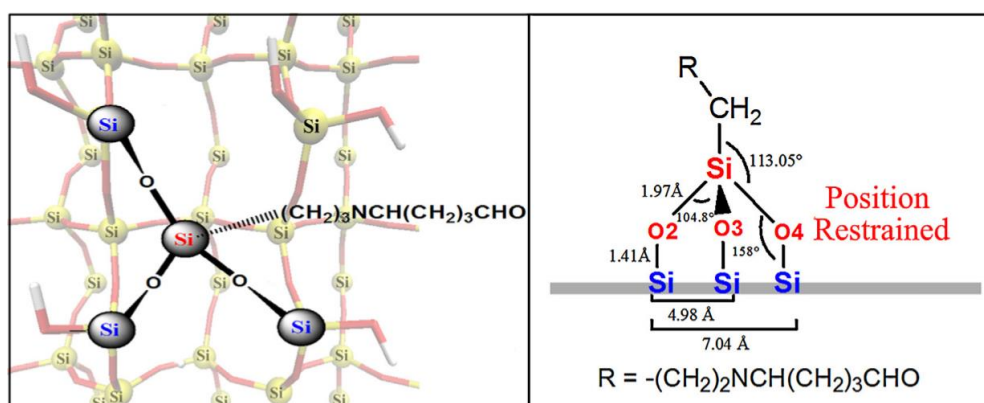
A ativação superficial de APTES solubilizado em tolueno anidro é aplicada em μC de Si sendo capaz de produzir uma monocamada na superfície do silício de 0,7 nm quando a reação for mantida no máximo por uma hora. O período de tempo ótimo de reação é de até 20 min, apesar de a reação ocorrer parcialmente na superfície, acima deste período de tempo a superfície de silício terminado por silanol sofre uma reação de polimerização de ligação cruzada das moléculas de APTES (Figura 7). O tolueno é o solvente mais indicado para utilização com o APTES, pois não interage quimicamente com o silício oxidado e conta com a vantagem da rápida evaporação sem deixar resíduos (ACRES et al., 2012).

Segundo Wang (WANG, L. et al., 2006) a concentração de APTES em tolueno anidro para a formação de uma camada uniforme deve estar entre 1% a 10% e a concentração de 2% é considerada como ótima para a ativação.

A ativação de superfícies de μC de Si_3N_4 com APTES são realizadas com sucesso por intermédio da vaporização de 40 μL de APTES puro na presença de 40 μL de trietilamina em ambiente isento de oxigênio, pelo período de 40 minutos (Figura 6) (OLIVEIRA et al., 2013).

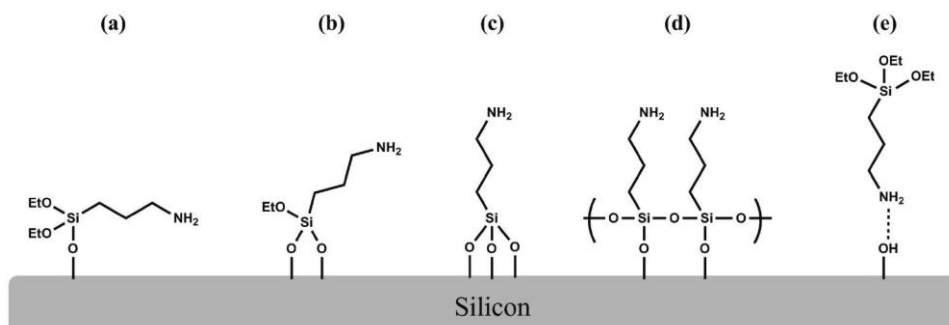
Estudos relataram que as monocamadas de APTES contem entre 2.1 a 4.2 grupamentos de amina por nanômetro quadrado (RATHOR; PANDA, 2009; ZHAO et al., 2006).

Figura 6 – Ligação do APTES na superfície de nitreto de silício do microcantilever, adaptado de (OLIVEIRA et al., 2013).



Como pode ser visto na Figura 7, o tipo de solvente utilizado afeta fortemente a densidade e a conformação das camadas de APTES covalentemente ligado. O reagente APTES forma internamente um íon dipolar em água, e, por conseguinte, solventes anidros (ou a seco) são usados para produzir uma monocamada de deposição uniforme. Nesta configuração, o grupo amina está exposto a partir da superfície de silício, disponível assim para a fase líquida ou gasosa e conseqüentemente para posterior funcionalização. A formação de múltiplas camadas pode ocorrer quando as moléculas de APTES são adsorvidas fisicamente umas às outras sobre uma superfície já ativada. Verificou-se que a ativação por APTES seca ao ar ambiente forma uma ou duas ligações siloxano na superfície, enquanto que curada ao calor (100 a 200 °C), o APTES tende a formar três ligações de siloxano com a superfície e também ajuda a remover o excesso de solvente (ACRES et al., 2012).

Figura 7 – Possíveis ligações do APTES com o Silício, adaptado de Acres (ACRES et al., 2012).



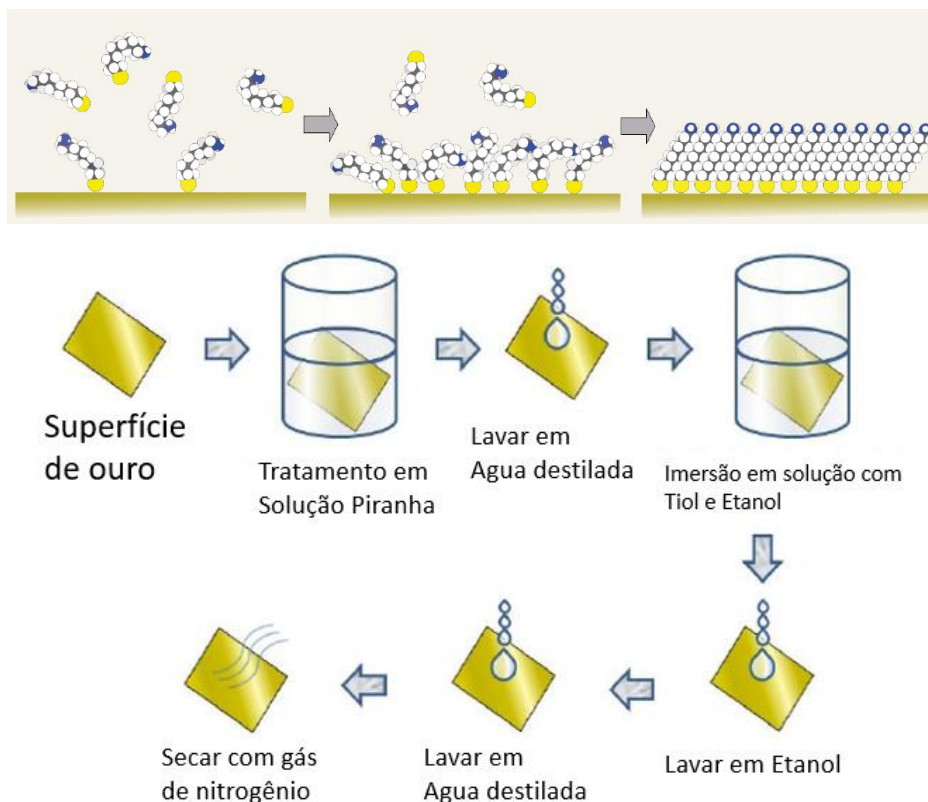
O reagente APTES faz também uma ótima ligação com ouro Au (111), mesmo após 1 mês se mantém estável sem fissuras ou descamação (HERLEM et al., 2008).

2.2.2.2 Ativação por TIOL

TIOL (11-Amino-1-undecanethiol hydrochloride) e derivados de dissulfuretos são extensivamente utilizados em biossensores pois formam camadas unidirecionais de alta-densidade devido à forte ligação em superfícies de metais nobres como o ouro (Au-S). O μC revestido de ouro é ativado ao ser imerso em uma solução com TIOL, o qual reage com os átomos metálicos, formando ligações do tipo Au-S (no caso do ouro) em camadas unidirecionais organizadas em alta densidade (Figura 8) (LOVE et al., 2005).

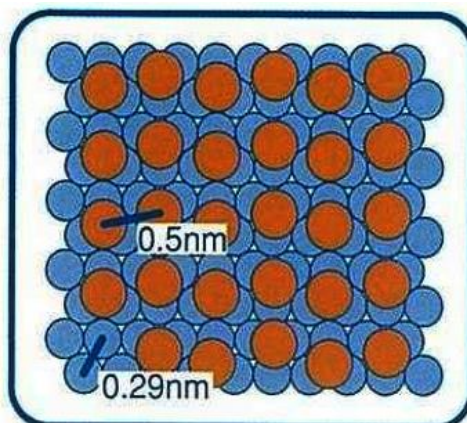
O processo de ativação é similar à metodologia utilizada com o APTES; consiste da limpeza, imersão em solução com o TIOL, remoção de moléculas não ligadas e processo de secagem (Figura 8).

Figura 8 – Processo de ativação dos microcantilevers por TIOL, adaptado de (BAIN; EVALL; WHITESIDES, 1989; BENSEBAA et al., 1997; KAWASAKI; SATO; YOSHIMOTO, 2000; UOSAKI, 1999).



A Figura 9 representa a imagem de uma superfície banhada a ouro ativada com o TIOL. A distância entre os terminais amina (NH_2) entre moléculas do TIOL é de 0,5 nm, sendo igual a 3 vezes a distância entre cada um dos átomos de ouro (0,29 nm).

Figura 9 - Esquema das moléculas de tiol (marrom) adsorvidas no Au (111) (azul), adaptado de (Yamada e Uosaki, 1997).



A deposição de ouro na superfície do μC traz diversas desvantagens, como a nucleação de ilhas (OSKAM; SEARSON, 2000). Esta última, traz problemas com a variação da temperatura devido aos diferentes coeficientes de dilatação que formam uma tensão entre os metais, e também pela facilidade da adesão de contaminantes, principalmente orgânicos. Por ser um material macio, o ouro também tem a desvantagem de gerar um amortecimento na vibração do microcantilever, diminuindo a frequência de ressonância e conseqüentemente a sensibilidade do biossensor após a funcionalização.

Tanto na ativação com APTES quanto com TIOL, não existem garantias de que a superfície ficará totalmente disponível para a ligação das biomoléculas. No caso do APTES as moléculas desse composto podem se ligar a superfície em 5 orientações diferentes (Figura 7), sendo que apenas em 3 os terminais amina (NH_2) estão disponíveis para ligações subseqüentes (Acres, R. *et al.*, 2012). Para o caso do TIOL, a deposição de ouro na superfície do silício tem vários problemas como a nucleação, formação de ilhas, contaminação, entre outros, que não permitem a formação da monocamada de forma bem distribuída em toda superfície (OSKAM; SEARSON, 2000; PARK *et al.*, 2009).

2.2.3 Ligação da Biomolécula a superfície

A ligação de biomoléculas à superfície do μC é realizada quimicamente por meio de grupos funcionais do material biológico (como grupamentos: $-\text{OH}$, $-\text{NH}_2$, $-\text{COOH}$, $-\text{SH}$) que não sejam essenciais a sua atividade catalítica, com grupos

disponíveis do TIOL ou APTES, sendo para isso necessário certo conhecimento da estrutura da biomolécula. A ligação covalente geralmente envolve três etapas: ativação da superfície do sensor, acoplamento do elemento de reconhecimento e remoção das moléculas fracamente ligadas por intermédio de limpeza (LOJOU; BIANCO, 2006).

Geralmente o grupo amina (NH_2) da cadeia lateral do aminoácido lisina é o meio de ligação comumente utilizado para a ligação covalente entre a proteína (enzima) e a superfície do microcantilever. Também podem ocorrer ligações com os aminoácidos tirosina, triptofano, fenilalanina e cisteína; no entanto as cadeias laterais da tirosina, triptofano e fenilalanina, geralmente estão orientadas para dentro da enzima, o que impossibilita o seu uso como agente de ligação (HAYAT, 1989).

Foi realizada experimentalmente uma busca detalhada na anatomia da enzima para localizar todos os aminoácidos presentes na superfície passíveis de ligações químicas sem que provoquem a inativação ou bloqueio dos sítios ativos (Figura 10). A ligação da enzima com o glutaraldeído ocorre pelos grupamentos do carbono E (CE) dos resíduos de lisina encontrados em grandes quantidades na superfície ou na porção alfa-amino da biomolécula.

Como há uma grande disponibilidade de resíduos de lisina na superfície da enzima Álcool Desidrogenase, é possível estimar a quantidade mínima de ligações desta com o agente bifuncional Glutaraldeído na superfície do μC (Figura 11). De acordo com a análise, os demais resíduos de aminoácidos aromáticos estão com os anéis voltados para a parte interna da enzima, impossibilitando a ligação com agentes externos (MARGARIDO et al., 2014).

Analisando uma região próxima a um dos sítios ativos da enzima Álcool Desidrogenase (Figura 11) estimou-se que os terminais dos resíduos de lisinas estão separados a uma distância de 0,9 a 2,5nm, sendo a dimensão total da enzima de 9,05 x 6,95nm. A densidade dos terminais da superfície ativada com APTES é de 2.1 a 4.2 terminais por nm^2 e a densidade em superfície ativada por TIOL é maior, com até 9 terminais por nm^2 . Isto sugere que ao entrar em contato com a superfície ativada, ocorrem várias ligações simultâneas entre a enzima Álcool Desidrogenase e as moléculas de glutaraldeído ligadas aos terminais da ativação, dessa forma, tem-se uma boa fixação entre os componentes do sistema.

Figura 10 - Enzima Álcool Desidrogenase, em (A) estrutura do aminoácido lisina, (B) em cinza, resíduo de lisina na superfície da enzima e (C) todos os 95 resíduos de lisina disponíveis na superfície da enzima (em amarelo), possibilitando diversas ligações com o reagente bifuncional glutaraldeído.

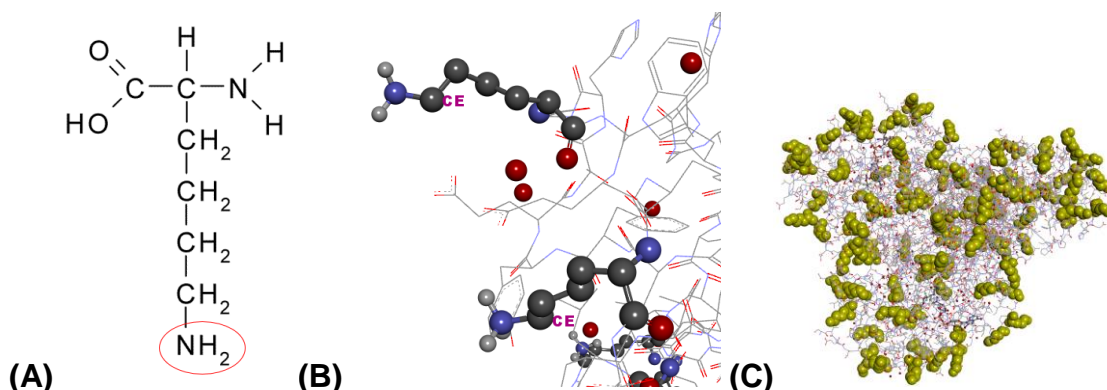
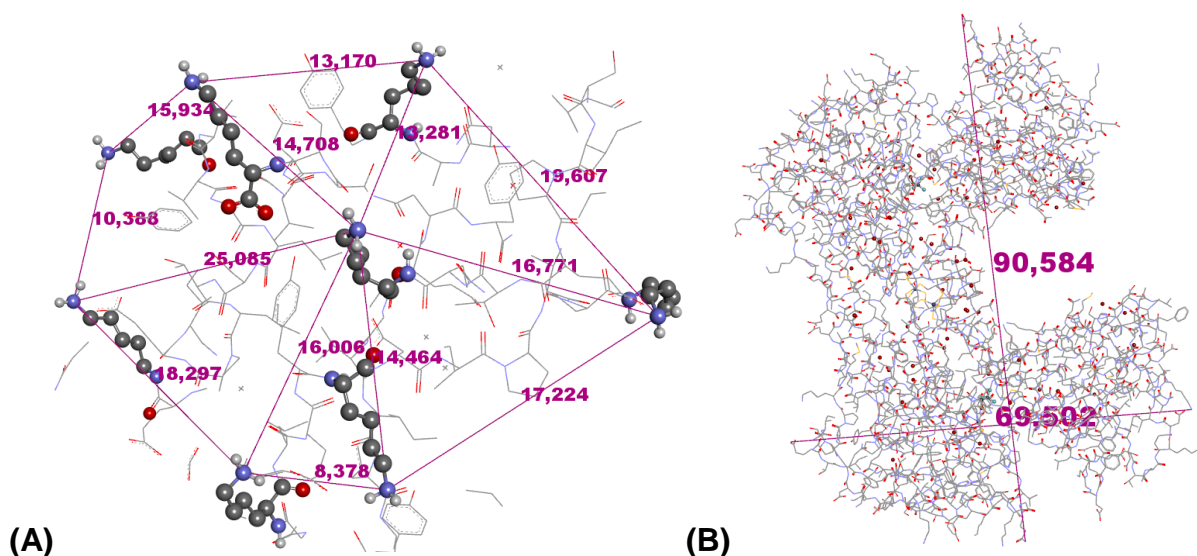
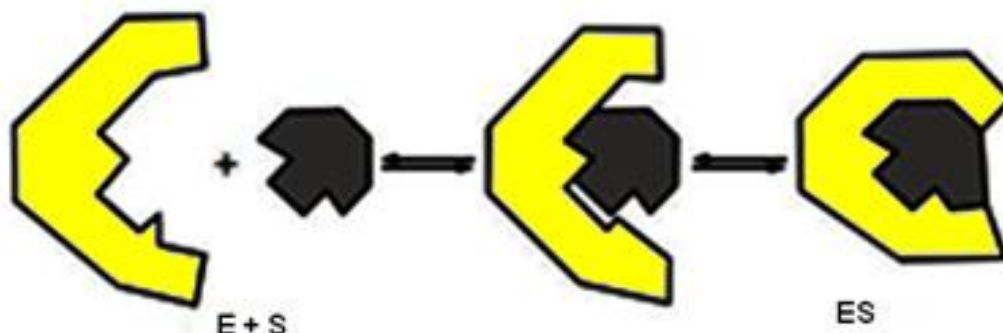


Figura 11 – (A) Distâncias em torno de 0,9 a 2,5nm dos terminais NH_2 dos resíduos de lisina em uma face da biomolécula. Em (B), encontram-se as dimensões de uma subunidade enzimática (em torno de 9,05x6,95nm).



Enzimas exibem estruturas flexíveis, onde os sítios ativos alteram a sua forma de maneira continuada por intermédio de interações com o ligante (Figura 12). As cadeias laterais dos resíduos de aminoácidos que formam os sítios ativos sofrem uma reorientação de maneira a que suas posições potencializem a ação catalítica da enzima. Os sítios ativos continuam a sofrer mudanças conformacionais até que o ligante esteja completamente ligado e é neste momento em que a conformação final e as cargas são determinadas (MOTTA, 2011; VASELLA; DAVIES; BOHM, 2002).

Figura 12 – Modelo de encaixe induzido. A ligação do ligante S a enzima E induz uma mudança conformacional, adaptado de (MOTTA, 2011).



A energia libertada quando um analito alvo é reconhecido pela enzima transforma esta última em uma conformação alternativa diferente que resulta na realização do trabalho real da conversão do analito alvo em produto. O relaxamento conformacional é essencialmente o ato elementar de reações enzimáticas, e a taxa de transformação do produto do analito alvo é determinada pela taxa desta alteração conformacional. Enquanto o relaxamento conformacional das enzimas ocorre a um nível microscópico, a escala de relaxamento pode ser expandida para um tamanho macroscópico arranjando monômeros de proteínas do citoesqueleto em fibrilas. Isto é o que se observa na contração muscular, no tecido nervoso, e durante a morfogênese. Movimentos biomecânicos são mostrados para ser um componente fundamental para a diferenciação e desenvolvimento de embriões (IGAMBERDIEV, 2012).

2.3 Diferentes configurações para imobilização da biomolécula

2.3.1 Ligação Covalente em Monocamadas (SAM)

A ligação covalente de biomoléculas à superfície do μC (Figura 13(A)) é de grande interesse em biossensores e espera-se que ocorra por intermédio da formação de monocamadas auto-organizadas (SAM) compostas por grupos terminais livres como aminas ou agentes de ligação cruzada de fixação como o glutaraldeído (CHAKI; VIJAYAMOHANAN, 2002).

A técnica de ligação covalente fornece uma imobilização mais estável, e é amplamente aplicada. As técnicas de AFM, a análise de ângulo de contato, a

elipsometria e o XPS são as mais utilizadas para verificar a ligação covalente em estrutura em monocamadas. (LOJOU; BIANCO, 2006; RASTEGAR et al., 2013).

2.3.2 Adsorção

A metodologia de adsorção (Figura 13) ou ligações fracas entre as camadas ocorre por intermédio de interações eletrostáticas, hidrófobas e hidrófilas (CHAKI; VIJAYAMOHANAN, 2002).

A adsorção física sobre uma superfície é uma técnica muito simples e esta estratégia pode ser usada para qualquer biomolécula (desde que as proteínas sejam supostamente adsorvidas espontaneamente e irreversivelmente em superfícies sólidas). Após o contato, as moléculas que não foram adsorvidas são removidas por lavagem. A técnica não é amplamente aplicável devido à possibilidade de lixiviação das biomoléculas da superfície. O processo também sofre de susceptibilidade a alterações do pH, força iônica e temperatura (IMAMURA et al., 2016; LOJOU; BIANCO, 2006).

2.3.3 Ligação Covalente Cruzada

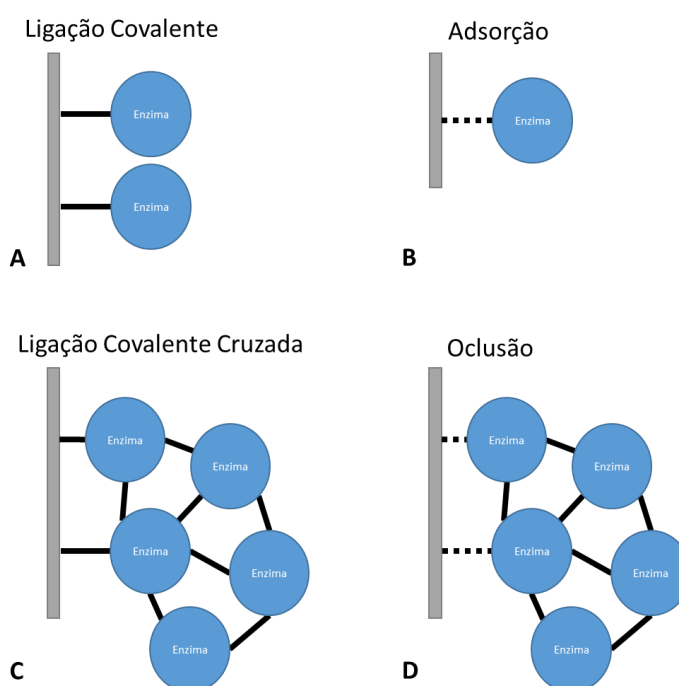
A adsorção e retenção são frequentemente suplementadas com agentes bifuncionais para evitar a lixiviação das biomoléculas devido à presença de grupamentos laterais (Figura 13(C)). As biomoléculas podem estar ligadas umas com as outras ou com outra proteína "inerte" (ex. Albumina do Soro Bovino - BSA). As dificuldades com este método é que as condições experimentais nem sempre são fáceis de controlar e é possível que a integridade da biomolécula não seja totalmente conservada após o passo de ligação cruzada (LOJOU; BIANCO, 2006).

2.3.4 Oclusão – Gel/Polímero de aprisionamento

Esta técnica é de fácil obtenção e possui uma ampla variedade de matrizes (Figura 13(D)). Outras vantagens são que a maioria das biomoléculas podem ser facilmente incorporada em polímeros e imobilizada em uma concentração elevada de biomoléculas ativas. A matriz mais correntemente empregada são hidrogéis tais como o alginato, colágeno, triacetato de celulose, poliacrilamida, gelatina, borracha de

silicone, e poli (álcool vinílico). O tamanho e estrutura do polímero podem trazer alguns inconvenientes como a desativação por radicais formados durante a formação do polímero. A lixiviação da enzima também pode ser observada (LOJOU; BIANCO, 2006).

Figura 13 – A linha contínua significa ligação covalente e a linha tracejada significa apenas ligações fracas, em (A) ligação covalente e formação de monocamadas sobre a superfície do microcantilever, (B) Adsorção, apenas interações fracas entre a molécula e a superfície, (C) Ligação covalente cruzada entre as moléculas e a superfície e em (D) Oclusão, ocorre ligações covalentes somente entre as moléculas e ligações fracas com a superfície do microcantilever.



2.4 Vantagens da formação de monocamadas auto-organizadas (Self-Assembly Monolayer (SAM)) para biossensores

O uso de SAM para ligação de biomoléculas ou usando ligações químicas diretas ou por encapsulação com a ajuda de suportes poliméricos, tem como vantagens (CHAKI; VIJAYAMOHANAN, 2002):

1. Formações de monocamadas organizadas, livre de grandes fissuras e estáveis em longos períodos de tempo;

2. Membrana como microambiente (celular) fornecido pela superfície SAM (é adequado para imobilização da biomolécula);
3. Flexibilidade para selecionar o grupo de terminais funcionais de SAM, a fim de possibilitar superfícies com grupamentos amina ou carboxila para interação;
4. Capacidade para desvendar informações em escala molecular sobre fenômenos como a adsorção de proteínas, hibridização de DNA, interação antígeno-anticorpo etc., utilizando técnicas sensíveis à superfície, tais como microscopia de força atômica e STM (CHAKI; VIJAYAMOHANAN, 2002).

2.4.1 Limitações de SAM para biossensores

Biomoléculas imobilizadas são muito sensíveis em relação a mudanças no pH, força iônica e temperatura. Uma pequena alteração em um desses parâmetros às vezes pode ser suficiente para a enzima perder a sua atividade. A estabilidade química de algumas das SAMs pode ser comprometida quando oxidadas quimicamente. O campo elétrico induzido e a dessorção térmica de monocamadas são prejudiciais para aplicações em biossensores. Devido à elevada energia superficial, a superfície hidrofóbica da SAM pode acumular vários contaminantes e impurezas indesejadas, que uma vez adsorvidas podem bloquear os sítios de reconhecimento do analito (CHAKI; VIJAYAMOHANAN, 2002).

Capítulo 3

MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Considerações Iniciais

Os materiais utilizados neste trabalho são de marcas comerciais reconhecidas e consagradas no ramo da biotecnologia. Os métodos aplicados foram testados em diversos outros trabalhos encontrados na literatura e neste trabalho foram aplicados em pelo menos 3 repetições para garantir a fidelidade dos dados adquiridos.

3.2 Instrumentação e reagentes utilizados

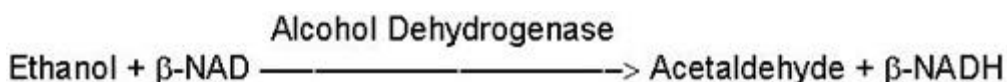
3.2.1 Reagentes Utilizados

Todos os reagentes foram adquiridos da Sigma–Aldrich e utilizados conforme adquirido: Álcool Desidrogenase de “*Saccharomyces cerevisiae*” (A7011); “(3-Aminopropyl) triethoxysilane” 99 % (APTES) (440140); Solução de Glutaraldeído (GLD) Grade I, 25 % em água (G5882); “11-Amino-1-undecanethiol hydrochloride” 99% (TIOL) (674397), Etanol puro 200 proof, para biologia molecular (E7023) e J.T.Baker- 18078-TOLUENO, PA, ACS, 99,5 %. A água foi purificada pelo sistema Milli-Q (Millipore Co. 18,0 MΩ*cm-1).

Gás Nitrogênio 5.0 com pureza mínima de 99,999% e umidade inferior a 2ppm-mol, Nitrogênio Líquido com pureza mínima de 99,999% e umidade inferior a 2ppm.

3.2.2 Características da enzima Álcool Desidrogenase

A enzima Álcool Desidrogenase é responsável pela oxidação de moléculas de álcool em aldeídos ou cetonas, tendo ampla especificidade para substratos com grupos álcool de cadeias curtas. A reação requer a presença da coenzima β -NAD como acceptor de hidrogênio. Esta pertence a uma família de desidrogenases que têm um domínio de ligação a nucleotídeos. A estratégia de enzimas NAD-dependentes é orientar a coenzima e o substrato sobre a superfície da enzima, de tal modo que o átomo de C4 na nicotinamida é dirigida no carbono reativo do substrato. Os domínios de ligação ao β -NAD de todas estas enzimas são altamente homólogas, mas eles têm marcadamente diferentes domínios catalíticos (COLONNACESARI et al., 1986; EKLUND; SAMAMA; JONES, 1984; SAMAMA; WRIXON; BIELLMANN, 1981).



3.2.2.1 Estrutura da enzima Álcool Desidrogenase

A Álcool Desidrogenase localizada no banco de dados de proteínas como PDB: 4W6Z, é um homodímero em sua forma estrutural. Cada monômero tem 374 resíduos com massa molecular de aproximadamente 74.000 Daltons. Essa enzima é composta por dois domínios: o domínio de ligação ao β -NAD (resíduos 176-318) é composto de uma folha-beta central de seis fitas, flanqueadas por hélices alfa. O β -NAD liga-se ao C-terminal dessa folha-beta; o domínio catalítico (resíduos 1-175, 319-374) também apresenta uma estrutura alfa/beta. A interface entre os domínios forma uma fenda que contém o sítio ativo catalítico da enzima. A interface é formada por duas hélices, uma de cada domínio cruzadas uma sobre a outra. Existem dois íons Zn^{++} por monômero, obrigatório em cada sítio ativo para a realização da catálise. O substrato se liga no interior do sítio onde está o cátion Zn^{++} , fazendo com que o anel de nicotinamida do β -NAD aponte para o interior da fenda. Os domínios catalíticos da enzima estão

situados em extremidades opostas (COLONNACESARI et al., 1986; EKLUND et al., 1984; SAMAMA et al., 1981).

3.2.2.2 Ensaio de atividade da enzima Álcool Desidrogenase

Seguindo os protocolos fornecidos pelo fabricante (código A7011 - Sigma Aldrich), a enzima apresentou atividade extremamente baixa. Foi constatado que a concentração de β -NAD seguindo o protocolo original não estava apresentando resultados satisfatórios. Dessa forma, foi realizado um teste no qual, ao invés dos 15mM final de β -NAD recomendado, utilizou-se 1,0mM final. Com essa concentração de β -NAD a enzima passou a funcionar como esperado (Figura 14) e mesmo reduzindo a quantidade de β -NAD pela metade (0,5mM) foi obtido praticamente o mesmo perfil de atividade (Figura 15). Pela concentração sugerida no protocolo da Sigma Aldrich que acompanha os reagentes, teríamos aproximadamente 7,5 milhões de moléculas de β -NAD para cada molécula de enzima, o que talvez possa ter provocado de alguma forma uma inibição da atividade enzimática. Quando a quantidade de β -NAD foi reduzida em 87%, obteve-se o resultado esperado e para os ensaios posteriores foi mantido o volume inicial de 3mL na cubeta do espectrofotômetro com concentrações reduzidas de β -NAD (0,5mM).

A reação exercida pela enzima Álcool Desidrogenase é a transformação de etanol na presença de β -NAD em acetaldeído e β -NADH, onde uma unidade da enzima é responsável pela conversão de 1 μ mole de etanol em acetaldeído por minuto em pH8.8 a 25°C. O espectrofotômetro na região UV (340nm) consegue mensurar a quantidade de β -NADH que é liberada na reação de conversão, o acetaldeído que é a oxidação do etanol, o espectrofotômetro não consegue monitorar.

Também se concluiu que o BSA (sugerido no protocolo) não apresentou influência em solução, para a atividade enzimática (Figura 16). O ensaio em solução, acompanhado no espectrofotômetro está descrito abaixo:

Ensaio 1 (concentrações finais): 100 μ L de solução de enzima a 0,002 mg/mL, 1mM de β -NAD, 100,0 μ L etanol 200 proof, 10,0 mM tampão Fosfato de Sódio pH 8.8 com BSA dissolvido a 1,0 mg/ml.

O volume final das reações fora de 3,0 mL.

Para esses ensaios de atividade, a variação de absorção acima de 0,15 nos períodos de tempos de até 6 minutos, registrada a 340nm, indica alta atividade

enzimática. Foi necessária a realização de um controle para cada reação, onde no lugar da enzima colocou-se o mesmo volume de tampão e seguindo-se o procedimento idêntico ao da reação enzimática. O cálculo dos parâmetros Unidades / mL de enzima e Unidades / mg de enzima sólida para esses ensaios, foi efetuado de acordo com a fórmula abaixo:

$$\text{Unidades/mL de enzima} = (\Delta A_{340}/\text{min ensaio} - \Delta A_{340}/\text{min controle}) \times (3.0) \times (\text{df}) / (6.22) \times (0.1)$$

3.0 = Volume total da reação (mL)

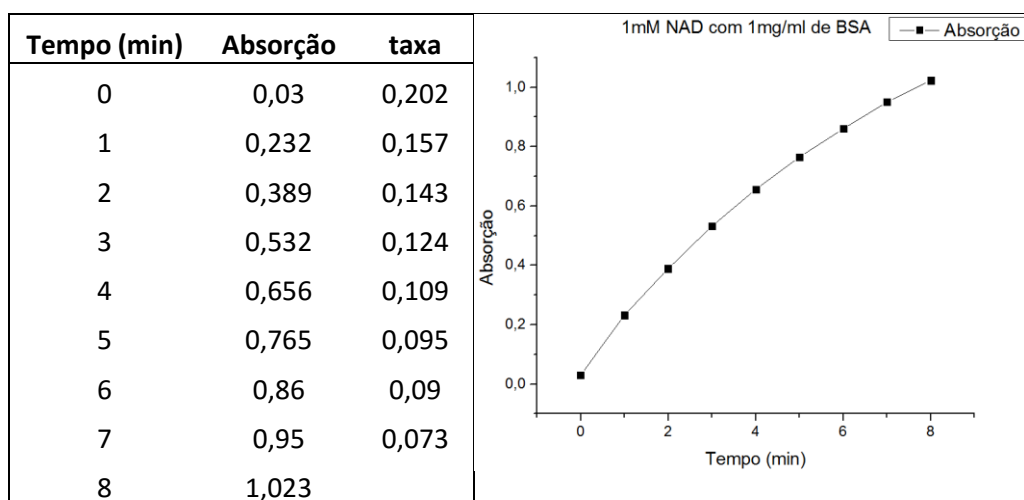
df = fator de diluição da enzima

6.22 = coeficiente de extinção molar do β -NADH a 340 nm

0.2 = Volume da solução de enzima utilizada (mL)

Unidades / mg de enzima sólida = Unidades/mL de enzima / mg sólido/mL de enzima

Figura 14 – Ensaio 1 – teste de atividade da enzima Álcool Desidrogenase monitorada em UV a 340nm – Solução com 1mM de β -NAD e 1mg/ml de BSA.

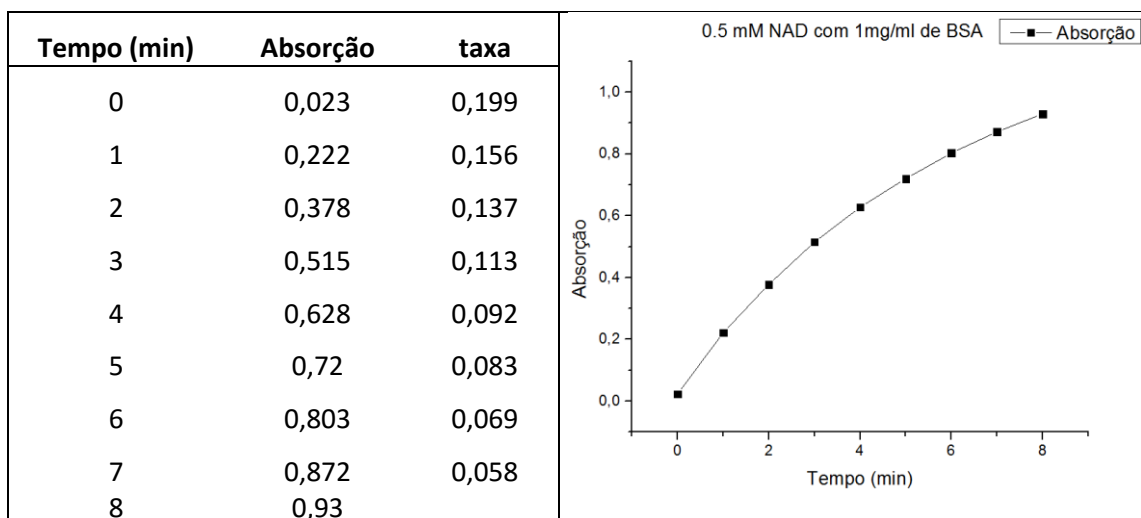


U/ml	391,237
U/mg solido	195,618

Notamos que mesmo após 20 minutos de reação, a enzima continuava ativa e liberando β -NADH, o que significa que não faltou β -NAD ou Etanol durante o ensaio.

Ensaio 2 (concentrações finais): 100,0 μ L de solução de enzima a 0,002 mg/mL, 0,5 mM de β -NAD, 100 μ L etanol 200 proof, 10,0 mM tampão Fosfato de Sódio pH 8.8 com BSA dissolvido a 1mg/ml.

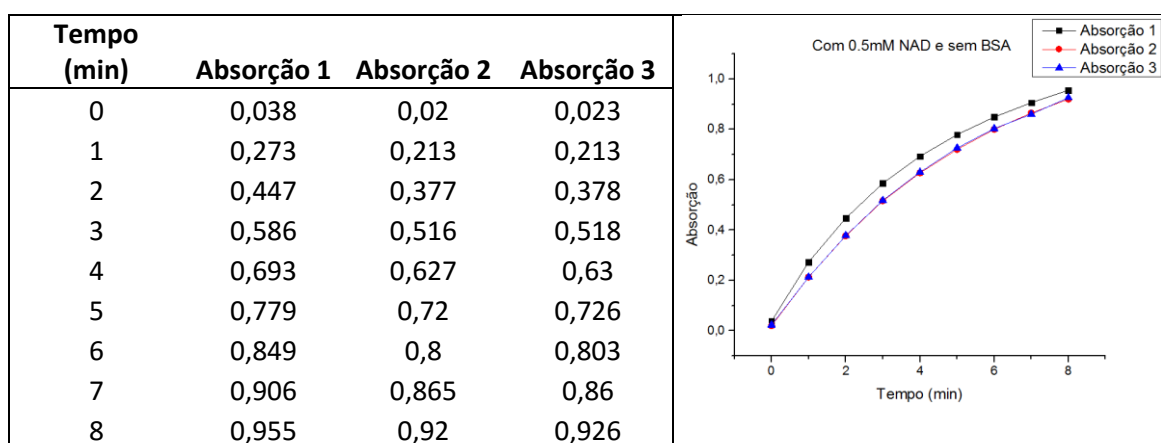
Figura 15 - Ensaio 2 – teste de atividade da enzima Álcool Desidrogenase em UV a 340,0 nm – Solução com 0,5 mM de β -NAD e 1,0 mg/ml de BSA.



U/ml	388,745
U/mg solido	194,372

Ensaio 3, 4 e 5 (concentrações finais): 100,0 μ L de solução de enzima a 0,002 mg/mL, 0,5 mM de β -NAD, 100,0 μ L etanol 200 proof, 10,0 mM tampão Fosfato de Sódio pH 8.8 sem BSA:

Figura 16 - Ensaio 3, 4 e 5 – teste de atividade da enzima Álcool Desidrogenase em UV a 340 nm – Solução com 0,5 mM de β -NAD e sem BSA.



taxa	taxa	taxa
0,235	0,193	0,19
0,174	0,164	0,165
0,139	0,139	0,14
0,107	0,111	0,112
0,086	0,093	0,096
0,07	0,08	0,077
0,057	0,065	0,057

0,049 0,055 0,066

U/ml	433,601	408,681	411,173
U/mg sólido	216,800	204,340	205,586

Conforme observado na Figura 16, a taxa de variação de absorção a 340nm foi relativamente maior do que nos outros ensaios, indicando que o BSA apesar de ajudar na estabilização da enzima não contribuiu para a atividade enzimática.

3.2.3 Microcantilevers

Os microcantilevers de Nitreto de Silício foram adquiridos do fabricante NT-MDT, modelos NSG-10, NSG-03, CSG01 e os de Silício do fabricante BudGet Sensors, modelo TAP 300G. As características físicas de cada μC estão apresentadas na Tabela 1. NanoWorld 38763f171497 Q=300 (0.001 a 0.1 N/m).

Tabela 1– Características físicas dos microcantilevers utilizados.

	NSG10	NSG03	CSG01	TAP 300G
Comprimento do Microcantilever (C) [μm]	95 \pm 5,0	135 \pm 5,0	350 \pm 5,0	125 \pm 10,0
Largura do Microcantilever (L) [μm]	30 \pm 3,0	30 \pm 3,0	30 \pm 3,0	30 \pm 5,0
Espessura do Microcantilever [μm]	2,0 \pm 0,5	1,5 \pm 0,5	1,0 \pm 0,5	4 \pm 1,0
Frequência de ressonância (KHz)	140 – 390,0	47 – 150,0	4 – 17,0	300 \pm 100,0
Constante de mola (K) [N/m]	3,1 – 37,6	0,35 – 6,1	0,003 – 0,13	20 – 75,0

3.2.4 Instrumentação utilizada

A resposta de frequência de ressonância do μC durante a excitação foi medida utilizando um microscópio de força atômica Veeco V – DimensionTM. O laser emitido de um diodo é colimado e apontado para a ponta do microcantilever, sendo então

refletido para um fotodetector de quatro quadrantes. A resposta de um espectro de ressonâncias da excitação de um μC foi analisado pelo software NanoScopeTM.

Para a aquisição de temperatura e umidade foi utilizado o equipamento Sensirion SHT2X, com erros de $\pm 3\%$ para umidade e $\pm 0,3\%$ em temperatura.

Para aquisição de imagens foram utilizados os equipamentos de AFM:

Park NX10 (laboratório LNNano do Sincrotron em Campinas);

Digital Instruments Nanoscope III (laboratório LNNano do Sincrotron em Campinas);

NanoSurf EasyScan 2 (Embrapa Instrumentação);

Bruker ICON Nanoscope V (USP – IFSC).

Erros de calibração nos equipamentos utilizados:

Eixos x,y: $< 1,2\%$ eixo z: $< 3\%$.

Erro de leitura da frequência de ressonância: como em todos os ensaios o fator foi superior a 50, o erro de leitura é $< 0,01\%$.

O software Discovery Studio foi utilizado para estudar a biomolécula assim como fornecer as imagens aqui apresentadas.

Os gráficos apresentados foram tratados pelo software OriginPro 9.0.

O software utilizado para o tratamento e apresentação das imagens Gwyddion 2.44, também foi utilizado para realizar o nivelamento por 3 pontos nas regiões onde foi removida a camada funcional.

3.3 Metodologia para funcionalização do microcantilever

Antes do processo de funcionalização, os microcantilevers foram submetidos a um tratamento térmico e posteriormente lavados para remoção de contaminantes metálicos e orgânicos da superfície. Para tanto, utilizou-se solução Piranha (70 % H_2SO_4 concentrado em 30 % H_2O_2 , 1:1) por 5 min para microcantilevers de Si_3N_4 e por 30min para microcantilevers de Si (100), a temperatura ambiente. O período de tempo limite de 5 min em solução Piranha para microcantilevers de Si_3N_4 foi definido experimentalmente após observar a corrosão superficial (Figura 17 e Figura 18) de modo a não influenciar demasiadamente na leitura do AFM. O período de tempo de 30 min em solução Piranha para os microcantilevers em Si não degradou a superfície

ao ponto de modificar as suas características físicas, procedimento descrito por Acres (ACRES et al., 2012). Após lavagens em H₂O deionizada (Milli-Q) (3 banhos de 5 minutos) os microcantilevers foram secos em estufa a 100 °C por 30 min para a remoção de qualquer resíduo de enxofre da solução piranha e outros contaminantes. Imediatamente após o processo de limpeza e oxidação, os microcantilevers devem passar pelo processo de ativação, ou seja, modificação de sua superfície com os reagentes APTES ou TIOL, que pode ser executado com diferentes metodologias.

O processo de tratamento térmico tratou-se de uma ideia nova a ser testada e, como pode ser visualizado na Figura 17, tal procedimento mostrou-se eficaz para facilitar o processo de ativação auxiliando na remoção de componentes orgânicos e na oxidação da superfície, além de melhorar a adesão do recobrimento pelo ouro e aumentar a sensibilidade após a funcionalização. Foi observado, que o tratamento térmico pouco influenciou na qualidade da reflexão do μC de Si_3N_4 recoberto com ouro (Figura 17), o ponto vermelho é o laser refletido no fotodetector. Observou-se um pequeno aumento da rugosidade da superfície com o período de tempo de tratamento térmico, gerando dessa forma, um pequeno espalhamento do laser refletido com uma pequena atenuação na intensidade. Já em microcantilevers de Si sem qualquer recobrimento, nenhuma alteração foi detectada.

Foi constatado que em microcantilevers de Si_3N_4 o período de tempo de exposição à solução Piranha (Figura 18) deve ser de no máximo 5 minutos. Períodos de tempo superiores são suficientes para a corrosão deformar completamente a ponta do μC (Figura 18 (C)), alterando dessa forma, suas características físicas e fazendo com que ocorra um grande espalhamento na reflexão do laser reduzindo sua intensidade e causando uma leitura imprecisa pelo fotodetector.

Figura 17 – Efeito do tratamento térmico na superfície do μC de Si_3N_4 revestido com ouro em (A) Novo (sem tratamento), (B) tratamento térmico a $500\text{ }^\circ\text{C}$ por 8 h e (C) tratamento térmico a $500\text{ }^\circ\text{C}$ por 16 h.

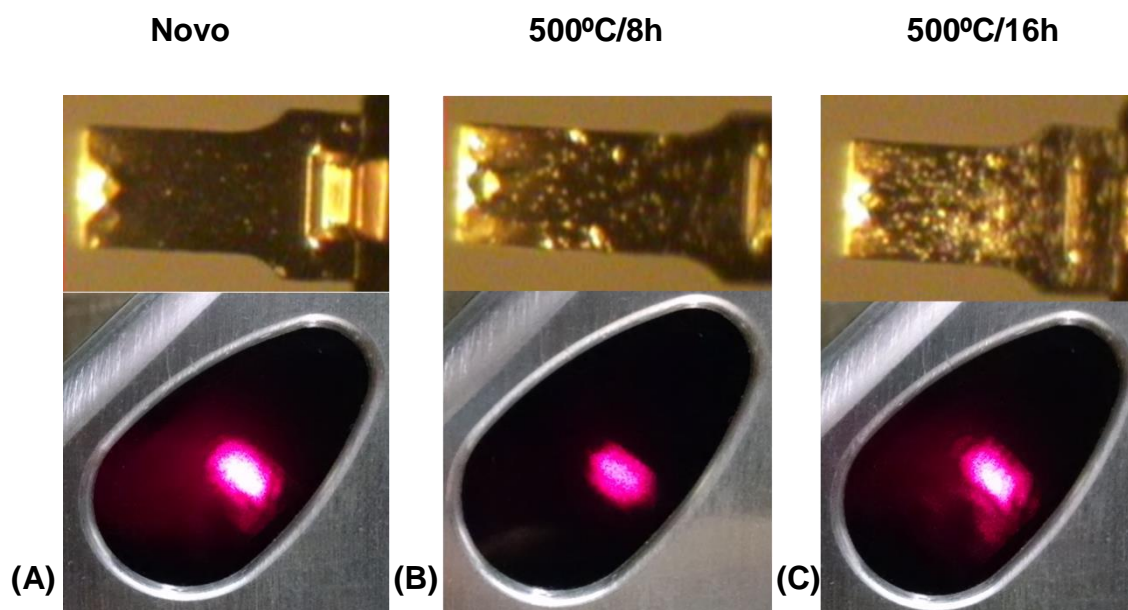
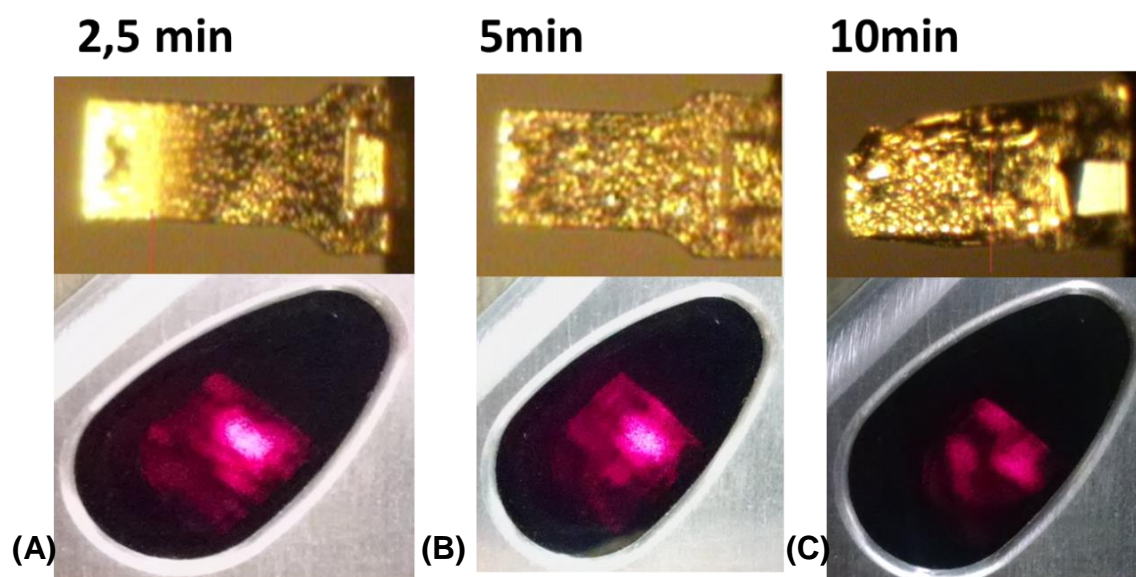


Figura 18 – Efeito da solução piranha na superfície do μC de Si_3N_4 revestido com ouro no espalhamento do laser para (A) 2,5, (B) 5 e (C) 10 minutos de exposição.



Em microcantilevers de Si puro, a exposição à solução Piranha por até 40 min não causou danos observáveis à superfície.

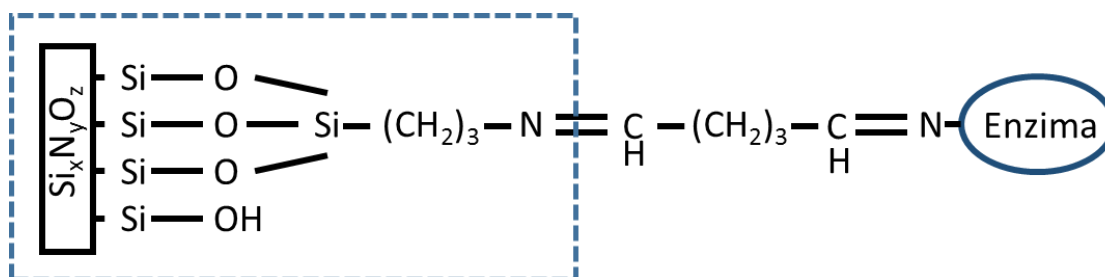
A enzima Álcool Desidrogenase foi imobilizada na superfície do μC por maneiras distintas. Essa enzima tem como substrato (analito alvo) principal o etanol, seguido de metanol e isopropanol. Foram utilizados os ativadores químicos (*biolinkers*) mais comumente utilizados para esta aplicação, sendo eles:

3-Aminopropyltriethoxysilane (APTES), solução de glutaraldeído (GLD) 25 % em H₂O e 11-Amino-1-undecanethiol hydrochloride 99 % (TIOL).

Para a imobilização de uma biomolécula na superfície do silício ou nitreto de silício, é necessária a aplicação de uma ou mais camadas de *biolinkers* de maneira a estabelecer ligação covalente entre os componentes da camada funcional, sem prejudicar a atividade biológica da enzima de forma a manter sua sensibilidade para o analito alvo. Esta camada funcional formada pelos *biolinkers*, tradicionalmente é realizada de duas maneiras distintas: pela formação de monocamadas auto-organizadas (*self assembled monolayer* – SAM) com ligações covalentes ou por ligações covalentes cruzadas, a qual baseia-se na ligação cruzada entre os grupos do suporte com grupos das biomoléculas, empregando-se reagentes bi ou multifuncionais.

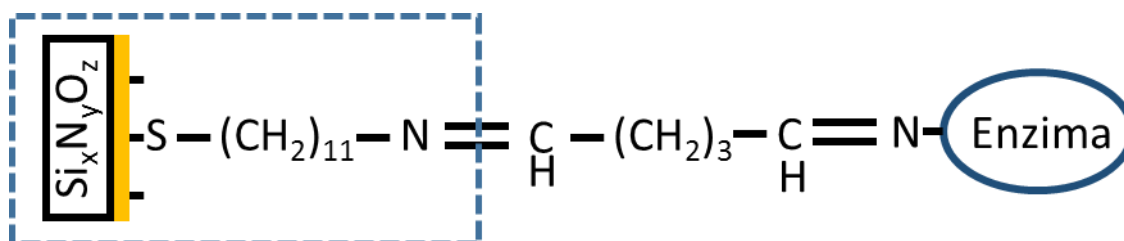
Para todos os experimentos, a funcionalização em SAM foi realizada com a solução estoque de enzima álcool desidrogenase (0,25 mg/mL) dissolvida em tampão 50,0 mM de fosfato de sódio, pH 8.6. O processo iniciou-se com o tratamento térmico e limpeza dos microcantilevers (item 3.3 dessa seção) seguindo-se o processo de ativação dos mesmos (Figura 19 e Figura 31 quadro serrilhado). Os grupos amino do APTES ou TIOL da superfície recém-ativada, foram incubados com solução de glutaraldeído 1% em tampão fosfato de sódio, durante 1 h à temperatura ambiente e posteriormente os microcantilevers foram lavados em tampão fosfato de sódio pH 8.6. Em seguida foi realizada a incubação desses microcantilevers já ativados com a solução de enzima solubilizada em tampão fosfato de sódio pH 8.6, durante 6 horas a 25 °C. Decorrido esse período de tempo, os microcantilevers foram limpos novamente em tampão fosfato de sódio pH 8.6, para remoção de enzimas não ligadas, resultando assim na formação de monocamadas auto-organizadas (SAM) com ligações covalentes. Para demonstrar o efeito das diferentes maneiras para realizar a ativação da superfície, as frequências de ressonância em cada estágio da funcionalização foram comparadas (Figura 31 e Figura 32) (ACRES et al., 2012; OLIVEIRA et al., 2013).

Figura 19 – Ligação covalente da enzima em monocamada auto-organizada (SAM) ativada com APTES (quadro serrilhado), seguido de glutaraldeído e a enzima.



A funcionalização por meio de ativação com TIOL (Figura 20) ocorre da mesma maneira que a ativada com APTES, mudando apenas a forma de realizar a ativação (necessidade do prévio banho de ouro no microcantilever).

Figura 20 – Ligação covalente da enzima em monocamada auto-organizada ativada com TIOL (quadro serrilhado), seguido de glutaraldeído e enzima.



3.3.1 Ativação por intermédio de Vapor de APTES

Para a vaporização do APTES foi adaptado um dessecador com uma entrada de gás na lateral e uma tampa com boa vedação com um furo central (Figura 21) que permite a dosagem dos reagentes em seu interior por meio de uma pipetadora (Eppendorf Research Plus 10-100 $\pm 0,2 \mu\text{L}$). A pipetagem for feita pelo furo central com a tampa fechada e com gás circulando, de maneira que não haja a contaminação com o ar ambiente dentro da câmara.

Figura 21 – Dessecador adaptado para vaporização do APTES e ativação da superfície dos microcantilever.



O processo de ativação por vapor de APTES foi realizado como se segue:

- purgou-se o reservatório com nitrogênio por 10 minutos para total eliminação da umidade e oxigênio;
- adicionou-se 40,0 μL de APTES e 40,0 μL de Trietilamina (mantém o pH básico);
- Período de tempo de exposição: 40 min a 1 hora;
- Tratamento térmico de 100 $^{\circ}\text{C}$ por 30 minutos para garantir a melhor fixação dos terminais do APTES (ACRES et al., 2012).

Oliveira (OLIVEIRA et al., 2013) utilizou em seus experimentos o período de tempo de 40 min de exposição ao vapor de APTES. Em nossos estudos, foram testados experimentalmente a exposição ao vapor em períodos de tempos de até 3 h, entretanto, não foi constatado qualquer incremento de massa após o período de tempo de 1 h de exposição. Esse fato foi checado pela variação da frequência de ressonância do microcantilever.

3.3.2 Ativação por Imersão em APTES

Ativação com APTES por imersão em solução 2 % (v/v) em tolueno seco, por período de tempo de 15 a 20 minutos.

3.3.3 Ativação por imersão em TIOL

Os microcantilevers de silício receberam um banho de ouro de 20,0 nm pela técnica de *sputtering*, após tratamento térmico por 8 horas a 500 $^{\circ}\text{C}$. Em seguida foram lavados em solução piranha por 5 minutos para a remoção de resíduos orgânicos e

metálicos, seguido de lavagens com água milli-Q e etanol e posteriormente secos a 100 °C por 30 min (Figura 8). Em seguida foram depositados em um recipiente com solução de tiol a 1,0 mM dissolvido em etanol 200proof (Sigma) e ajustado o pH em 8,0 com trietilamina. Os microcantilevers permaneceram nessa solução por 24 horas a 25 °C para a formação de uma monocamada densa e organizada, também chamada de ativação (Figura 20 quadro tracejado) (BAIN et al., 1989; BENSEBAA et al., 1997; UOSAKI, 1999). Após secagem em gás de nitrogênio 5.0 (pureza mínima: 99,999 %), os microcantilevers estavam prontos para receber outra monocamada de glutaraldeído por imersão em solução a 2 % em tampão fosfato com pH 8.6.

3.3.4 Técnicas de funcionalização testadas

Com a superfície do μ C ativada (apenas o recobrimento com o TIOL ou APTES – quadro serrilhado azul – Figura 19 e Figura 20), a funcionalização pode ser realizada por técnicas distintas. Abaixo seguem as funcionalizações testadas:

1 – Ligação em camadas auto-organizada (SAM), iniciado com a limpeza e oxidação o microcantilever, seguido da ativação, imersão em solução com glutaraldeído e imersão em solução contendo a enzima Álcool Desidrogenase, Figura 13 (A);

2 - Ligação covalente-cruzada, Figura 13 (C): foram depositados diretamente no μ C ativado 10,0 μ L da solução de enzima em tampão fosfato de sódio pH 8.6 e logo em seguida adicionou-se 2,0 μ L de Glutaraldeído (25 %) diretamente sobre o μ C ativado com APTES ou TIOL. Misturou-se cuidadosamente com a tip da pipetadora e aguardou-se por 1 minuto antes de retirar o excesso. Em seguida, deixou-se incubando por 3 h em temperatura ambiente para que ocorresse a polimerização. O período de tempo de exposição para a formação de ligações covalentes cruzadas confere a espessura da camada funcional, aspecto esse de difícil controle e padronização.

3 – Oclusão, Figura 13 (D): foram depositados diretamente no μ C sem ativação, propositalmente para não formarem ligações fortes entre a camada funcional e a superfície do microcantilever, 10,0 μ L da solução de enzima em tampão fosfato de sódio pH 8.6 e logo em seguida, 2,0 μ L de Glutaraldeído (25 %). Misturou-se com a tip da pipetadora e aguardou-se por 1 minuto antes de retirar o excesso. Como

anteriormente, seguiu-se a incubação por 3 hs em temperatura ambiente para a polimerização. Nesse processo, ocorre a formação de ligações covalentes cruzadas entre as moléculas da enzima e apenas interações fracas com a superfície do microcantilever. Nessa técnica também há a interferência do período de tempo de exposição na espessura da camada funcional.

4 – Adsorção, Figura 13 (B): nesse processo, basta mergulhar o μC em uma solução contendo a enzima, remover e deixar secar por algumas horas. Dessa forma, as enzimas se ligarão fracamente à superfície do μC por adsorção. Nesta situação não foi possível utilizar o μC como biossensor, pois ao adicionar o substrato pode ocorrer a lixiviação das enzimas da superfície. Entretanto, pela diferença na frequência de ressonância antes e depois do processo de adsorção, é possível estimar a quantidade em massa de enzimas que foram adsorvidas na superfície, preferencialmente em uma câmara em pressão efetiva negativa.

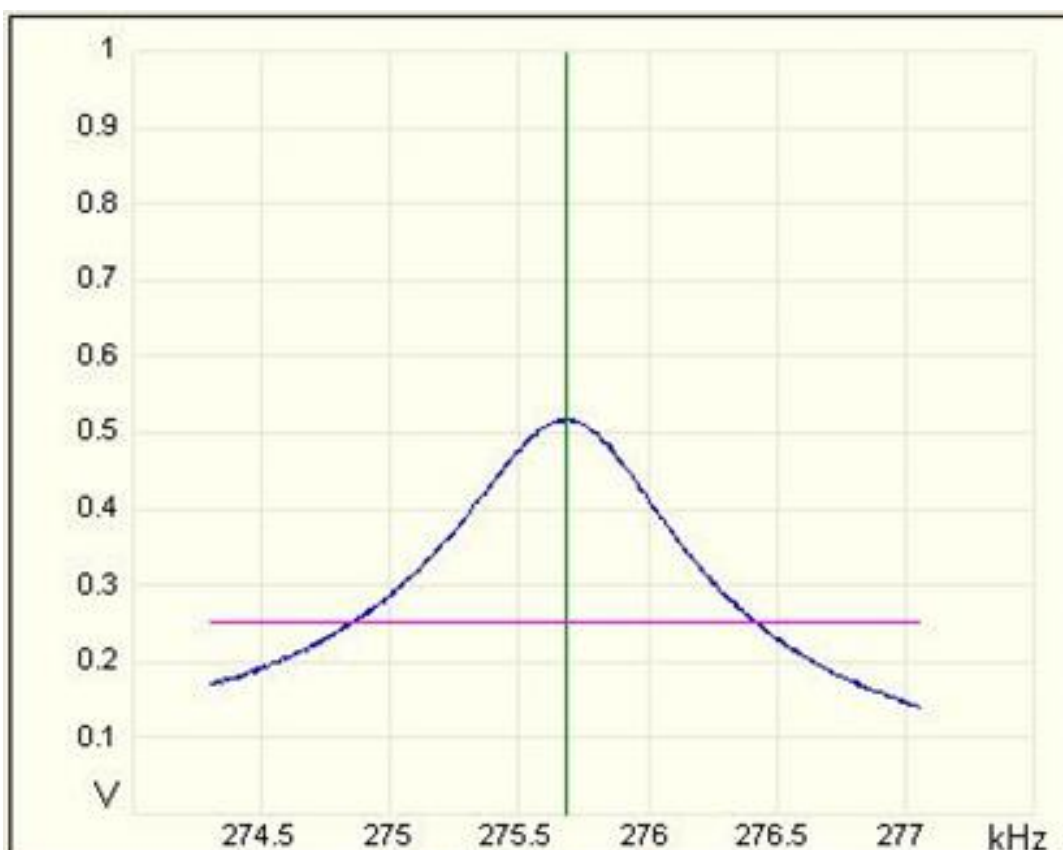
3.4 Análise de detecção de frequência

O AFM utiliza o modo dinâmico para leituras de superfícies em modo não contato (NC) ou *quasi non contact* (quasi-NC ou tapping® mode) e também para avaliar a condição de uso do μC antes e depois da varredura de uma amostra para geração de imagem. A alteração na frequência de ressonância do μC indica que ocorreu modificação na massa, o que se relaciona com a rigidez da haste (constante de mola (k) (N/m)) ou mesmo mudança de meio físico (mais ou menos denso), sendo assim, pode ter adsorvido material a ponta ou mesmo danificado a aresta (TIP). Quando ocorre qualquer variação permanente na frequência de ressonância original, o μC deve ser substituído, pois indica que a leitura da superfície poderá não ocorrer de forma adequada.

O AFM Dimension Veeco V é equipado com um conjunto de cerâmicas piezoelétricas responsáveis pela movimentação e excitação da haste do μC dentro de uma faixa de frequências definido pelo usuário. Por intermédio da reflexão do laser em um fotodetector, o equipamento encontra a frequência de ressonância e mantém a excitação nesta frequência. Por intermédio da análise gráfica do valor de amplitude,

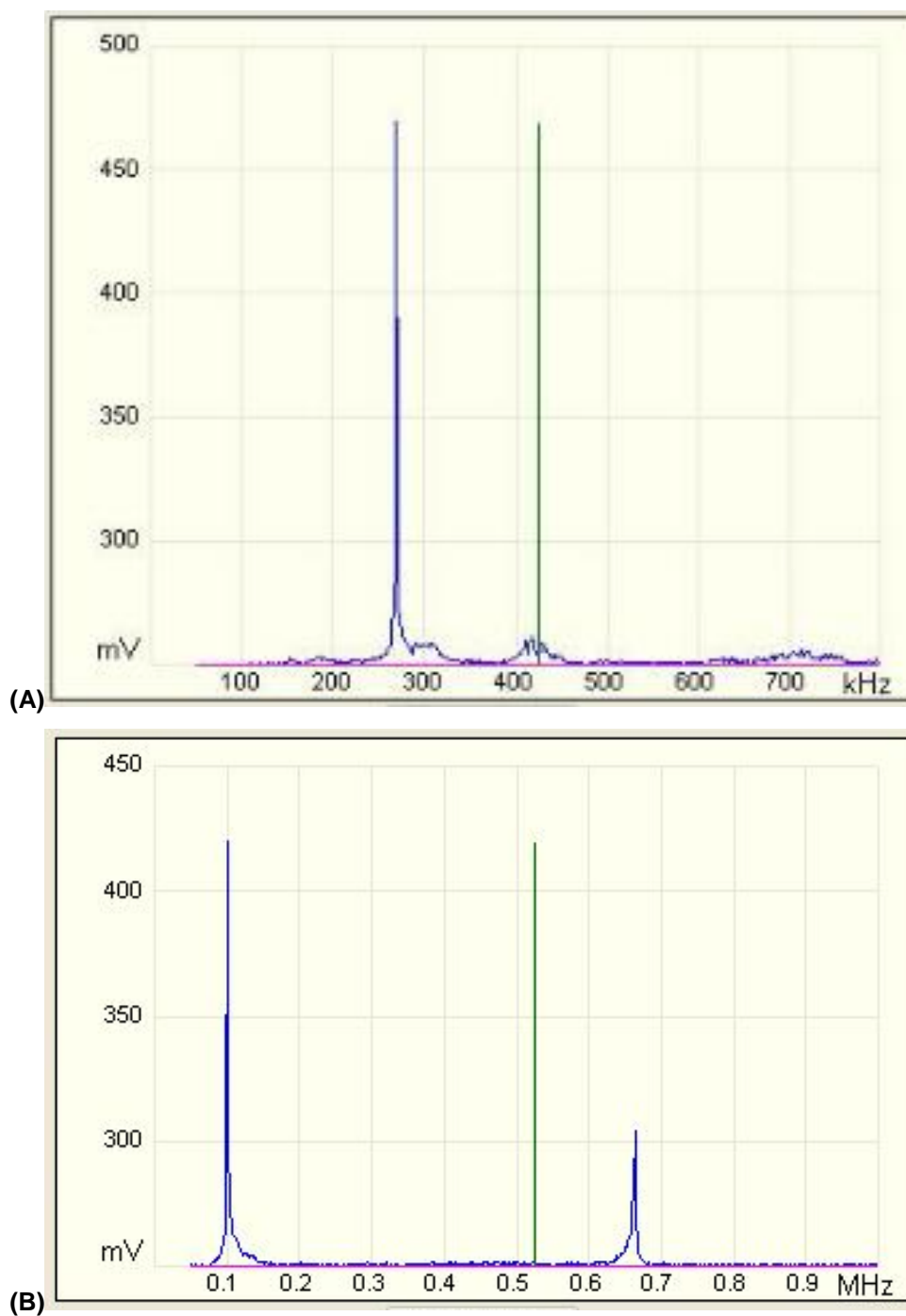
em volts (V) em relação a frequência (KHz) (Figura 22) é possível visualizar em tempo real qualquer alteração na resposta de frequência de ressonância. A cada varredura completa na faixa de frequências definido pelo usuário, o período de tempo para obter o valor corrente é em torno de 9 segundos para o Veeco V - Dimension.

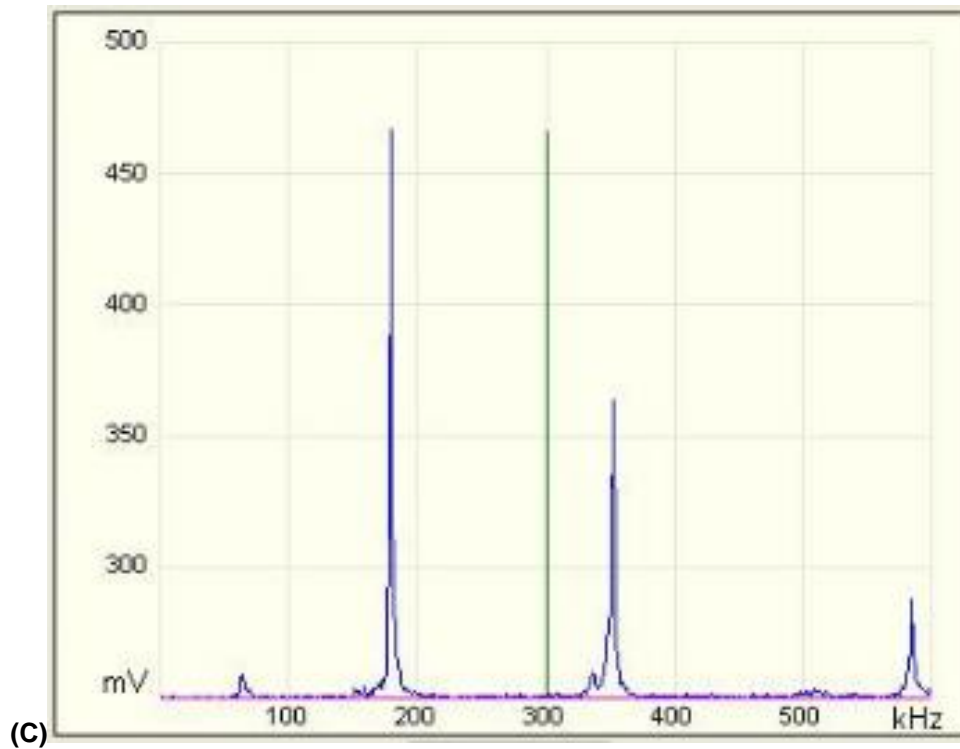
Figura 22 – Tela μ C Tune do software Nanoscope V, utilizada para verificar a frequência de ressonância para um microcantilever.



Microcantilevers novos com constante de mola k acima de 20,0 N/m e com comprimento de até 140,0 μ m, possuem uma frequência de ressonância acima de 100 KHz, geralmente apresentando um único e bem definido pico dentro da faixa de frequências (50 a 1000 KHz) como pode ser visualizado na Figura 23(A), modelo NSG10 Q=400 (3,1 a 37,6 N/m). No entanto, microcantilevers com constantes de mola baixas, tendem a formar mais de um pico de ressonância, Figura 23 (B), modelo NSG03 Q=359 (0,36 a 6,1 N/m) e microcantilevers para aplicação em modo contato com constantes de mola muito baixas (NanoWorld 38763f171497 Q=300 (0,001 a 0,1 N/m), (Figura 23(C)), formam naturalmente vários picos de ressonância, o que inviabiliza sua utilização para aplicações em modo dinâmico.

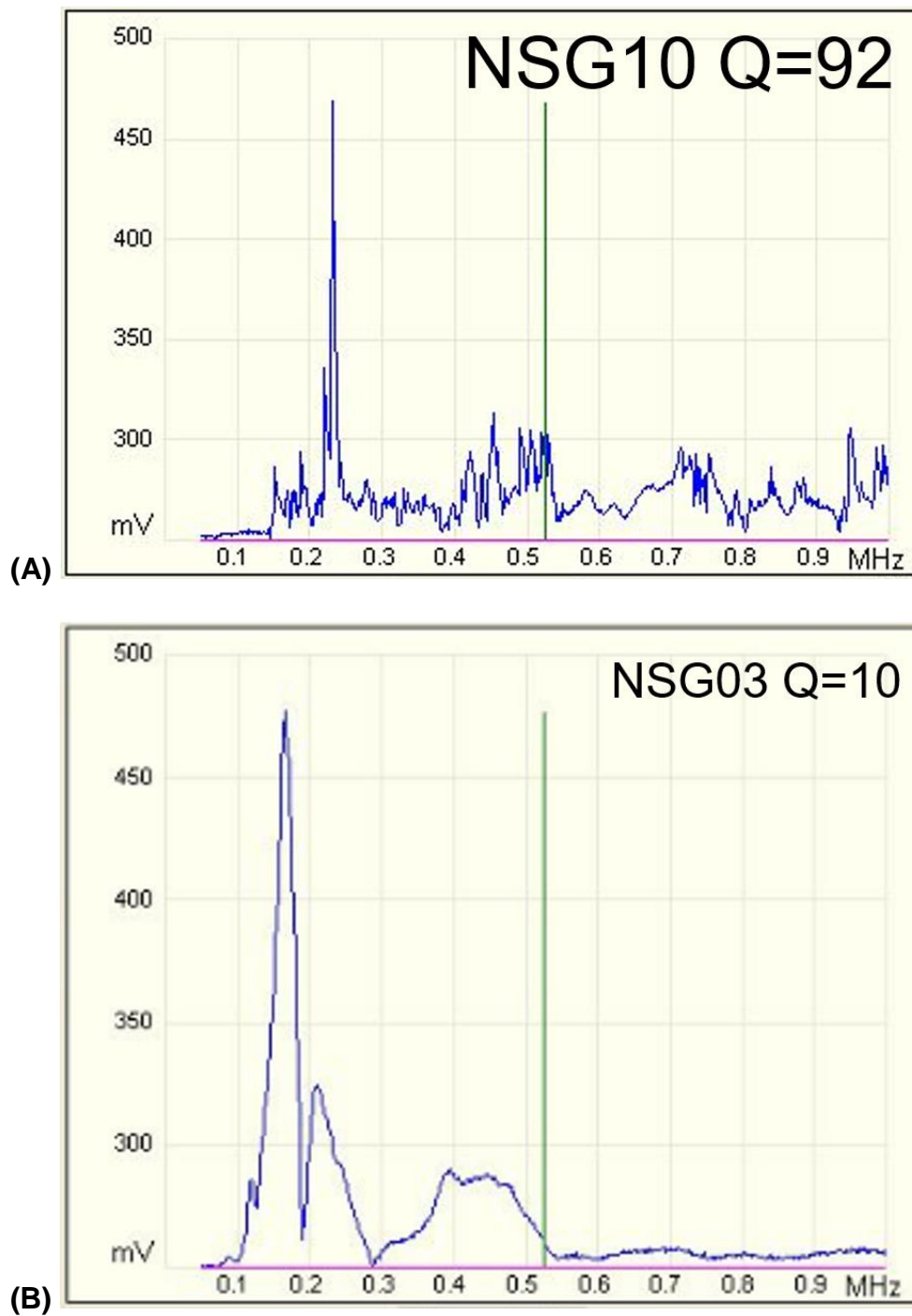
Figura 23 – Resposta de ressonância de μC na faixa de 50 a 1000MHz para os modelos (A) NT-MDT NSG10, (B) NT-MDT NSG03 e (C) NanoWorld 38763f171497.

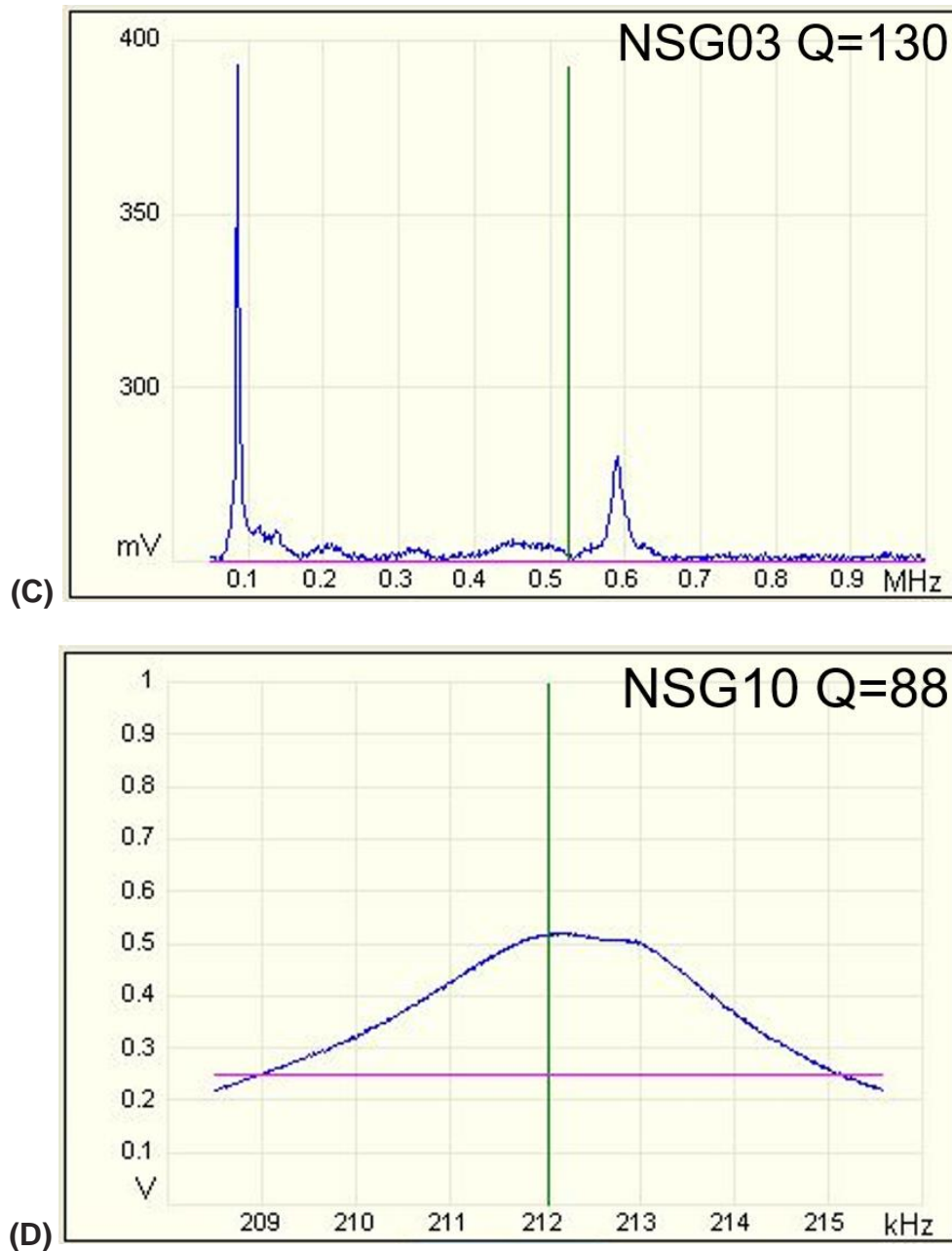




A aplicação de uma camada funcional bioativa gera um amortecimento na vibração da haste, reduzindo o fator de qualidade Q e fazendo com que aumente o erro de leitura da frequência de ressonância devido ao alargamento da curva de ressonância (Figura 24(D)). Quanto maior este amortecimento, múltiplos picos de ressonância podem aparecer (Figura 24 (A), (B) e (C)). Múltiplos picos de ressonância próximos não são desejáveis (Figura 24 (B)), pois ao se adsorver um analito alvo, a frequência de ressonância se altera podendo migrar de um pico para outro próximo, causando desvios na leitura.

Figura 24 – Resposta da frequência de ressonância para diferentes fatores Q. Nota-se que com valores de fator Q mais baixos, o espectro fica ruidoso e a ponta do pico deixa de ser aguda e tornando-se arredondada, diminuindo a acuracidade da leitura.





Diversos modelos de microcantilevers possuem recobrimento em uma das faces (Al, Au, entre outros), para melhorar a reflexão do laser no AFM. Entretanto, este recobrimento pode não ser compatível com o reagente a ser ligado. A funcionalização considerada ideal seria a realizada apenas na ponta da haste (TIP) a qual toca a superfície em uma leitura de imagem. Desta maneira, não haveria interferências nas características físicas do microcantilever. No entanto, dependendo das condições de trabalho (temperatura, umidade e pressão) somente o recobrimento da TIP não é suficiente para ter uma quantidade da camada bioativa adequada para detectar a variação da frequência de ressonância em modo dinâmico.

Todo revestimento, por ter uma determinada rigidez e por aumentar a espessura do microcantilever, pode atuar como um amortecedor alterando a eficiência da excitação exigindo mais energia para manter a vibração e pode alterar a frequência de vibração. Desta forma, o fator Q é reduzido e, por conseguinte, aumenta-se o erro de leitura.

Microcantilevers curtos da ordem de 10,0 a 50,0 μm conseguem uma resolução de picogramas em condições especiais (pressão efetiva negativa e baixas temperaturas), porém para operar em pressão atmosférica, temperatura de 25 °C e umidade relativa em torno de 50 %, estas condições geram um amortecimento significativo causando baixo fator Q.

Para melhores resultados de sensibilidade em biossensores operados em condições ambientes, são preferencialmente utilizados microcantilevers de alta frequência ((tapping®) acima de 100 KHz) com comprimento entre 90-140 μm . As condições físico-químicas do nitreto de silício (Si_3N_4) normalmente possibilitam condições mais favoráveis para realizar as ligações químicas com os reagentes que são utilizados para a formação de um biossensor. Desta maneira, a funcionalização fica uniforme em toda haste (ambos os lados) e com uma camada mais fina, permitindo operar com um fator Q maior (Q próximo ou acima de 100) e com erro de leitura abaixo de 0,06 %.

Microcantilevers com hastes de comprimentos superiores a 200 μm formam naturalmente vários picos de ressonância e com a funcionalização observamos que podem surgir novos picos. O amortecimento da haste reduz a amplitude de vibração dificultando a eficiência da excitação.

Fatores como temperatura, umidade, pressão e densidade do meio afetam diretamente o fator qualidade Q, principalmente em microcantilevers com recobrimento funcional.

3.5 Técnica de Espectroscopia de fotoelétrons excitados por raios-x (XPS)

Para caracterizar o processo de ativação foi utilizada a técnica de Espectroscopia de fotoelétrons excitados por raios X (XPS – do inglês: *X-ray*

Photoelectron Spectroscopy) em colaboração com o Prof. Renato Vitalino Gonçalves (IFSC/USP). Os espectros XPS permitem identificar quantitativamente, em profundidades da ordem de dezenas de nanômetros e com incerteza de fração centesimal de camada atômica, todos os elementos químicos na superfície da amostra, suas concentrações relativas, o ambiente químico dos elementos - seus estados de oxidação - e em casos específicos permite inclusive inferir a morfologia da superfície em análise.

Os espectros de XPS foram adquiridos utilizando um espectrômetro (ScientaOmicron) equipado com uma fonte de raios X monocromática (K-Alpha 1486,6 eV) e um analisador de elétrons do tipo hemisférico, com alta resolução equipado com 125 canais individuais de detecção. Durante as medidas a pressão da câmara de análise foi de 2×10^{-9} mbar e os espectros foram registrados com uma energia de 50 eV. As posições dos picos nos espectros foram corrigidas em relação à energia de ligação do pico do carbono (C1s) fixado em 284,8 eV. Os dados foram tratados utilizando o software CasaXPS (Casa Software Ltd., UK).

3.6 Teste de Seletividade do biossensor

Para testar a seletividade do biossensor, vários compostos orgânicos voláteis (VOCs) foram testados (Tabela 2), organizados por ordem de polaridade relativa. Esses compostos foram utilizados com a mesma concentração calculada pela razão entre o número de moléculas do VOC em relação a quantidade de moléculas de ar disponíveis em um reservatório de 2,0 L utilizado no experimento (Equação 9).

Tabela 2 – VOCs organizados por ordem de Polaridade Relativa

	Massa Molar MW (g/mol)	Densidade ρ (g/L)	Pressão Vapor (KPa) a 20°C	Polaridade Relativa
Metanol	32,04	791,4	12,8	0,762
Etanol	46,07	789,0	5,9	0,654
Propanol	60,10	786,0	4,4	0,546
Acetona	58,08	790,0	24,0	0,355
Diclorometano	84,93	1326,6	7,9	0,327
Tolueno	92,14	870,0	2,9	0,099
Hexano	86,10	654,8	16,0	0,009

Por intermédio da razão entre a quantidade de moléculas de VOC com a quantidade de moléculas do ar em um reservatório de capacidade conhecida, é possível estimar a concentração em ppm do VOC, lembrando que a parte de baixo da equação para ppm deve ser sempre 10^6 .

Equação 9

$$Y_i(\text{ppm}) = \frac{V_{\text{voc}} * \rho(\text{voc}) * \frac{R * T}{P * V(\text{camara})}}{MW(\text{voc})} \quad [9]$$

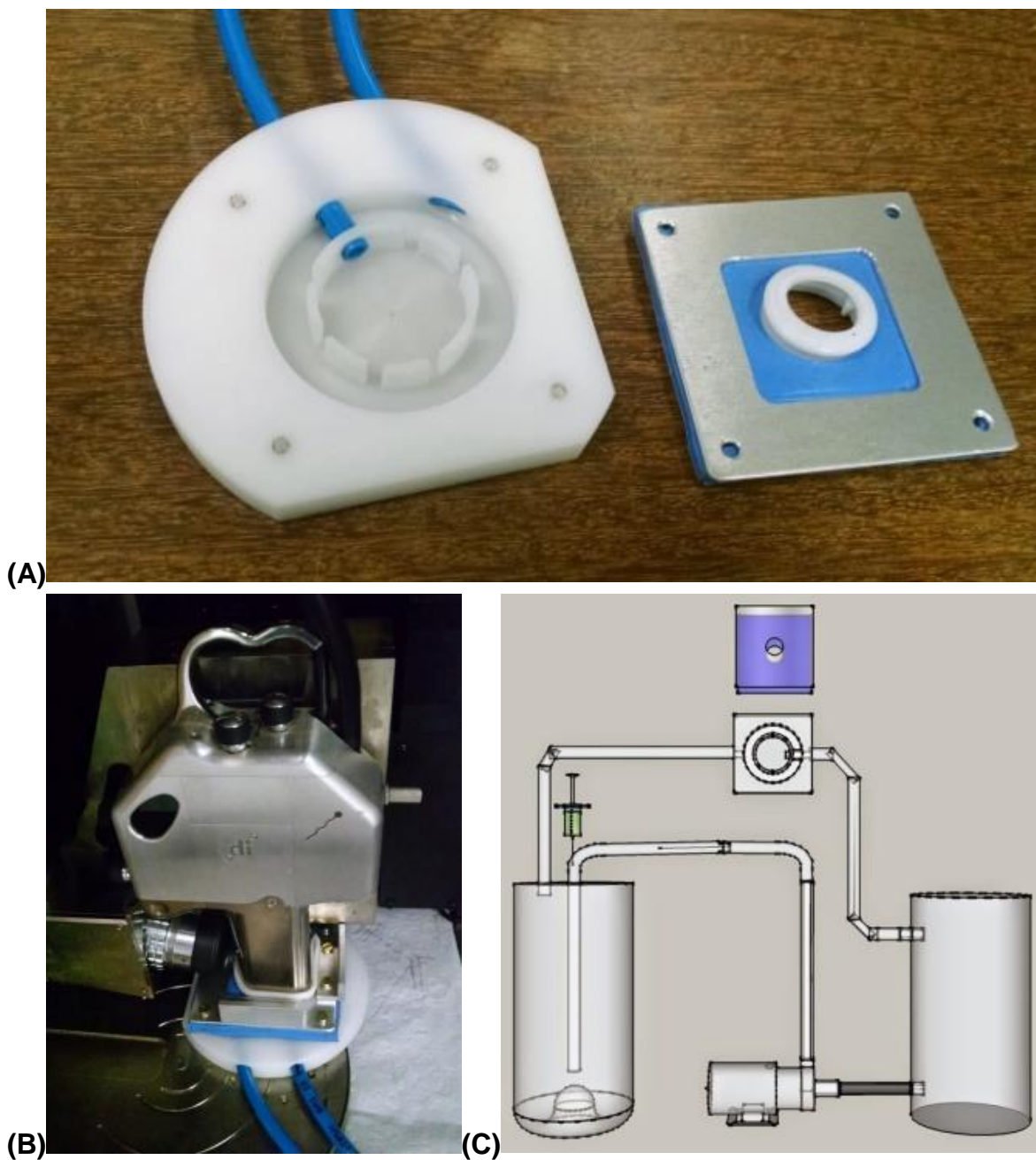
Na Equação 9, V_{voc} (L) é o volume do volátil, $\rho(\text{voc})$ (g/L) é a densidade do VOC, $R = 0,0820574587$ ($\text{L} * \text{atm} * \text{K}^{-1} * \text{mol}^{-1}$) é a constante dos gases, T (K) é a temperatura local em Kelvin, $MW(\text{voc})$ (g/mol) é a massa molar, P (atm) pressão atmosférica local e $V(\text{câmara})$ (L) volume total da câmara para diluição.

Tabela 3 – Concentração de diferentes VOCs para um reservatório de 2L de ar.

	Yi(ppm) p/ 5µL em reservat. 2L	Vvoc (L) p/ 1000ppm	Vvoc (µL) 1000ppm	Vvoc (µL) 230000ppm
Metanol	1635,147	3,057E-06	3,057	703,300
Etanol	1133,736	4,410E-06	4,410	1014,345
Propanol	865,767	5,775E-06	5,775	1328,300
Acetona	900,437	5,552E-06	5,552	1277,156
Diclorometano	1034,027	4,835E-06	4,835	1112,155
Tolueno	625,063	7,999E-06	7,999	1839,812
Hexano	503,452	9,931E-06	9,931	2284,225

Por intermédio do gráfico da Figura 44, foi possível determinar que o biossensor até a concentração de 1000 ppm (0,3 mL/L) de etanol, sofreu uma redução na frequência de ressonância e o ponto de saturação, onde ocorre a máxima frequência de ressonância, foi registrado na concentração de 230.000 ppm (2,2 mL/L) (Tabela 3). Devido à concentração em ppm do VOC, foi necessário a criação de um sistema fechado com circulação de gás (Figura 25(C)) para que a diluição do VOC ocorresse. Para tanto foi construído um circuito de gás fechado com capacidade total de 2,0 L, com uma cela (Figura 25(A)) desenvolvida especialmente para se encaixar na ponta do *scanner* do AFM (Figura 25(B)). Tal processo foi realizado de forma a não causar alterações na frequência de ressonância e permitir a diluição controlada os VOCs. Dessa maneira, foi possível analisar a frequência de ressonância para cada situação e gerar os gráficos apropriadamente (Figura 44 e Figura 45).

Figura 25 – (A) Cella, (B) Scanner do AFM com a Cella em sua posição e em (C) Sistema circulatório de gás fechado para a diluição controlada dos VOCs, composto de 2 abafadores, bomba e Cella.

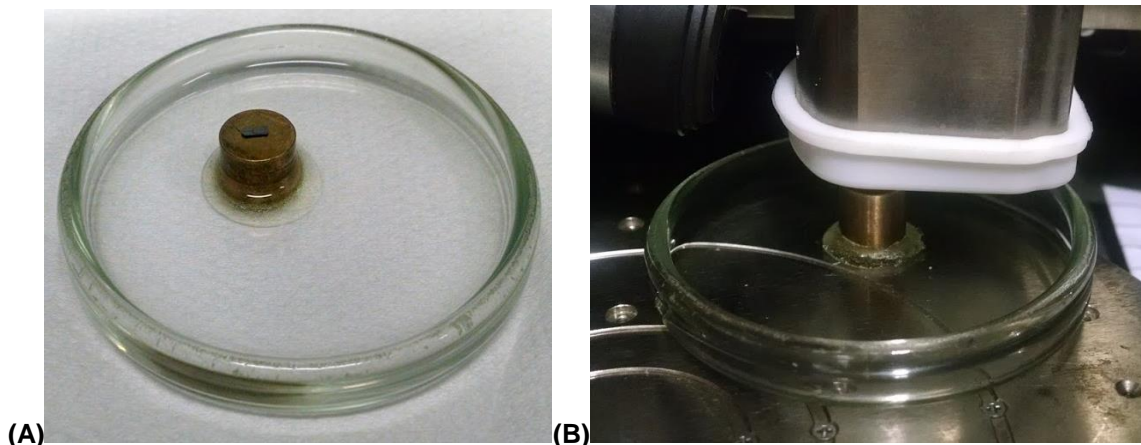


3.6.1 Método para obtenção da imagem topográfica com e sem a interação com vapor de etanol

Para a obtenção da imagem topográfica com e sem o vapor de etanol, foi necessário desenvolver o aparato da Figura 26, de modo que o etanol é inserido no interior do recipiente sem interromper a leitura no AFM. Foram inseridos 15,0 mL de

etanol 200 proof (Sigma) até a distancia de 1,0 mm da amostra (Figura 26 (B)). Este dispositivo permitiu fazer a leitura da imagem adicionando o analito alvo e evaporando em tempo real.

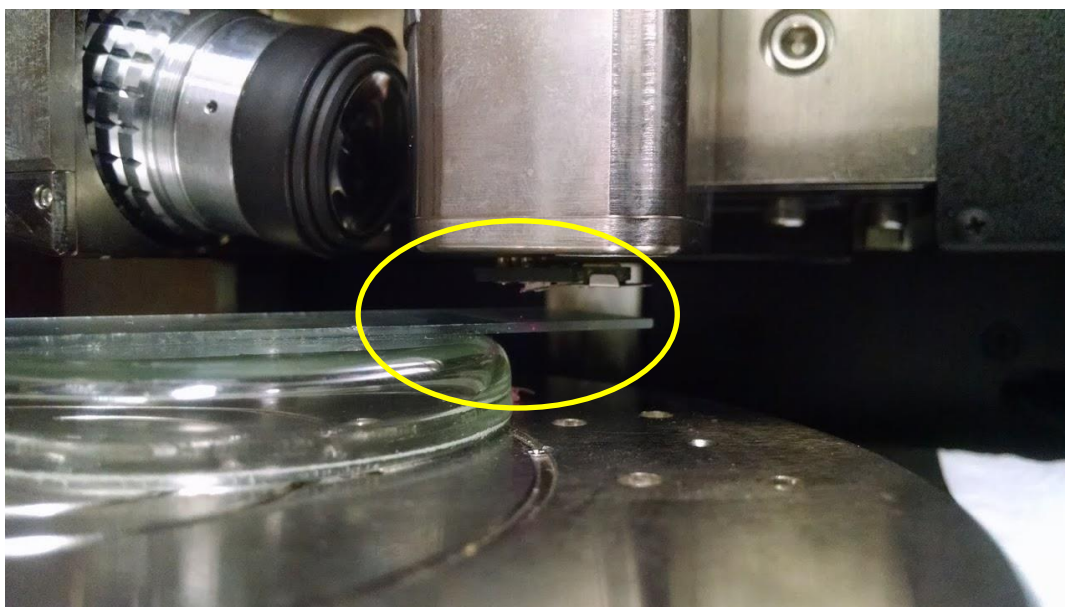
Figura 26 – Em (A) porta amostra com a amostra no topo do bloco de cobre com capacidade de 15mL e em (B) realização da leitura da amostra.



3.6.2 Método rápido para checar a atividade e sensibilidade do biossensor

Para testar a atividade e sensibilidade do biossensor, foi desenvolvido um aparato para depositar o analito alvo diretamente próximo ao biossensor de maneira que o vapor sature o biossensor obtendo uma forte interação (Figura 27).

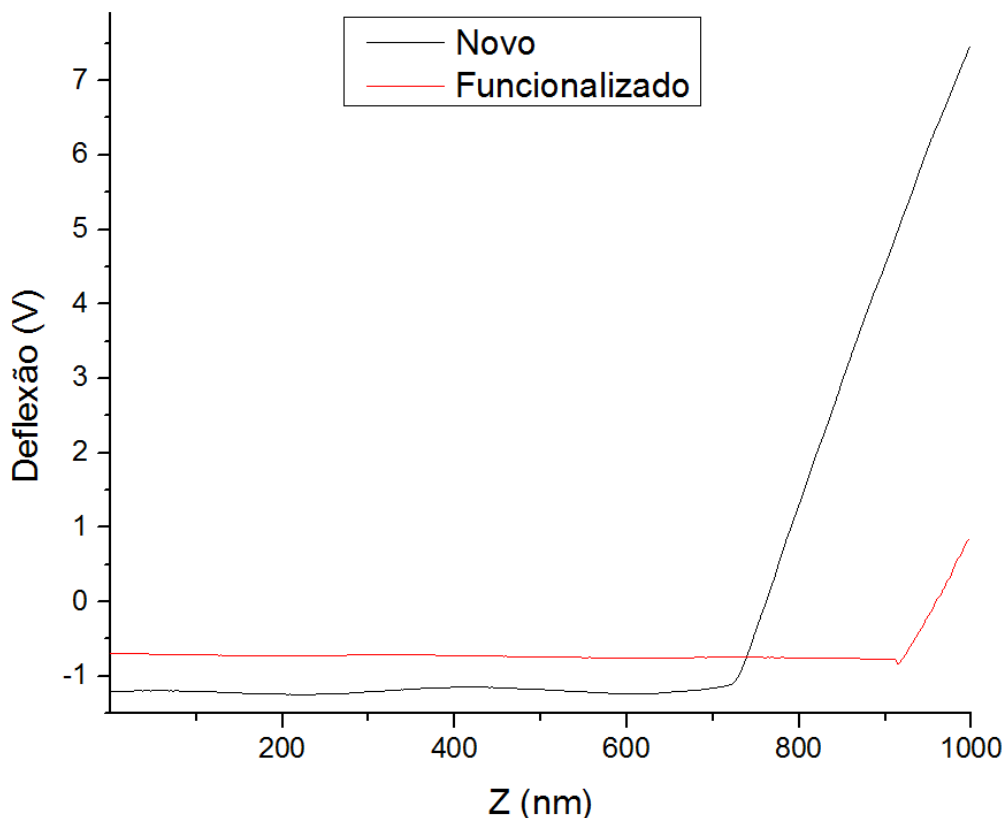
Figura 27 – Lâmina de vidro contendo 10 μ L de etanol inserida a 5mm do microcantilever (elipse em amarelo). A gota se evapora completamente em 5 minutos, o vapor chega ao biossensor em uma concentração elevada e vai reduzindo até o etanol ser totalmente evaporado e carregado para fora do sistema.



3.6.3 Método para analisar a deflexão de um microcantilever em modo estático

Por intermédio do modo estático é possível calcular a deflexão de um microcantilever, através do laser que é refletido em sua extremidade direcionado ao fotodetector. Para tanto, é necessário aproximar a ponta do μC em uma superfície dura, como vidro ou silício e realizar uma curva de força (Ramp Mode) que é um recurso disponível no software Nanoscope V. O equipamento irá pressionar a ponta do μC na superfície e coletar as informações da deflexão versus o deslocamento no eixo Z, demonstrando também a interação da ponta com a região de contato (Figura 28), onde a região horizontal no gráfico significa à aproximação da ponta do μC a superfície e a região vertical o contato e deformação, onde se obtém o deslocamento em Z pela deflexão (V) (BRUKER, 2009). A deflexão do μC varia de acordo com o comprimento (l) e constante de mola (k). Realizada a curva de força, o software determina a sensibilidade da deflexão do microcantilever, estabelecendo o deslocamento da ponta em nm/V.

Figura 28 – Ensaio de curva de força para determinar a deflexão do μC cuja sensibilidade é determinada em [nm/V].



No gráfico (Figura 28), foi realizado o ensaio de curva de força de um μC modelo TAP300 novo e depois funcionalizado, considerando a porção vertical, a inclinação do μC novo foi de 89,915 graus o que rendeu um deslocamento de 79,47 nm/V e para o mesmo μC funcionalizado em monocamadas auto-organizadas (SAM), foi de 89,878 graus, isto é 79,46 nm/V, portanto a funcionalização em SAM com a metodologia e reagentes utilizados neste trabalho praticamente não influenciou na rigidez do microcantilever.

Capítulo 4

RESULTADOS E DISCUSSÕES

Para cada metodologia de construção do biossensor, foram medidas as respostas em função da variação da frequência de ressonância nas mesmas condições de temperatura, umidade e pressão utilizando os mesmos reagentes.

4.1 Caracterização da Ativação

Foram preparados seis microcantilevers sendo três de Si (100) e três de Si₃N₄ para análise em XPS como se segue:

Amostra 1 Si: Tratamento por 30 minutos em solução Piranha (70% H₂SO₄ + 30% H₂O₂), lavado com H₂O milli-Q.

Amostra 2 Si: Tratamento por 30 minutos em solução Piranha (70% H₂SO₄ + 30 % H₂O₂), lavado com H₂O milli-Q, seguido de imersão de 20 minutos em solução de 2 % APTES em tolueno, lavado com tolueno e seco por 20 minutos em estufa a 100 °C.

Amostra 3 Si: Tratamento por 30 minutos em solução Piranha (70% H₂SO₄ + 30% H₂O₂), lavado com H₂O milli-Q, seguido de vaporização de 40,0 µL de APTES + 40,0 µL de Trietilamina por 1h em dessecador purgado com Nitrogênio.

Amostra 4 Si₃N₄: Tratamento por 5 minutos em solução Piranha (70% H₂SO₄ + 30% H₂O₂), lavado com H₂O milli-Q.

Amostra 5 Si₃N₄: Tratamento por 5 minutos em solução Piranha (70% H₂SO₄ + 30% H₂O₂), lavado com H₂O milli-Q, seguido de imersão de 20 minutos em solução de 2 % APTES em tolueno, lavado com tolueno e seco por 20 minutos em estufa a 100 °C.

Amostra 6 Si₃N₄: Tratamento por 5 minutos em solução Piranha (70% H₂SO₄ + 30% H₂O₂), lavado com H₂O milli-Q, seguido de vaporização de 40,0 µL de APTES + 40,0 µL de Trietilamina por 1h em dessecador purgado com Nitrogênio.

A Figura 29, ilustra os espectros de XPS completos para cada um dos seis microcantilevers e nos picos estão identificados os elementos químicos presentes nas amostras e a configuração eletrônica. A primeira linha que contém as amostras 1 e 4 exibem o espectro XPS para o tratamento com solução Piranha, a segunda linha (amostras 2 e 5) exibe o espectro para a ativação de APTES por imersão e a terceira linha (amostras 3 e 6) a ativação de APTES pelo processo de vaporização.

A composição química das amostras após o processo de ativação foi determinada pela técnica de Espectroscopia de Fotoelétrons Excitados por Raios X (XPS – do inglês: *X-ray Photoelectron Spectroscopy*). A caracterização geral da superfície química das amostras foi realizada por intermédio de espectros “survey” de XPS medidos no intervalo de energia entre 0 a 800 eV.

A Figura 29 apresenta os espectros “survey” de XPS para cada uma das amostras (1, 2, 3, 4, 5 e 6) tratadas por diferentes métodos, como descrito anteriormente. Todas as amostras apresentam na superfície Si 2p, C 1s e O 1s. A presença de Si 2p próximo à 100 eV era esperado em todas as amostras, uma vez que os substratos utilizados foram microcantilevers de Si e Si₃O₄, TAP300G (Si-100) e HA_NC (Si₃N₄), respectivamente. Em todas as 6 amostras foi possível observar um pico próximo a 285 eV que é associado a carbono (C 1s). O carbono presente nas amostras pode ser devido a funcionalização com APTES, ou pela exposição das amostras na atmosfera (CHONG; ZHAO, 2003). É bem conhecido na literatura que a exposição de amostras em atmosfera ambiente pode levar a formação de uma fina camada (~2 nm) de material rico em carbono na superfície, conhecido como carbono adventício, que a técnica de XPS facilmente detecta (BARR; SEAL, 1995). A Figura 29 (A e B) mostram os espectros “survey” dos microcantilevers Si e Si₃N₄ tratados em solução Piranha (como descrito na seção experimental). Ambos os espectros

apresentam um pico intenso de O 1s, que pode ser atribuído a passivação de uma camada de óxido de SiO₂ na superfície causado pela solução Piranha. Era esperado observar no espectro “survey” de XPS do μ C de Si₃N₄ (Figura 29 (B)) um forte sinal de N 1s proveniente do Si₃N₄, e um fraco sinal de O 1s. No entanto, observamos o oposto, ou seja, um forte sinal de O 1s e nenhum sinal de N 1s. Esse resultado confirma que sobre a superfície do μ C houve à formação de uma espessa camada de SiO₂ devido ao tratamento em solução piranha.

Os espectros de XPS “survey” das amostras dos μ C de Si e Si₃N₄ tratadas com APTES pelos métodos de solução e vapor apresentaram resultados significativos em relação à superfície química das amostras. A Tabela 4 mostra os resultados das concentrações de silício (Si 2p), carbono (C 1s), nitrogênio (N 1s), oxigênio (O 1s) e (I 3d) de todas as amostras obtidas pelo espectro “survey”.

Como pode ser visto na Tabela 4, a composição química da superfície das amostras 2 e 5, microcantilevers de Si e Si₃N₄, respectivamente, são semelhantes, sugerindo que o método de funcionalização de APTES por solução teve uma boa reprodutibilidade para ambos os substratos. A presença de um pico bem definido em 399,5 eV é associado ao nitrogênio (N 1s), (CHONG; ZHAO, 2003), sugerindo que a superfície do μ C de Si (amostra 2) foi funcionalizada com APTES, uma vez que a única fonte de N no sistema vem do grupo amina do APTES, o que está de bom acordo com a literatura (CHONG; ZHAO, 2003). Por outro lado, a presença do N 1s na superfície do μ C de Si₃N₄ pode ser devido ao substrato (Si₃N₄). No entanto, como foi mostrado na Figura 29 (B), após o tratamento em solução Piranha, o μ C de Si₃N₄ sofreu uma passivação de SiO₂ na superfície, de tal forma que não foi possível ver a presença de N 1s. De fato, como pode ser visto na Tabela 4, as concentrações de N 1s são muito próximas nas amostras 2 e 5, que foram de 3,44 % e 4,11 %, respectivamente, o que suporta a nossa hipótese. Esse resultado mostra que ambas as amostras (2 e 5) foram funcionalizadas com APTES.

A Figura 29 (E e F) mostram os resultados de XPS “survey” para as amostras tratadas com APTES utilizando o método de vapor. O perfil do espectro da amostra 3 (APTES método de vapor) assemelha-se ao da amostra 1 (sem APTES, mas tratado em solução Piranha). A diferença visível nessas duas amostras é que na amostra ativada com APTES pelo método de vapor (amostra 3) apresenta um pico em 399,5 eV, que é associado ao N 1s. A presença de N 1s nessa amostra sugere que a superfície do μ C foi ativada com APTES pelo método de vapor. A Figura 29 (F) mostra

o espectro de “survey” de XPS da amostra 6, que também foi funcionalizada pelo método de vapor. O espectro da amostra 6 é muito semelhante ao da amostra 4 (Figura 29 (B)). Semelhantemente ao que já foi discutido para as amostras 1 e 3, e aqui podemos ver que a diferença nesses espectros é devido a presença do N 1s em 399,5 eV, o que sugere que a amostra foi funcionalizada com APTES. Era de se esperar que nessa amostra houvesse um forte pico de N 1s devido ao substrato ser de Si₃N₄. No entanto, como já foi discutido, o tratamento com solução Piranha levou a formação de uma camada de SiO₂ na superfície dos microcantilevers, o que pode ser visto pelo intenso pico de O 1s e Si 2p.

De forma geral, foi possível observar que o pico de N 1s para as amostras preparadas pelo método de solução sempre foi mais intenso quando comparado pelo método de vapor. A Tabela 4 resume as concentrações de N 1s quantificadas pelos espectros de “survey” de cada uma das amostras. As amostras preparadas pelo método de solução, amostras 2 e 5, apresentam uma concentração de 3,44 % e 4,11 % de N 1s, respectivamente, enquanto que as amostras preparadas pelo método de vapor, amostras 3 e 6, apresentam uma concentração de N 1s de 1,55 % e 1,75, respectivamente. Olhando para a concentração de N 1s na superfície das amostras obtidas por XPS, podemos inferir que o método de solução formou uma camada ativada de APTES mais espessa na superfície dos μ C do que quando foi usado o método de vapor (Figura 30).

Além do N 1s indicar que o método de solução levou a formação de uma camada mais espessa de APTES na superfície das amostras, o carbono é outro elemento abundante no APTES (C₉H₂₃NO₃Si) que pode ser um indicador nas amostras. No entanto, não podemos negligenciar que o carbono presente nessas amostras pode ter vindo da combinação de duas fontes, C 1s adventício (ar atmosférico) e APTES. No entanto, devido as amostras terem passado pelo mesmo processo de tratamento em solução Piranha e ter o mesmo período de tempo de exposição ao ar atmosférico, acreditamos que a concentração de C 1s adventício foi igual para todas as amostras. É possível ver nas Figura 29 (C e D) (amostras tratadas pelo método de solução), amostras 2 e 5, respectivamente, que o pico associado ao C 1s (~285 eV) é mais intenso quando comparado com as amostras tratadas pelo método de vapor, Figura 29 (D e F), amostras 3 e 6, respectivamente. De fato, a Tabela 4 mostra que os percentuais atômicos de C 1s são de 69,20 %, 65,15 %, 34,56 % e 27,65 % para as amostras 2, 5, 3 e 6, respectivamente. Dessa forma, olhando

para o carbono presente na superfície das amostras, podemos inferir que o método de solução ativou a superfície das amostras com uma camada mais espessa de APTES. Assim, podemos concluir que a técnica de XPS é uma ferramenta poderosa para indicar a ativação por APTES em superfície de microcantilevers de Si e Si₃N₄.

Tabela 4 – Porcentagem dos componentes em cada amostra

Amostra	O 1s (%)	C 1s (%)	Si 1s (%)	N 1s (%)	I (%)
1	23,79	28,60	47,61	-	-
2	14,91	69,20	12,38	3,44	0,06
3	22,43	34,56	40,85	1,55	0,61
4	39,45	28,43	32,12	-	-
5	16,10	65,15	14,55	4,11	0,10
6	35,67	27,65	34,44	1,75	0,5

Figura 29 – Em amostras 1 e 4 de Si e Si₃N₄ após 30 min e 5 min em solução Piranha, 2 e 5 ativações com tratamento por 20min em solução de APTES a 2% em tolueno e em 3 e 6 ativações com tratamento em vapor de APTES com trietilamina por 1h.

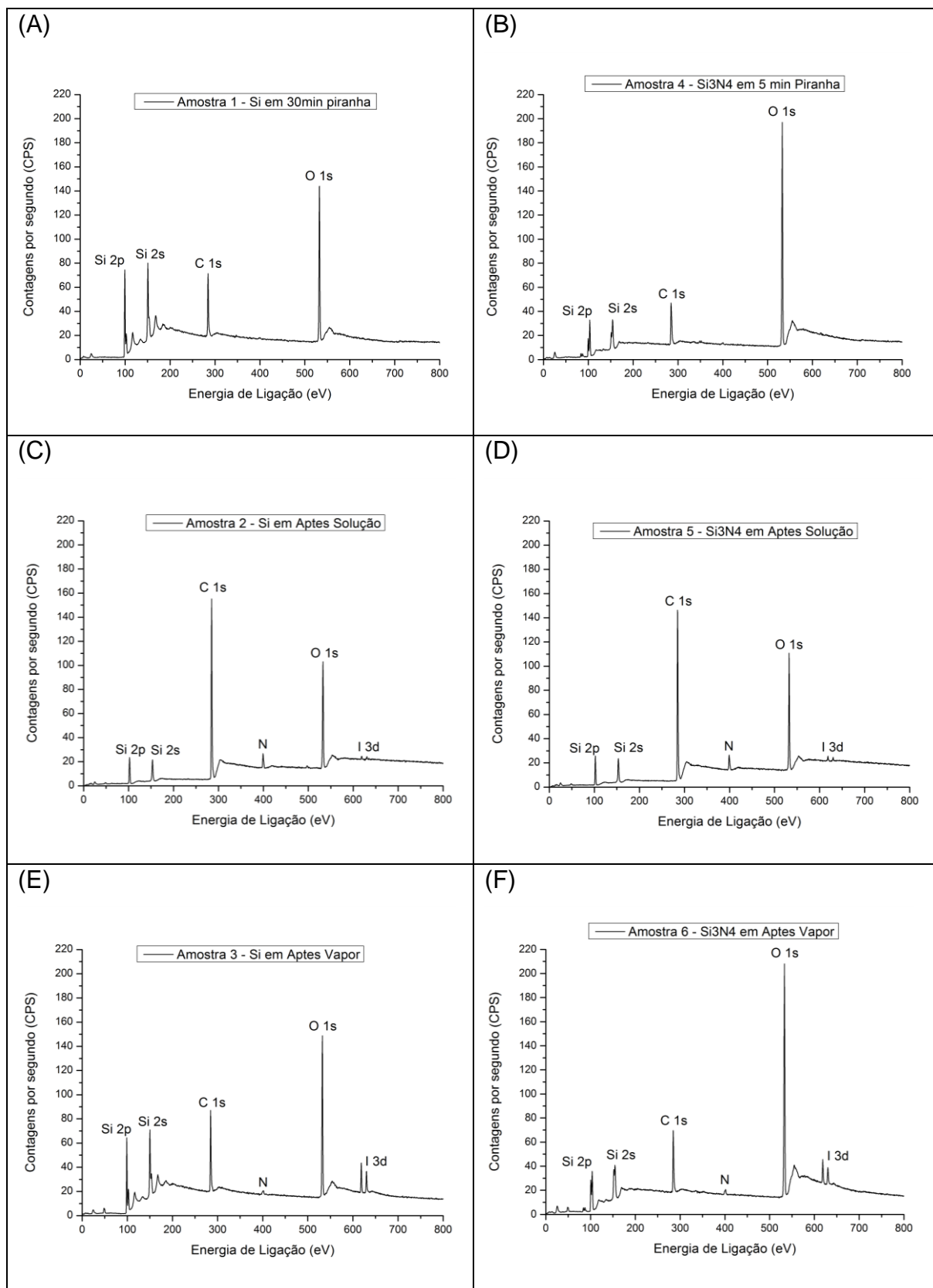
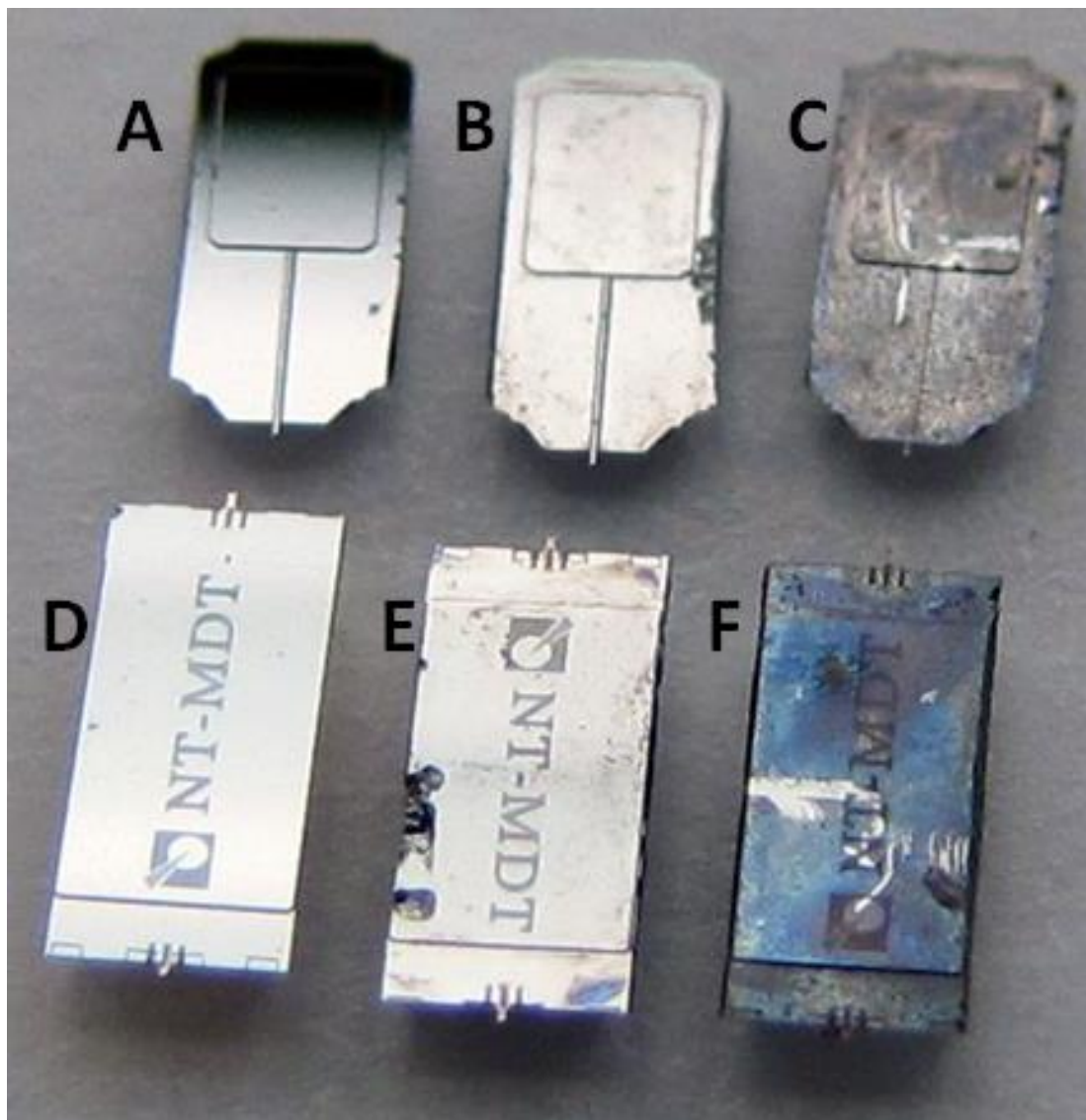


Figura 30 – Em (A) Microcantilever novo, modelo TAP300G de silício (100), (B) TAP300G funcionalizado por vapor de APTES e em (C) TAP300G funcionalizado por imersão em solução de APTES, (D) Microcantilever novo, modelo HA_NC de nitreto de silício Si_3N_4 , (E) HA_NC funcionalizado por vapor de APTES e em (F) HA_NC funcionalizado por imersão em solução de APTES.

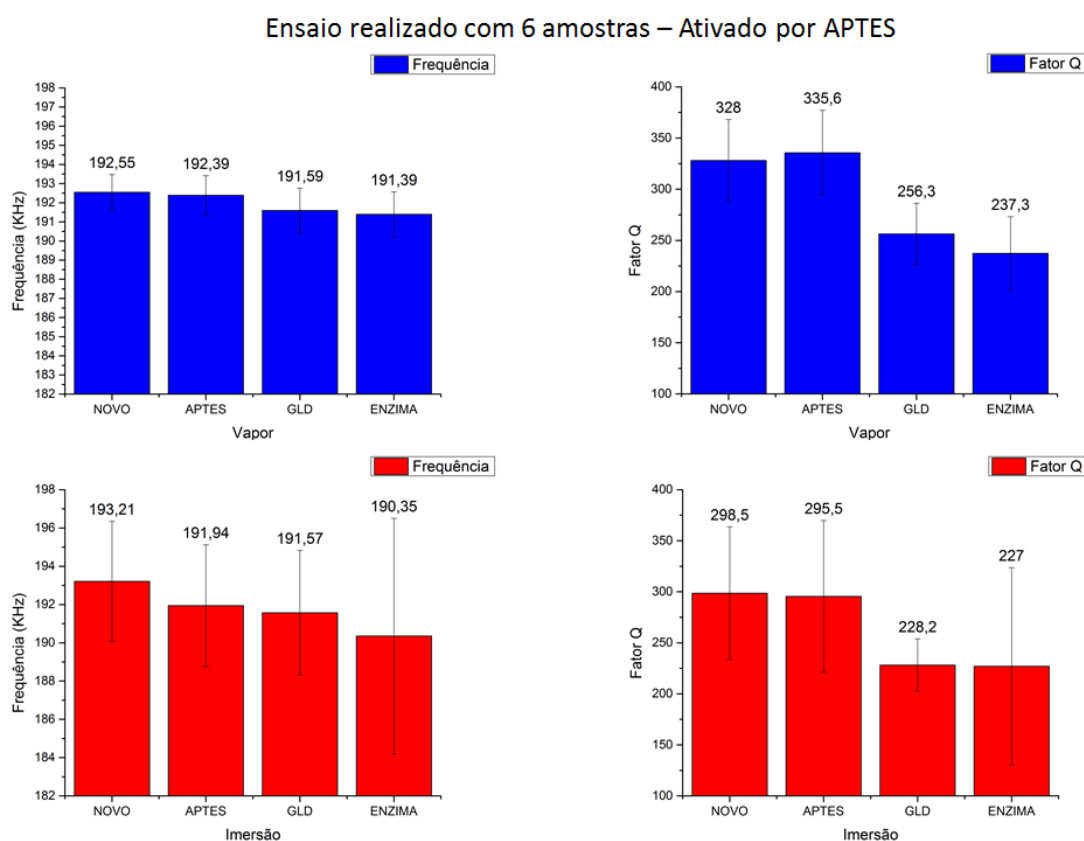


4.2 Funcionalização dos microcantilevers

Na Figura 31, são comparados a mudança na frequência de ressonância e fator qualidade (Q) para cada passo da construção do biossensor, todos os microcantilevers foram previamente tratados termicamente a 500 °C por 4 h. Na primeira linha (em azul) são apresentados os resultados obtidos pela ativação com

APTES pela técnica de vaporização e em vermelho, os resultados obtidos pela ativação com APTES pela técnica de imersão.

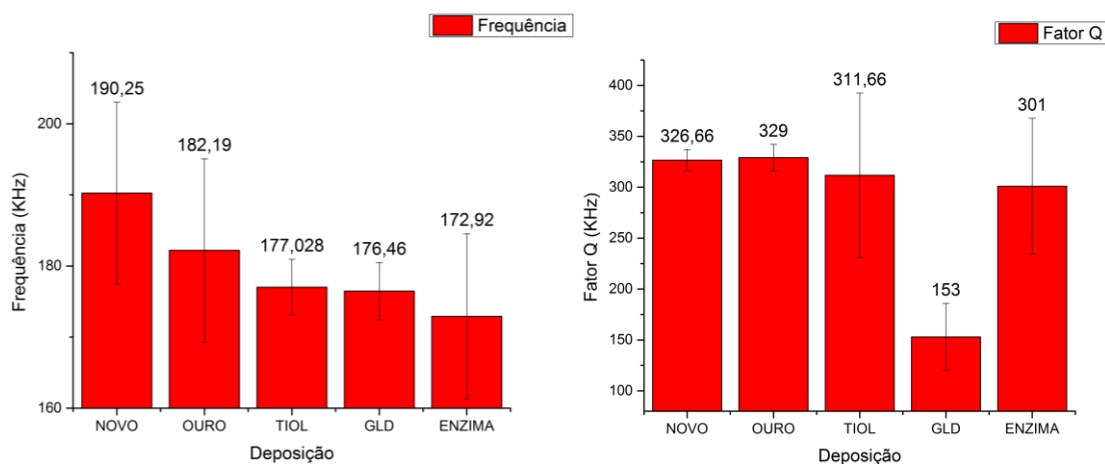
Figura 31 – Variação da frequência de ressonância para cada passo do processo de funcionalização. A diminuição da frequência de ressonância indica o aumento de massa na superfície da haste do microcantilever.



Comparando-se os gráficos da Figura 31, foi possível inferir que a ativação por imersão resultou em uma camada espessa de APTES devido à grande redução na frequência de ressonância indicando aumento de massa. Conforme demonstrado por Acres (ACRES et al., 2012), a ativação por APTES em imersão pode gerar camadas cruzadas em que apenas 3/5 de suas moléculas se ligam no μC de forma a disponibilizar os terminais amina para ligações com outros reagentes. A maior espessura da camada funcional e pelo fato de que os microcantilevers apresentam pequenas diferenças geométricas elevam o erro (desvio padrão) observado, devido a variação na espessura. O glutaraldeído (GLD), apesar de seu tamanho reduzido (3\AA) tem grande poder de amortecimento do microcantilever, reduzindo drasticamente o fator qualidade (Q).

Na Figura 32, é comparado à mudança na frequência de ressonância e fator qualidade (Q) para cada passo da construção do biossensor obtidos pela ativação com TIOL pela técnica de imersão.

Figura 32 – Variação da frequência de ressonância e fator Q a cada passo do processo de funcionalização com ativação de TiOL.



Foi observado que tanto pelo método de ativação com APTES por imersão e por TIOL, devido à camada funcional espessa, as barras de desvio padrão aumentam consideravelmente, evidenciando a dificuldade em controlar o processo para obtenção de biossensores com as mesmas características de sensibilidade e resposta à variações ambientais.

4.2.1 Tensão superficial – Medidas de Deflexão (modo estático)

A tensão superficial foi observada utilizando a técnica de modo estático, do AFM, e o sistema de detecção monitorou a deflexão do μC modelo CSG01 funcionalizado por meio de ativação com TIOL. Esse modelo possui uma haste mais longa, baixa constante de mola e apresenta na face refletora uma camada de ouro sendo na parte de baixo somente silício. Devido ao TIOL ligar-se somente na porção contendo ouro, garantiu-se dessa forma que a funcionalização ocorresse somente na face refletora, possibilitando assim determinar a direção da tensão superficial. Utilizando a técnica de rampa de força no AFM, foi possível mensurar o deslocamento da ponta do microcantilever. A constante de mola e sensibilidade de deslocamento obtida para o μC sem funcionalização foi de 0,07 N/m e 109,02 nm/V, respectivamente. Para esse ensaio, foi aplicado 10,0 μL de etanol em uma lâmina posicionada a 5 mm do biossensor. Neste caso, observou-se uma expansão da superfície com a presença do vapor de etanol, constatada pela deflexão vertical de 984,45 nm, ou tensão superficial de 458 mJ/m^2 calculado por intermédio da Equação

8, indicando que a ponta do μC curvou-se para baixo (Figura 33 (B)) resultado de uma tensão de expansão.

Na Tabela 5, são comparados a resposta em deflexão (nm) para diferentes voláteis.

Figura 33 – Ensaio em modo estático para determinação da tensão superficial de expansão ou de tração. Em (A) o biossensor encontra-se em repouso e em (B) o biossensor foi exposto ao analito alvo. O deslocamento do ponto vermelho para baixo indica que o μC curvou-se para baixo, resultando em tensão expansiva.

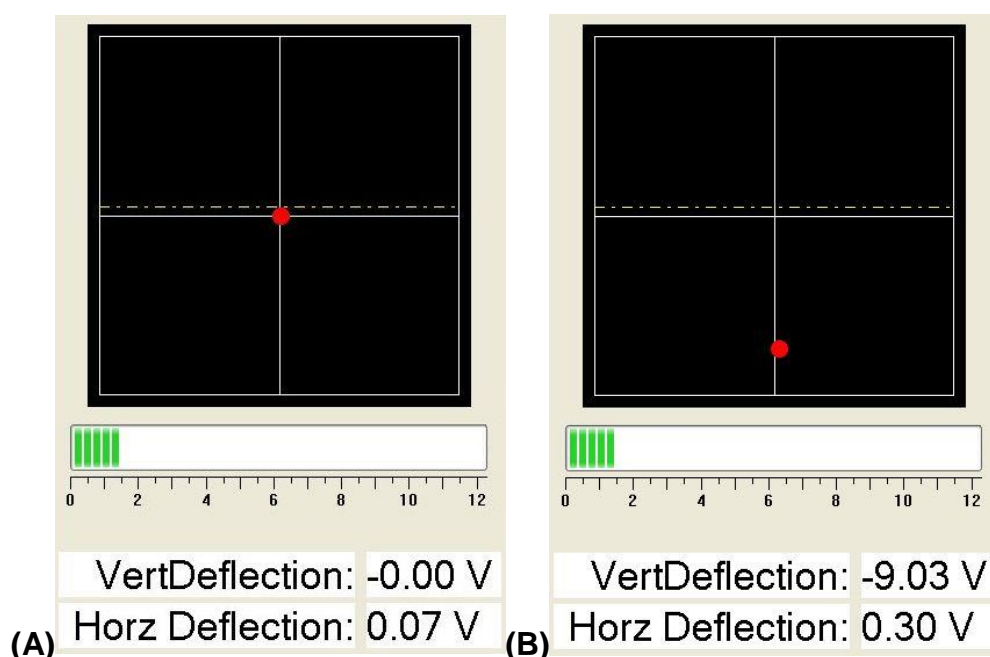


Tabela 5 – Deflexão no modo estático do μC funcionalizado somente na superfície refletora, para diferentes voláteis na concentração 240kppm.

Volátil	Deflexão (nm)	Tensão (mJ/m^2)
Etanol	984,45	458,21
Metanol	1046,59	487,13
Propanol	425,18	197,89
Diclorometano	59,96	27,90
Benzina	65,41	30,44
Acetona	130,82	60,89
BRANCO	0	0

Conforme pode ser observado (Tabela 5), a deflexão ocorre com maior intensidade quando o volátil é compatível com o sitio ativo da biomolécula imobilizada na superfície do biossensor.

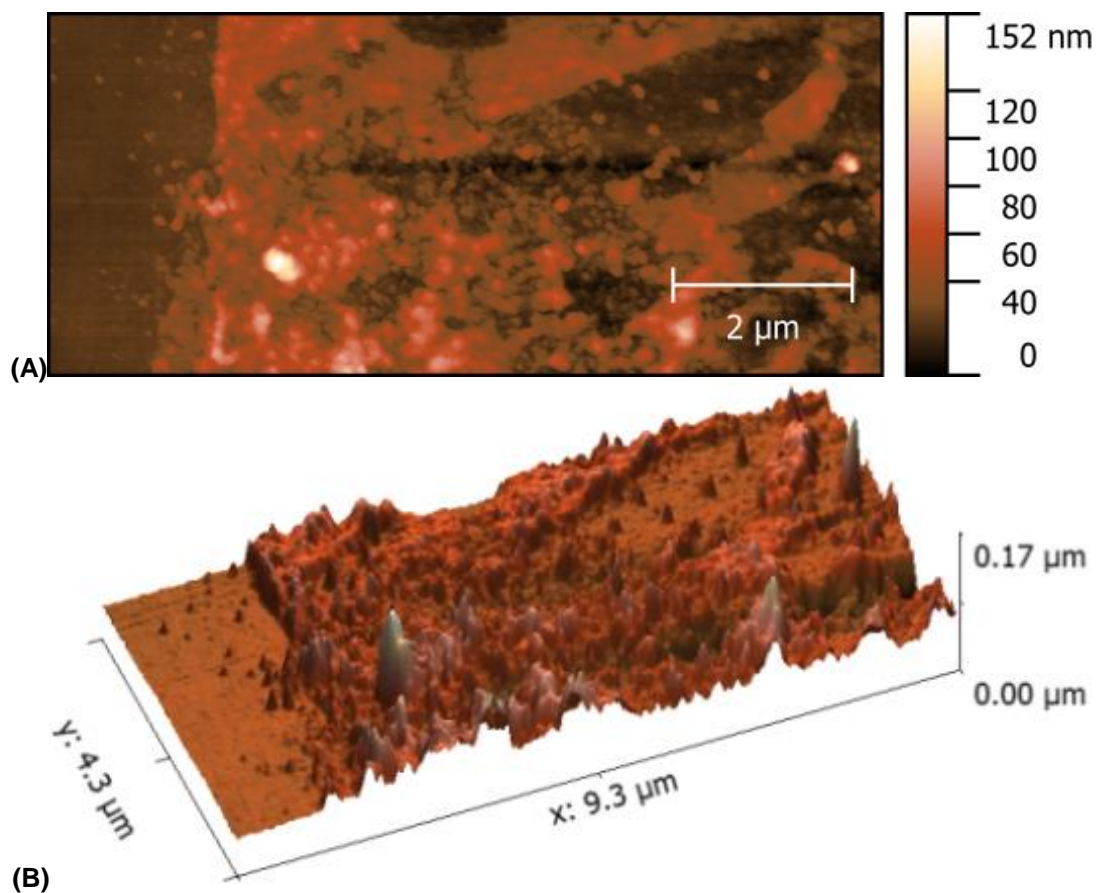
O mesmo método utilizado em um μC novo sem o recobrimento funcional não se observou qualquer deformação na haste com a presença do vapor de etanol.

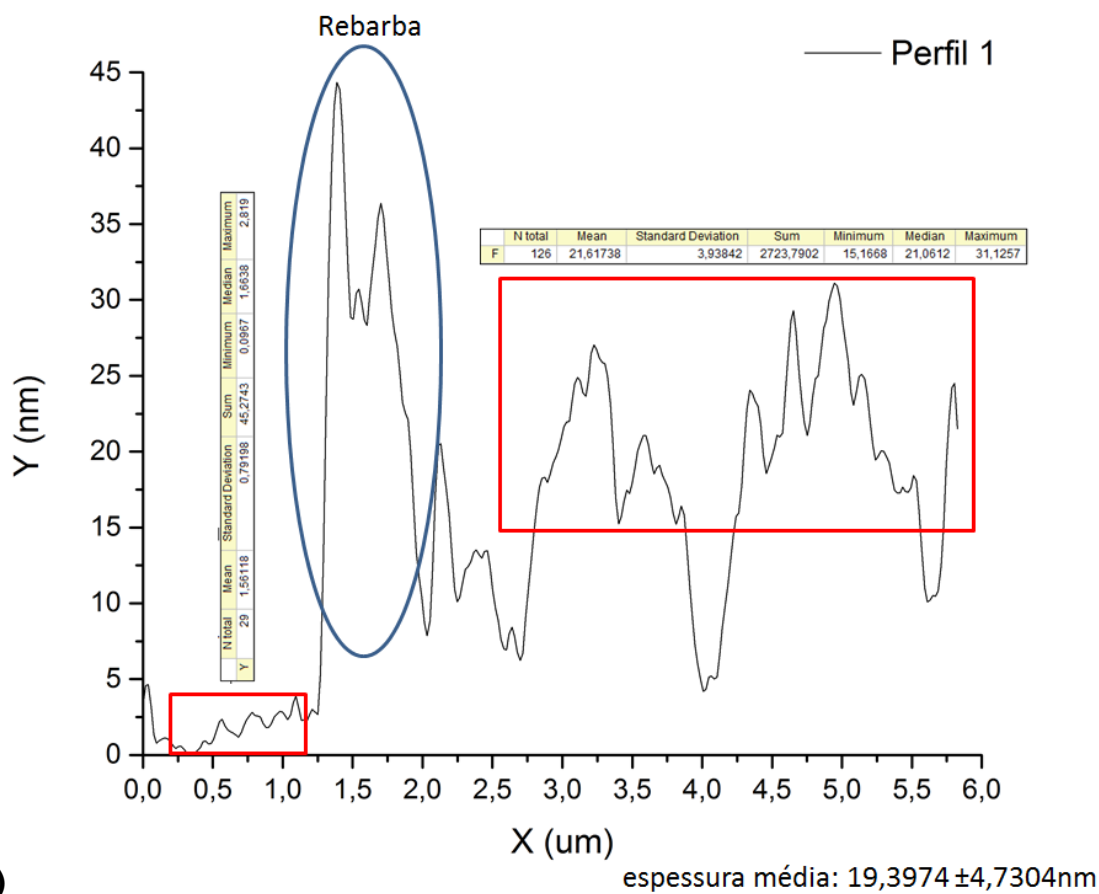
Conforme demonstrado por Vashit (VASHIST, S. et al., 2014), o APTES realiza ligação com diversos materiais, com grande afinidade por ouro e silício. Desta forma o método de ativação por imersão em APTES recobre ambas as superfícies do microcantilever, possibilitando detectar a mudança na tensão superficial apenas pela alteração na resposta de frequência de ressonância.

4.2.2 Caracterização da superfície funcionalizada com a enzima Álcool Desidrogenase

Por intermédio de imagens de AFM, foi possível calcular a espessura da camada funcional. Com a utilização de uma lâmina metálica afiada, com dureza inferior ao substrato para não deformar a superfície do microcantilever, fez-se um risco sobre a superfície funcionalizada até tocar a superfície de silício, removendo dessa forma apenas uma parte da camada funcional. A imagem foi feita sobre o degrau que se formou possibilitando estimar a espessura da camada. A imagem obtida pelo perfil da topografia da camada funcional realizada por meio de ativação por vapor de APTES apresentou uma distribuição bem uniforme com espessura média de $14,68 \pm 1,19$ nm (Figura 35). Para a funcionalização obtida com ativação via imersão, observou-se uma maior rugosidade e espessura média em torno de $19,39 \pm 4,7$ nm (Figura 34), demonstrando que há fortes evidências da realização de ligação cruzada no momento da ativação, este fenômeno é descrito por Acres (ACRES et al., 2012) e Vashist (VASHIST, S. K. et al., 2014).

Figura 34 – Microcantilever ativado com solução de APTES a 2 % por imersão, com espessura média em torno de $19,39 \pm 4,7$ nm. Em (A), vista superior, em (B), vista em 3D e em (C) um perfil da topografia com a espessura de 10 pixels.

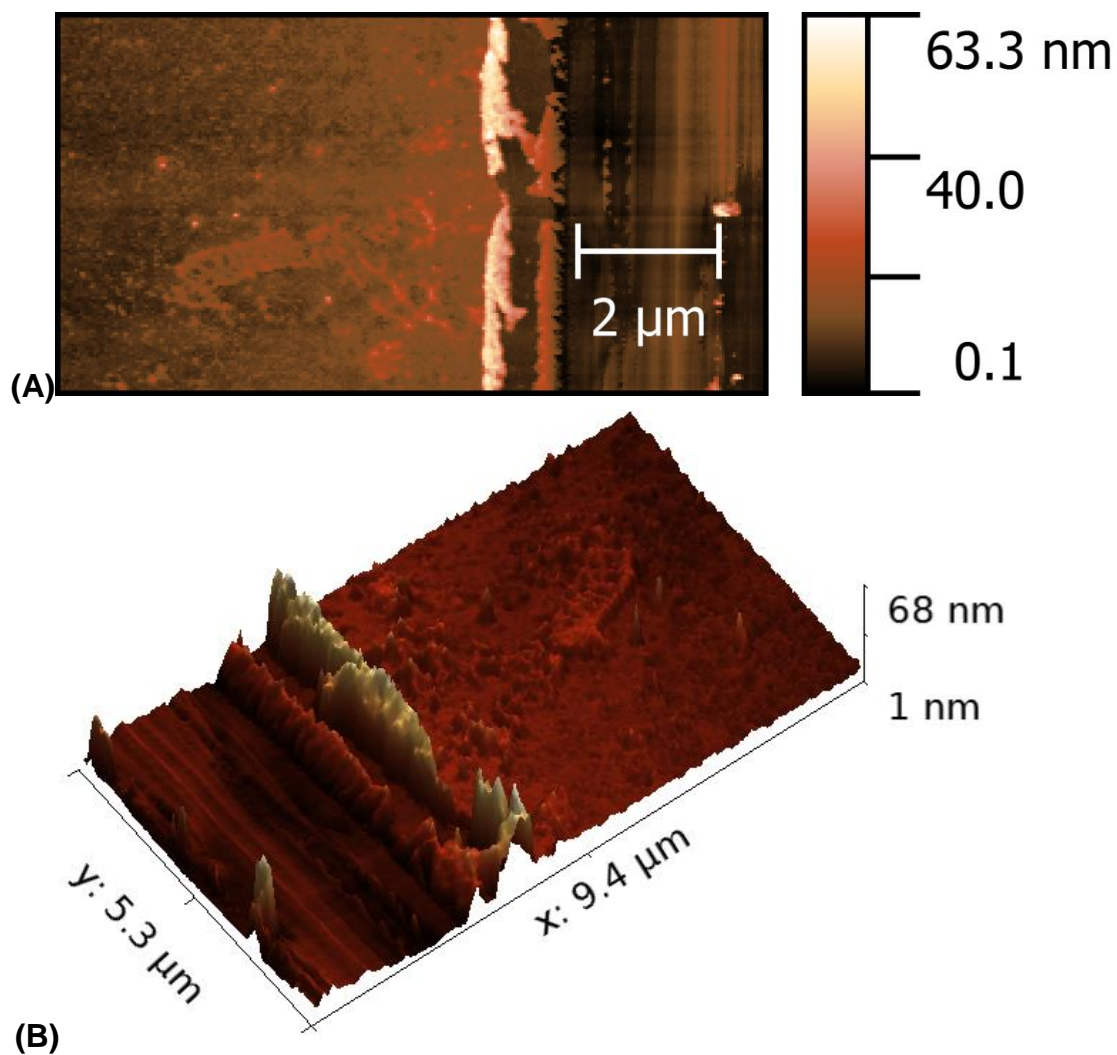


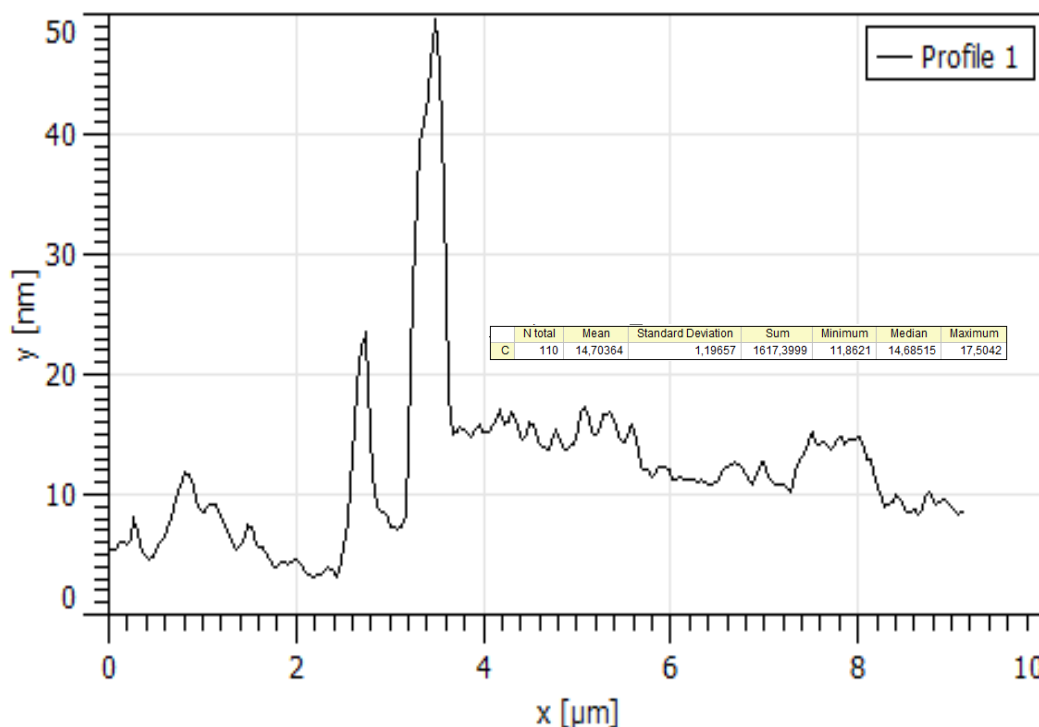


No gráfico da Figura 34(C), estão destacadas em vermelho as regiões onde foi efetuado o risco pela lamina afiada. Nota-se que a região onde a funcionalização permaneceu inalterada (interface entre as duas superfícies) salienta-se um acúmulo de material (azul). Esse aspecto forma-se devido a lâmina repuxar parte da camada funcional ao realizar o risco.

A Figura 35 demonstra o risco feito em um μC ativado por vapor de APTES, onde se constatou o aspecto mais próximo de uma formação em monocamadas. A espessura de cada passo da funcionalização pode ser estimada baseada em informações disponíveis na literatura sobre os reagentes utilizados, sendo de: Ativação com APTES: 7 Å - glutaraldeído: 3,0 Å - Enzima Álcool Desidrogenase: 90,58 Å, Total: 97,88 Å (ACRES et al., 2012).

Figura 35 – Microcantilever ativado com vapor de APTES, com espessura média em torno de $14,68 \pm 1,19$ nm. Em (A), vista superior, em (B), vista em 3D e em (C) um perfil da topografia com a espessura de 10 pixels.





(C)

A espessura estimada de uma monocamada perfeita é no mínimo de 9,788 nm. Experimentalmente, o processo que mais se aproximou foi a funcionalização com ativação por intermédio de vapor de APTES ($14,68 \pm 1,19$ nm). Esta variação na espessura se deve ao fato tanto do APTES quanto ao glutaraldeído terem a possibilidade de formação de múltiplas camadas, e também deve se levar em consideração a presença de imperfeições na superfície do microcantilever. Constatou-se também na ativação por vapor de APTES uma melhor distribuição da camada funcional, com menos espaços, boa distribuição e baixa rugosidade.

4.3 Comparação da susceptibilidade a temperatura e umidade para diferentes formas de funcionalização

Foram comparados a variação na frequência de ressonância e o fator de qualidade de microcantilevers novos (sem recobrimento) e microcantilevers funcionalizados sob diferentes condições: (A) ar e pressão atmosférica de 690,7 mm, 25 °C de temperatura e umidade de 50 %; (B) Ar isento sob pressão atmosférica de 690,7 mm, a 25 °C e umidade de 15 %; e (C) Nitrogênio 5.0 com pureza mínima de

99,999 % e umidade < 2 ppm-mol sob pressão atmosférica de 690,7 mm, a 25 °C e (D) Vapor de Nitrogênio Líquido a -2 °C com pureza mínima de 99,999 % e umidade < 2 ppm.

Neste experimento, quatro diferentes métodos de funcionalização foram testados nas seguintes condições para o μC NSG10:

1 – Funcionalização por monocamadas auto-organizadas (SAM) pela ativação em vapor de APTES;

2 – Funcionalização pela ativação com vapor de APTES, seguida de ligação covalente cruzada.

3 – Funcionalização com aplicação de 20,0 nm de ouro sobre a superfície do microcantilever, seguido de ativação com TIOL a 1 mM por 24 h e formação de monocamadas auto-organizadas (SAM).

4 - Funcionalização com aplicação de 20nm de ouro sobre a superfície do microcantilever, seguido de ativação com TIOL a 1 mM por 24 h com ligação cruzada covalente.

Nos experimentos em que o μC de Nitreto de Silício foi apenas limpo em água milli-Q e etanol (sem emprego de tratamento térmico ou solução Piranha), não foi observada ligação do glutaraldeído nem ativação com APTES/TIOL. Este fato foi facilmente verificado, pois após a posterior limpeza com solução tampão para remoção dos reagentes não ligados o μC continuou com a mesma frequência de ressonância e fator Q originais. Dessa forma, a limpeza e oxidação da superfície do Nitreto de Silício apresentam-se necessários para a ligação do APTES/TIOL.

4.3.1 Comparação dos diferentes métodos de funcionalização

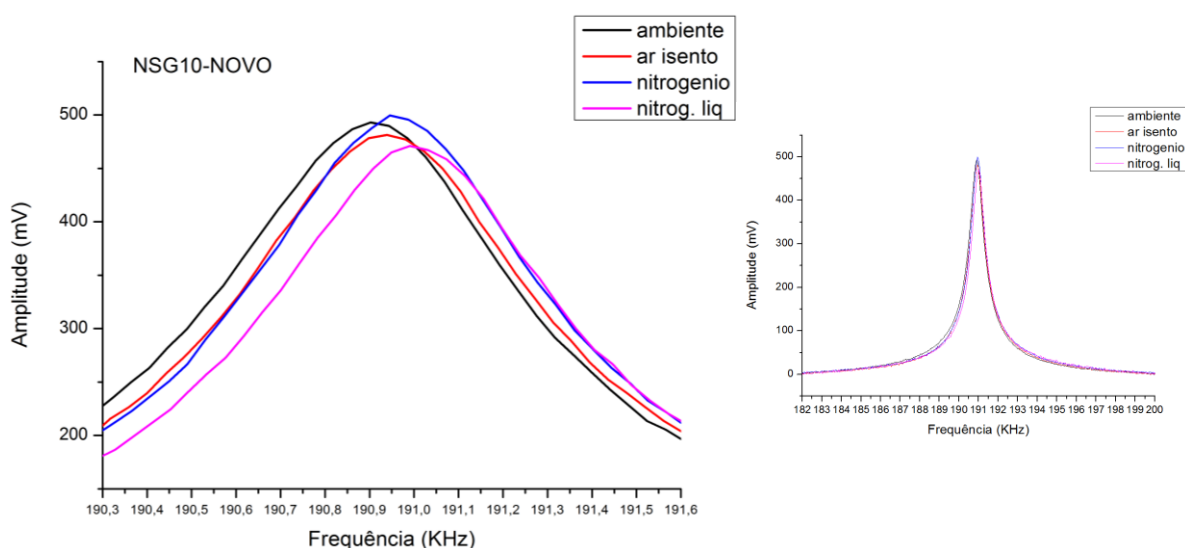
A seguir, são apresentadas tabelas para cada experimento, em que se variou as condições de temperatura e umidade relativa observando-se a variação da frequência de ressonância, fator qualidade, amplitude (RMS) e a área do gráfico para cada situação.

4.3.1.1 Microcantilever NSG10 – Novo, sem qualquer recobrimento

Na Tabela 6, os parâmetros e s resultados obtidos foram resumidos para cada experimento.

Tabela 6 – Microcantilever NSG10 – novo sem recobrimento

Meio	Temperatura °C	Umidade Relativa %	Frequência (KHz)	Fator Q	RMS	Área Gráfica (U.A.)	Drive Amplitude (mV)
Ambiente	25	45	190,90	303	0,50	1043,58	31,13
AR Isento	25	15	190,93	307	0,50	1034,47	28,54
Nitrogênio 5.0	25	0,001	190,94	321	0,51	1062,49	26,86
Nitrog. Liq	-2	0,001	190,99	317	0,48	1040,16	25,32

Figura 36 – Resposta do μC novo às condições de: ar-ambiente com 50 % de umidade relativa, ar-isento com 15 % de umidade relativa, nitrogênio 5.0 e gás de nitrogênio líquido.

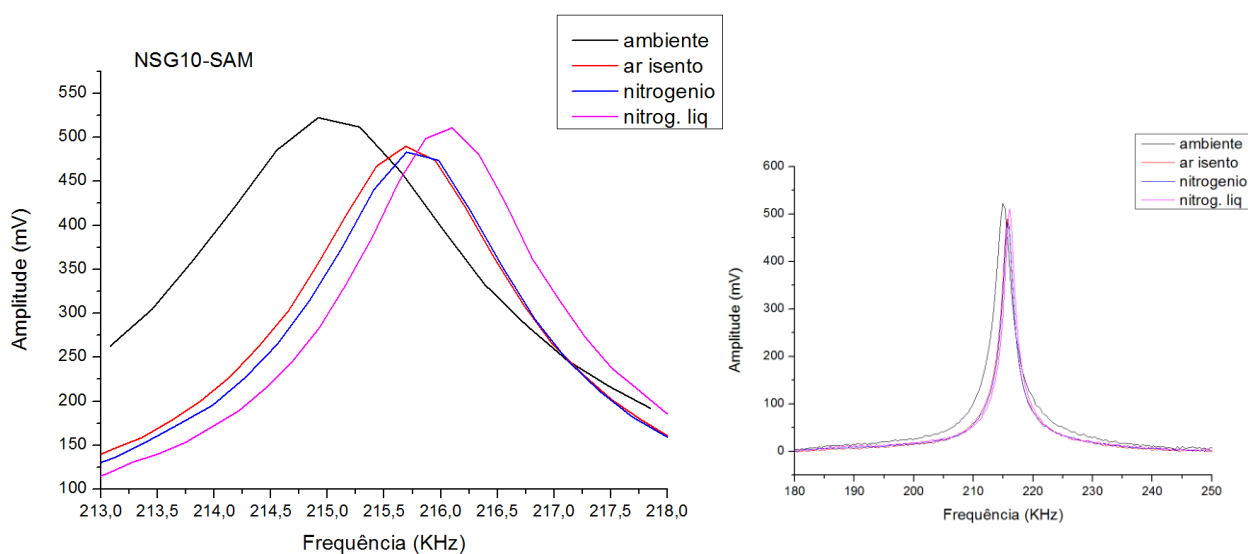
Para microcantilevers novos, sem recobrimento, notou-se que a área do gráfico permaneceu praticamente constante nas diversas situações testadas. Observa-se que a diminuição da umidade relativa e temperatura proporciona uma redução no amortecimento da haste, o que acarretou em um pequeno aumento na frequência de ressonância e no fator Q (Tabela 6, Figura 36).

4.3.1.2 Microcantilever NSG10 – Funcionalizado em monocamadas auto-organizadas (SAM) pela ativação em vapor de APTES.

Tabela 7 - Microcantilever NSG10 – funcionalizado por intermédio de monocamadas (SAM)

Meio	Temperatura °C	Umidade Relativa %	Frequência (KHz)	Fator Q	RMS	Área Gráfica (U.A.)	Drive Amplitude (mV)
Ambiente	25	50	214,91	90	0,5	4832,88	29,30
AR Isento	25	15	215,69	132	0,5	2996,70	26,25
Nitrogênio 5.0	25	0,001	215,69	139	0,5	3179,01	22,58
Nitrog. Liq	-2	0,001	216,10	141	0,5	3199,74	21,06

Figura 37 – Resposta do μ C funcionalizado em camadas auto-organizadas (SAM) às condições de: ar-ambiente com 50 % de umidade relativa, ar-isento com 15 % de umidade relativa, nitrogênio 5.0 e gás de nitrogênio líquido.



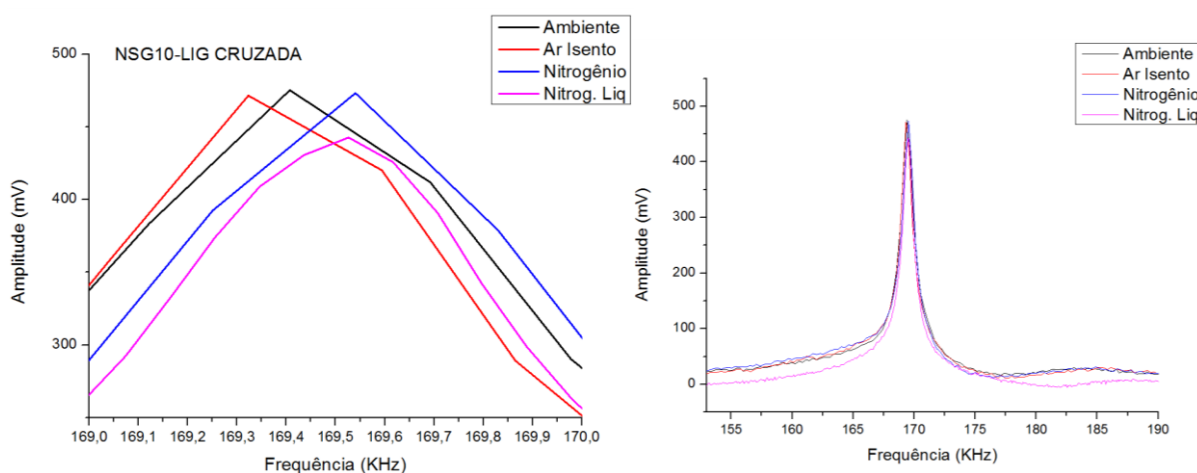
A aplicação de uma camada funcional organizada (SAM) comprovou que a variação da umidade relativa e a temperatura tiveram uma pequena influência no amortecimento da haste, dentre os diferentes métodos de funcionalização é o comportamento que mais se assimilou a um μ C novo. O comportamento do gráfico (decaimento sem ruídos) apresentou-se bem similar ao de um μ C novo não funcionalizado (Tabela 7, Figura 37).

4.3.1.3 Microcantilever NSG10 – ativado por vapor de APTES e funcionalizado por Ligação Covalente Cruzada

Tabela 8 - Microcantilever NSG10- ligação covalente cruzada.

Meio	Temperatura (°C)	Umidade Relativa %	Frequência (KHz)	Fator Q	RMS	Área Gráfica (U.A.)	Drive Amplitude (mV)
Ambiente	25	50	169,40	93	0,57	3272,18	4166
AR Isento	25	16	169,32	134	0,52	2928,03	1943
Nitrogênio 5.0	25	0,001	169,54	166	0,51	3102,41	1478
Nitrog. Liq	-2	0,001	169,52	141	0,51	1298,24	2125

Figura 38 – Resposta do μ C funcionalizado com ligações covalentes cruzadas às condições de: ar-ambiente com 50 % de umidade relativa, ar-isento com 15 % de umidade relativa, nitrogênio 5.0 e gás de nitrogênio líquido.



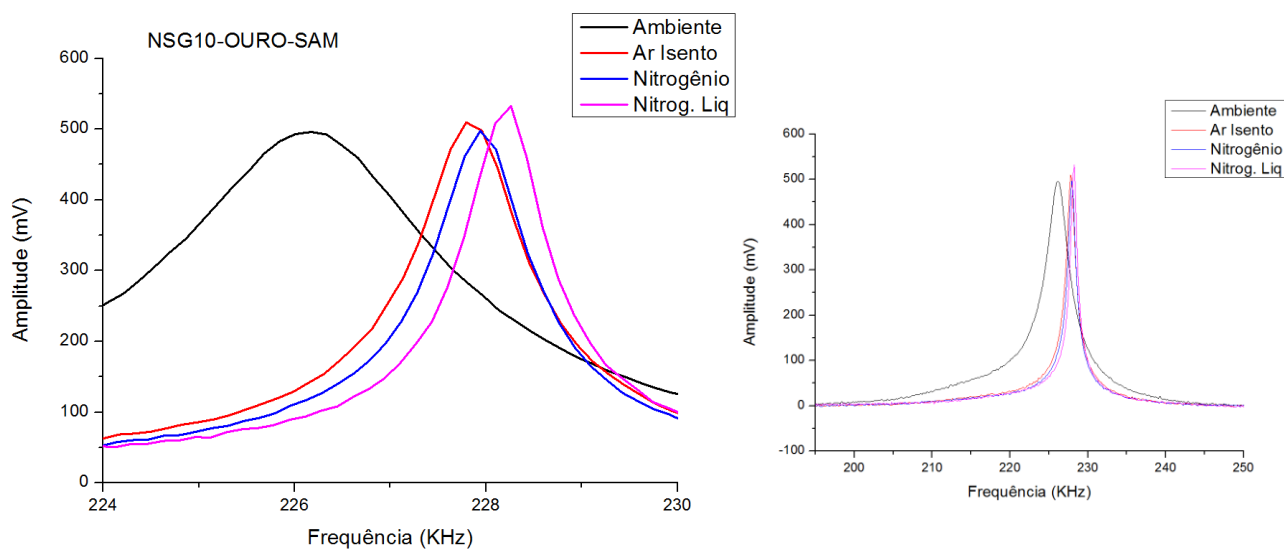
Na aplicação de uma camada funcional desorganizada, notou-se que a umidade teve uma grande influência no amortecimento da haste e a temperatura mais baixa influenciou negativamente nos valores de amplitude, possivelmente por enrijecer a camada funcional espessa. Com isso, pode-se visualizar que o comportamento do gráfico (decaimento) sofre bastante com oscilações próximas a base, o que torna menos precisa a leitura de frequência do μ C (Tabela 8, Figura 38).

4.3.1.4 Microcantilever NSG10 – revestido com 20nm de ouro e funcionalizado por SAM com Tiol

Tabela 9 - Microcantilever NSG10- com recobrimento de ouro e funcionalizado em monocamadas (SAM), ativado com Tiol

Meio	Temperatura °C	Umidade Relativa %	Frequência (KHz)	Fator Q	RMS	Área Gráfica (U.A.)	Drive Amplitude (mV)
Ambiente	25	50	226,00	93	0,5	3876,88	782,80
AR Isento	25	16	227,79	249	0,51	1945,46	376,00
Nitrogênio 5.0	25	0,001	227,94	272	0,5	1675,74	368,00
Nitrog. Liq	-2	0,001	228,26	372	0,54	1706,94	673,50

Figura 39 – Resposta do μC funcionalizado em camadas auto-organizadas às condições de: ar-ambiente com 50% de umidade relativa, ar-isento com 15% de umidade relativa, nitrogênio 5.0 e gás de nitrogênio líquido.



Ao depositar-se 20,0 nm de ouro pela técnica de *sputtering* na superfície da haste do microcantilever, somado a camada funcional, o efeito da umidade relativa e temperatura tornaram-se ainda mais drásticos para a variação de frequência de ressonância devido à formação de um bi-metal e menor fator de qualidade decorrente da deposição. Notou-se que não ocorrem instabilidades nas proximidades do pico de ressonância (base do gráfico), também garantindo uma boa técnica de funcionalização (Tabela 9, Figura 39).

Nota-se em todos os ensaios, que a amplitude (RMS) se manteve praticamente inalterada, o equipamento de AFM é configurado para manter a mesma amplitude e para tal, o Drive Amplitude (mV) deve ser variado para se obter amplitudes próximas.

Observou-se que quanto mais espessa a camada depositada sobre o μC o AFM necessitou de mais energia para manter aproximadamente a mesma amplitude, comprovando que a deposição em monocamadas sem a deposição de ouro na superfície obteve resultados mais próximos de um μC novo, sendo assim, melhor aplicado para biossensores.

4.4 Resposta dos biossensores a analito alvo

Os biossensores testados foram construídos com microcantilevers de nitreto de silício e silício. Entretanto, a melhor resposta e sensibilidade foram obtidas para microcantilevers de nitreto de silício devido à ativação química altamente densa proporcionada pelo material (Figura 29).

Ao se expor o biossensor a uma concentração significativa do analito alvo às condições ambiente (25 °C, 1 ATM, UR 50%), notou-se uma grande variação da tensão superficial sobre a haste funcionalizada do microcantilever, constatada tanto pela flexão (quando funcionalizado apenas uma das faces) como pelo aumento expressivo da frequência de ressonância (quando funcionalizado ambas as faces, Figura 40). Vários testes foram realizados para identificar o agente causador desta tensão superficial, e várias suposições foram levantadas, para tanto foram testadas três condições diferentes de funcionalização do microcantilever.

4.4.1 Ligação em camadas auto-organizadas (SAM)

A resposta à frequência de ressonância em camadas auto-organizadas covalentes (SAM), em 3 ensaios seguidos de 20 min cada está representada na Figura 40. Notou-se que uma concentração mais alta de etanol causou um aumento significativo na frequência de ressonância, decorrente do aumento da tensão superficial. Concentrações abaixo de 300 $\mu\text{L/L}$ de etanol, apenas causaram a diminuição da frequência de ressonância (Figura 44), possivelmente pelo fato do não

preenchimento de todos os sítios ativos das enzimas ativas na superfície. Como o cofator da enzima não está presente nesta condição, supomos que o sítio ativo apenas se liga à molécula do substrato e a solta com a lixiviação causada pelo ar, sem transformar a molécula em outra substância.

Figura 40 – Resposta da frequência de ressonância do $\mu\text{C NT_MDT HA_NC}$ em três ensaios seguidos utilizando 5,0 μL de etanol 99,9 % a uma distância de 5,0 mm da haste, depositado em uma lâmina de vidro.

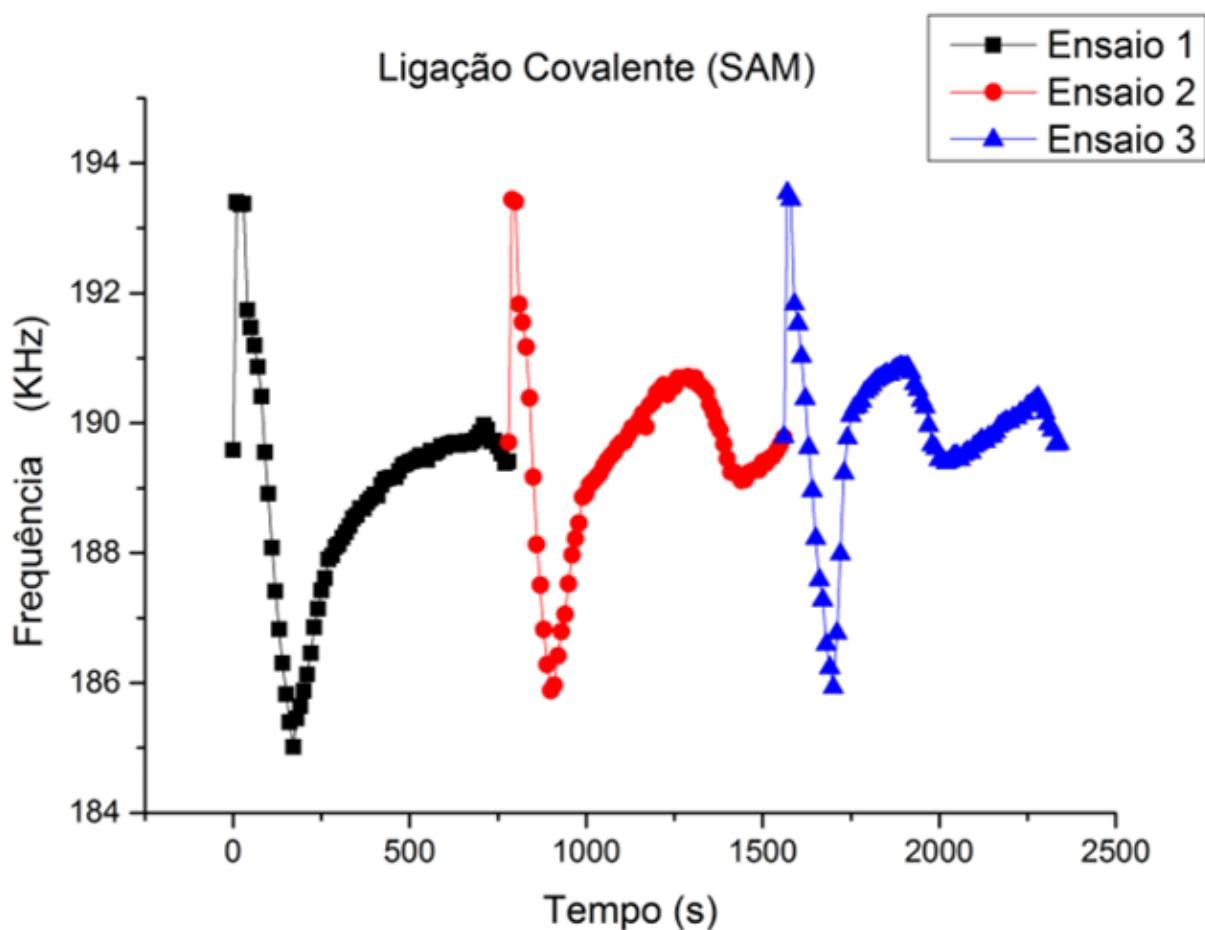
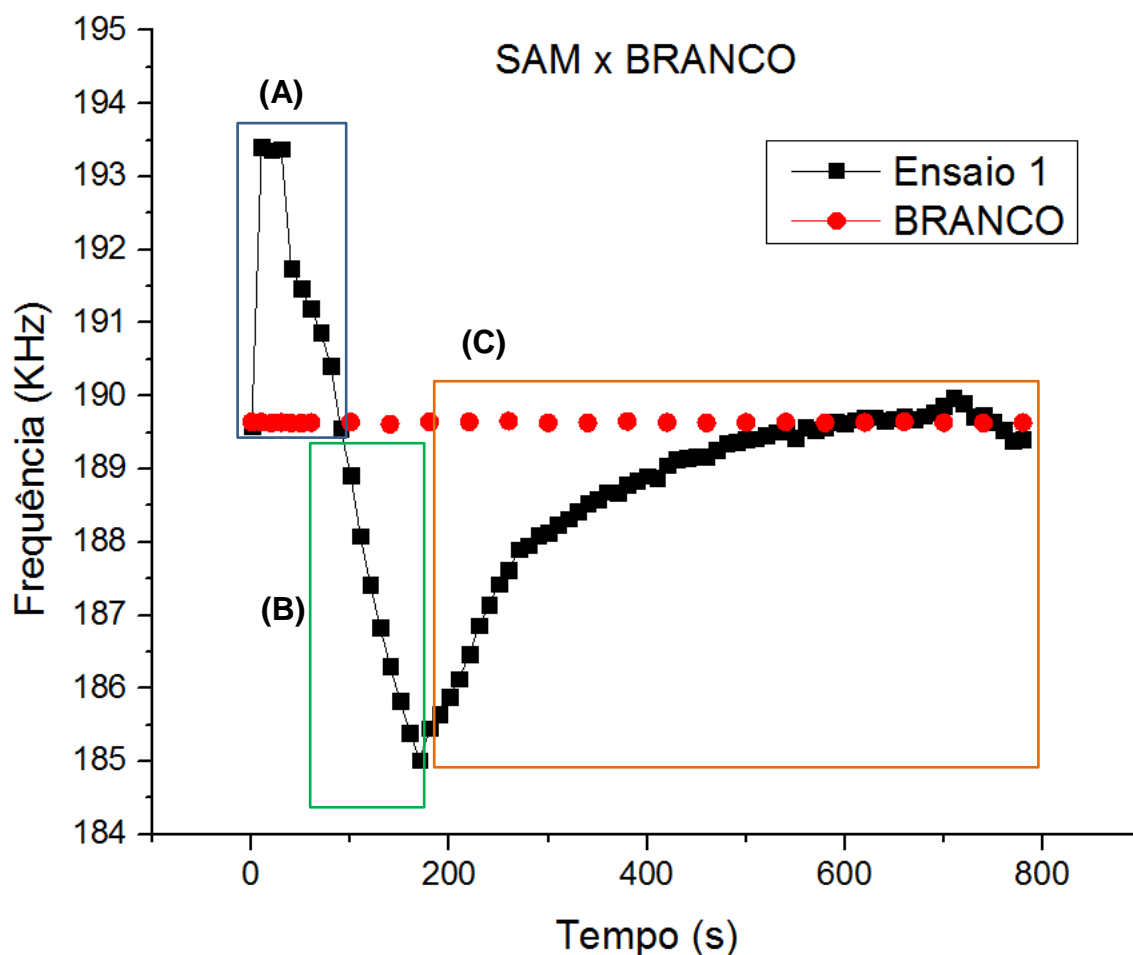


Figura 41- Comparativo da resposta do μC novo (BRANCO) com um funcionalizado por intermédio de SAM exposto ao vapor de $10\ \mu\text{L}$ de etanol, região (A) influência da tensão superficial, (B) adsorção com diminuição da frequência de ressonância e (C) recuperação do biossensor.



Na Figura 41 foi identificada cada região correspondente do gráfico e como o μC novo se comporta sobre o mesmo experimento, demonstrando que a interação do vapor de etanol sobre o μC não funcionalizado realiza pouca influência na resposta de frequência de ressonância, desprezível se comparado ao μC funcionalizado.

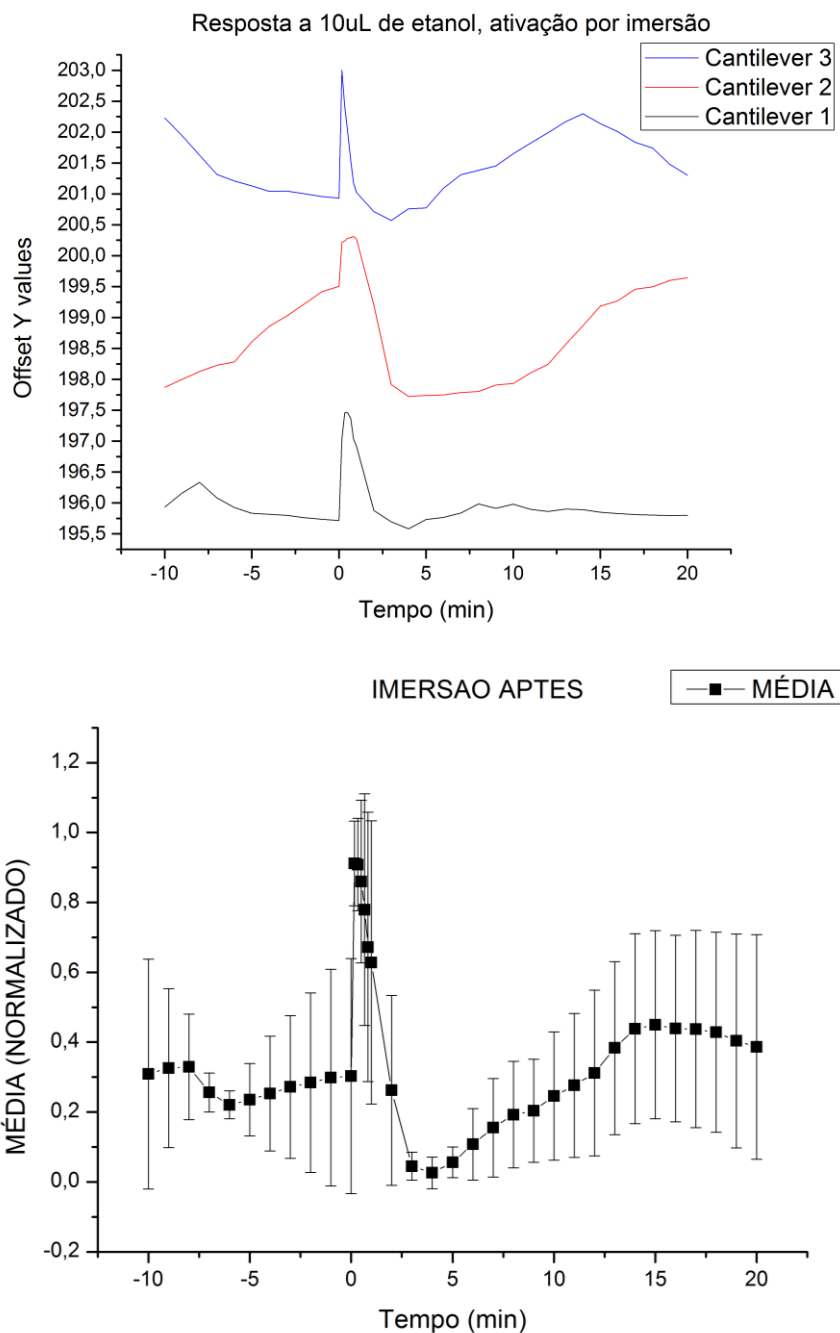
Na Figura 40, verifica-se que o período de tempo de relaxamento do biossensor foi diferente a cada ensaio em sequência, porém, a tensão superficial máxima se manteve a mesma durante os três ensaios. Nota-se também que a fase de adsorção (diminuição da frequência de ressonância) diminuiu, possivelmente devido ao fato do vapor do etanol expulsar a umidade presente no biossensor, desta forma alterando a frequência de ressonância a cada ensaio.

A maior espessura gerada pela ativação por imersão causa alguns efeitos indesejáveis (Figura 42), como a oscilação acentuada que foi observada antes e depois da exposição ao analito alvo.

O etanol ao evaporar (Item 3.6.2 Método rápido para checar a atividade e sensibilidade do biossensor), faz com que chegue inicialmente uma concentração elevada no primeiro contato, o que faz a tensão superficial do biossensor aumentar drasticamente de forma imediata. Na medida em que a concentração de etanol diminui no sistema, diminui também a tensão superficial até o ponto em que esta não é mais observada. Logo após, a variação da frequência de ressonância diminui devido à adsorção de massa, até acabar completamente o vapor de etanol (em torno de 5 minutos). Os 15 minutos seguintes são monitorados para checar o período de tempo de recuperação do biossensor.

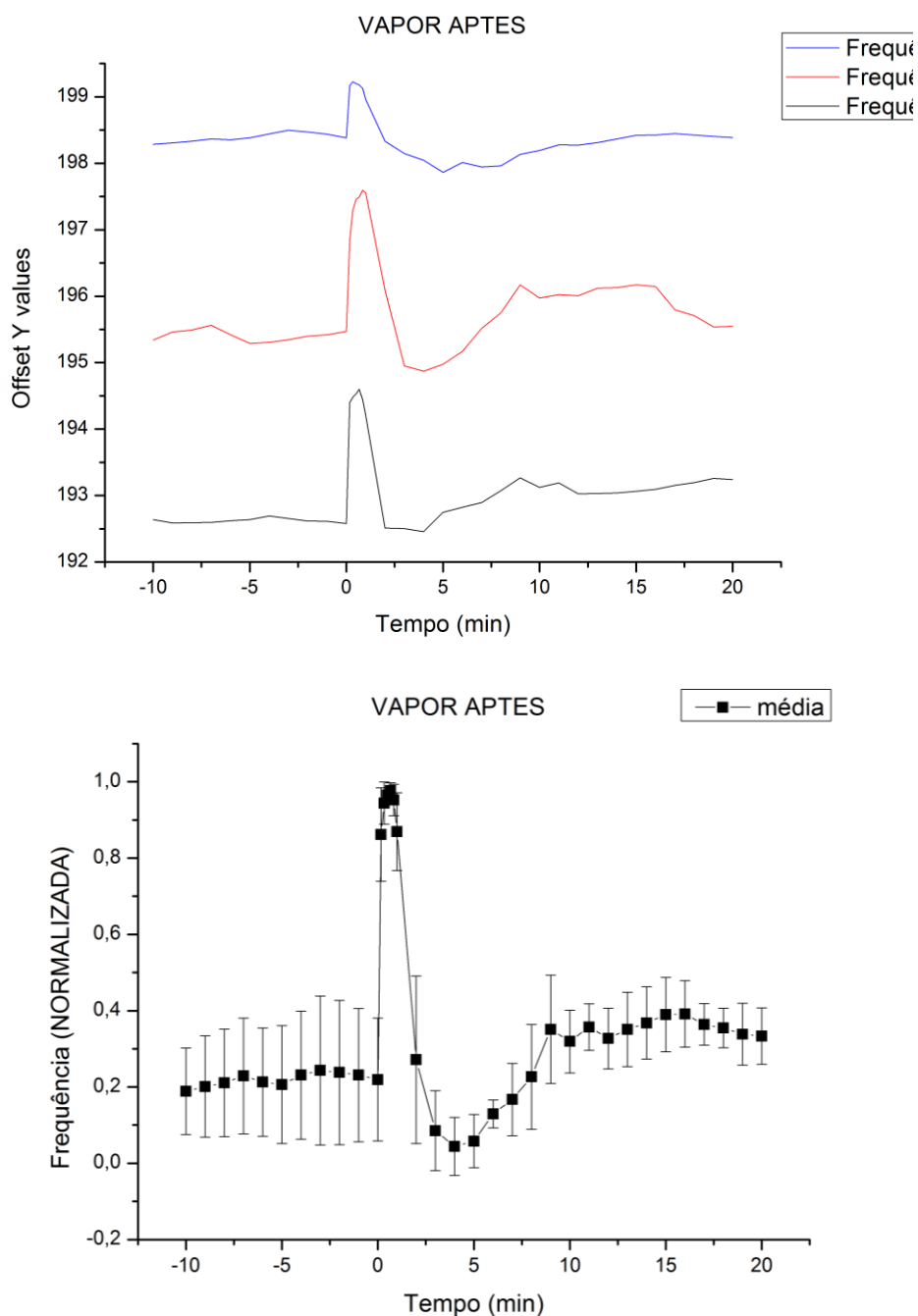
No gráfico da Figura 42, são registrados os primeiros 10 minutos (1 leitura por minuto) para mostrar a variação da frequência de ressonância do biossensor sem a presença do analito alvo. No período de tempo 0 é inserida uma lâmina com 10,0 μL de etanol a uma distância de 5,0 mm do biossensor em condições ambiente, como ilustrado na Figura 27.

Figura 42 - Três biossensores diferentes ambos ativados por imersão em APTES a 2 % por 30 min.



Na Figura 43 é possível ver que o comportamento dos biossensores funcionalizados com ativação por vapor de APTES, apresentaram comportamentos muito semelhantes quando comparados com os biossensores ativados por imersão de APTES, comprovando ser a melhor opção de funcionalização. Esse fato pode ser observado pelo erro (desvio padrão) da média do resultado dos três biossensores diferentes testados.

Figura 43 - Três biossensores diferentes ambos ativados por vapor de APTES. A camada mais fina e uniforme torna os biossensores mais eficientes e diminui a diferença entre os comportamentos.

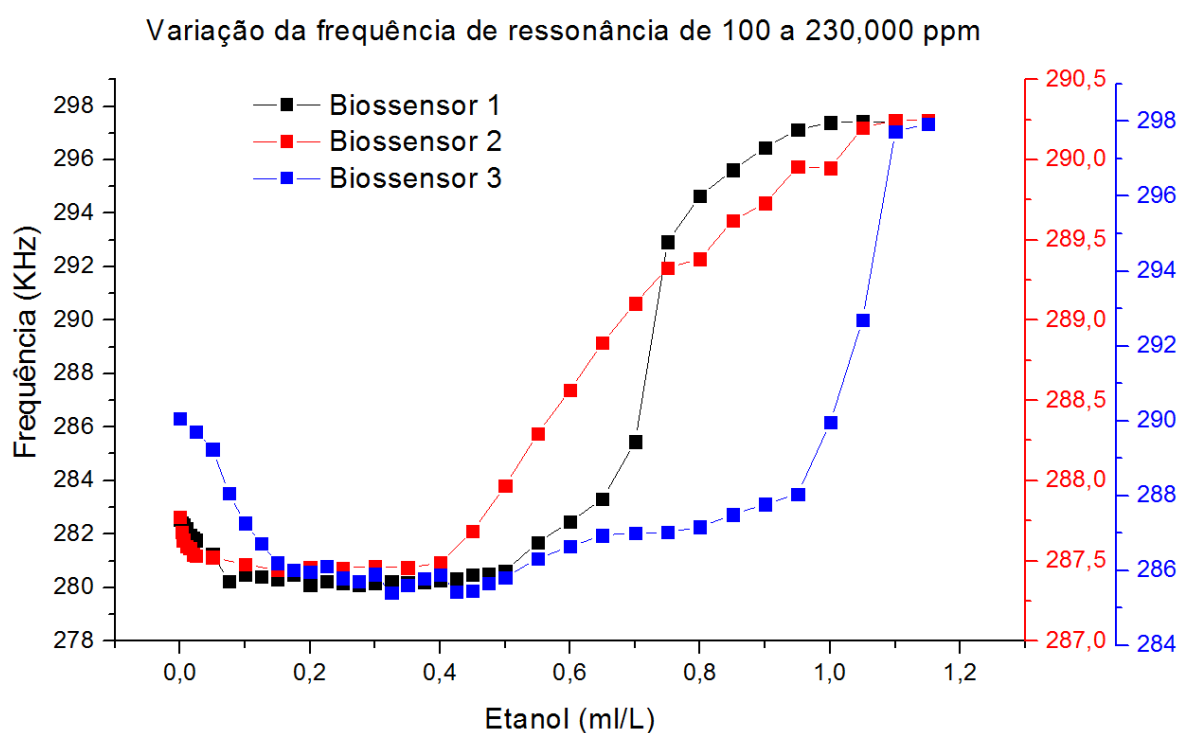


Ao etanol se ligar aos sítios ativos, ocorre à expulsão de moléculas de água presentes, alterando assim a frequência de ressonância pela variação na massa ou pelo aumento da tensão superficial. Após a enzima liberar a molécula de etanol, a umidade do ambiente se liga a enzima, causando a oscilação percebida nos gráficos das Figura 42 e Figura 43. O maior período de tempo para estabilizar a frequência de

ressonância é percebido no primeiro ensaio, Figura 42, pois é onde se encontra a maior quantidade de água na superfície funcionalizada por ser mais espessa.

Para determinar o efeito da concentração do etanol na resposta de frequência de ressonância, foi desenvolvido um sistema circulatório fechado com capacidade de 2,0 L contendo uma cela especial com vedação para fixação do suporte do μC a fim de minimizar qualquer interferência do sistema. Observou-se que em concentrações acima de 0,3 mL/L de etanol (Figura 44) inicia-se um processo em que surge uma tensão superficial muito mais significativa que o aumento de massa adsorvida na superfície. Já com concentrações acima de 0,6 mL/L de etanol, ocorre um aumento exponencial da frequência de ressonância, que se estabiliza ao saturar o biossensor. Na região entre 0,2 mL/L e 0,4 mL/L ocorre um equilíbrio entre a adsorção e tensão superficial em que não há grande variação da frequência de ressonância, esta transição faz com que o biossensor nesta faixa de concentração tenha menor sensibilidade para identificar a concentração exata e sim uma faixa.

Figura 44 – Os gráficos exibem o espectro da variação da frequência de ressonância com o aumento da concentração de etanol de 100 a 230,000 ppm em um sistema circulatório fechado para três biossensores funcionalizados em monocamadas (SAM).

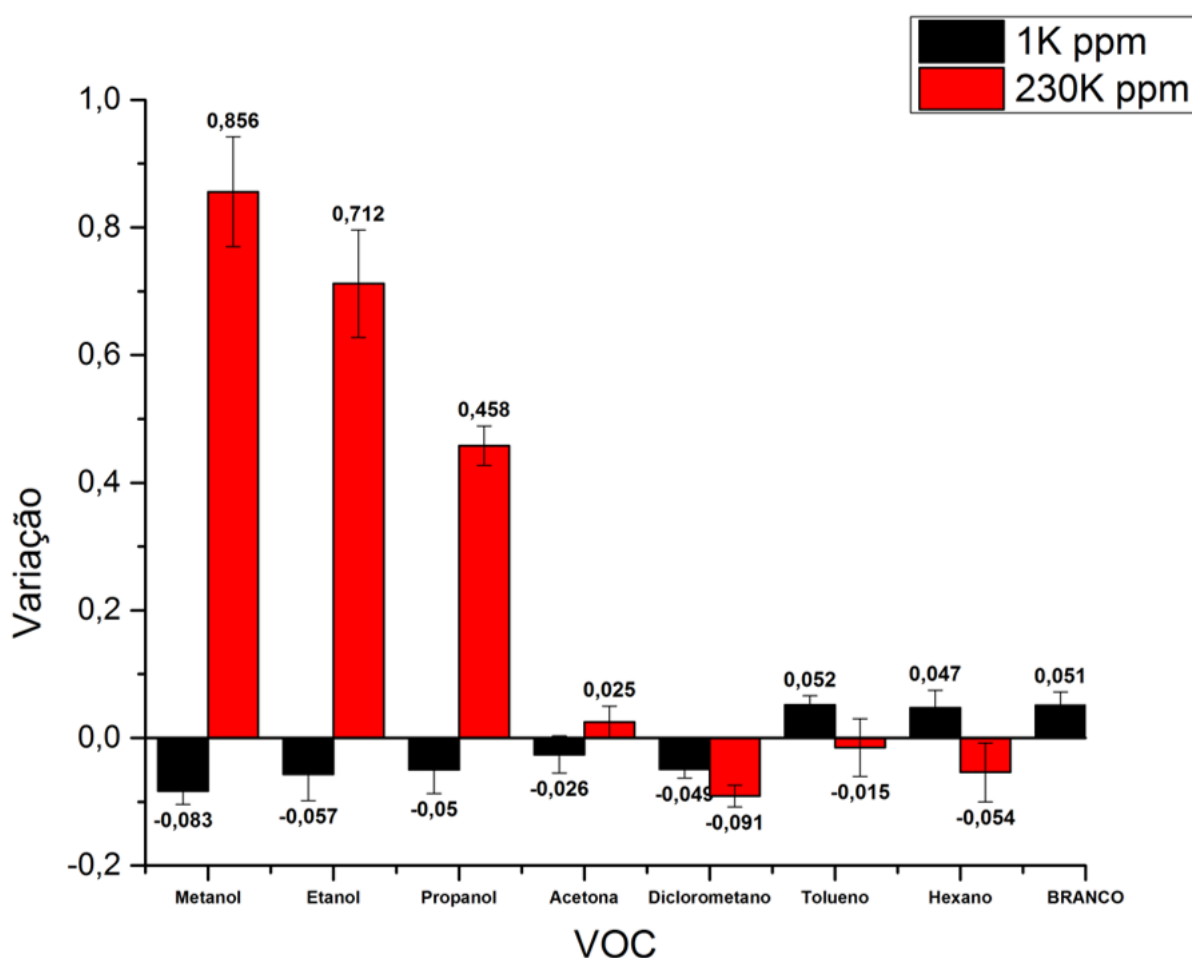


A Figura 44 mostra o experimento com microcantilevers do mesmo modelo funcionalizados em SAM. Tais microcantilevers, mesmo sendo do mesmo

modelo não são idênticos, pois apresentam pequenas variações em todas as dimensões, acarretando diferentes sensibilidades (variação na frequência de ressonância), quantidade de biomoléculas imobilizadas entre outros; no entanto, o comportamento desses biossensores quando expostos ao analito alvo se repete.

Para comprovar a seletividade dos biossensores (Figura 45 e Figura 46), foram realizados ensaios com concentrações controladas de VOCs diferentes, analisando a resposta de frequência de ressonância nas mesmas condições em que a concentração de etanol observou-se a adsorção e aumento da tensão superficial, obtidos pela Figura 44.

Figura 45 – Teste de seletividade com diferentes VOCs em concentrações fixas. Em preto, baixa concentração e em vermelho alta concentração dos VOCs, equivalente as extremidades do gráfico da Figura 44. Biossensor de μC funcionalizado por SAM.

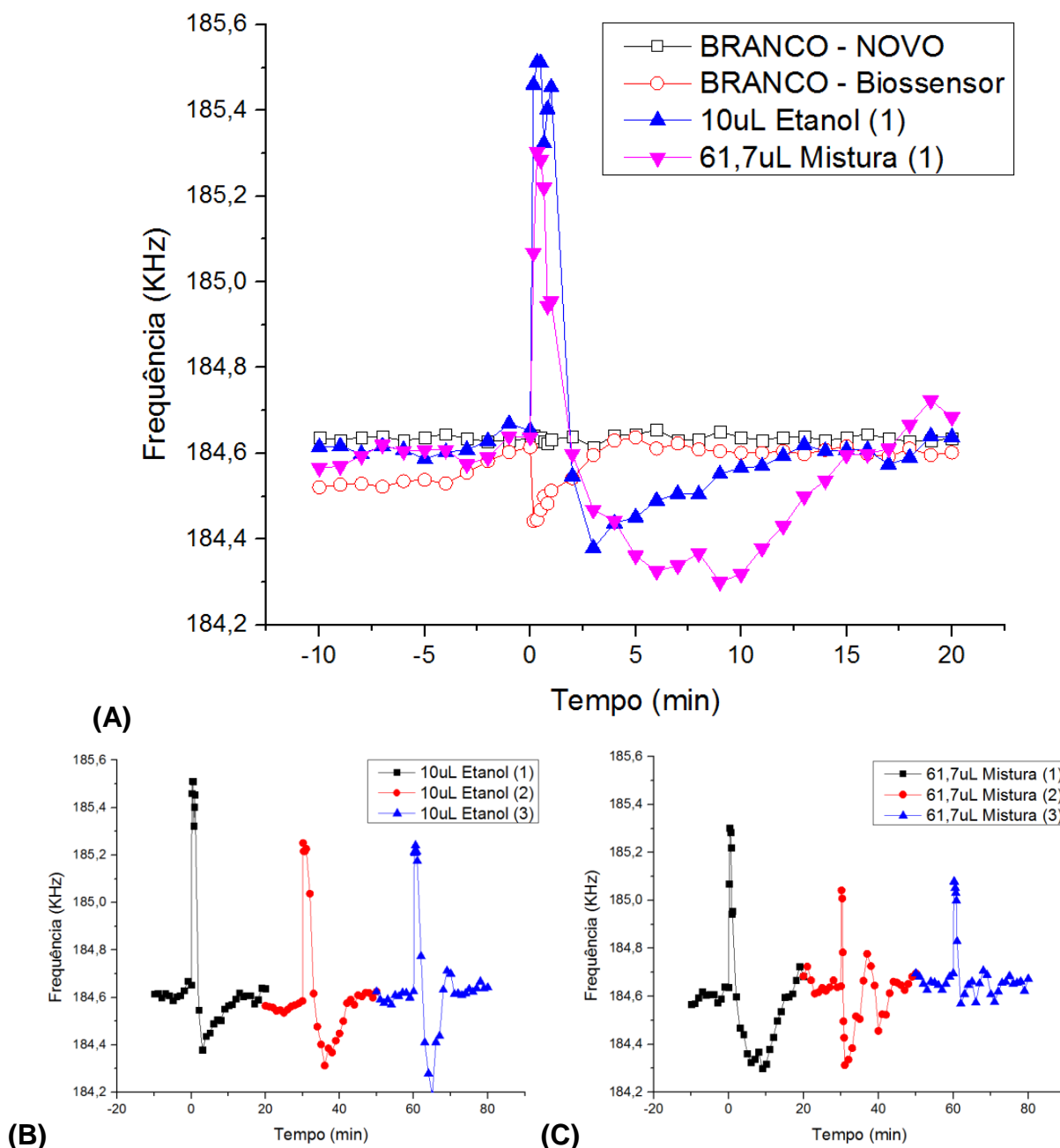


No gráfico da Figura 45 o BRANCO representa a variação na leitura do AFM com o biossensor em condições ambiente sem a presença de qualquer reagente. O μC funcionalizado com revestimento bioativo sofre uma ligeira variação na frequência de ressonância com o período de tempo, formando uma onda senoidal que pode ser observada na Figura 43 entre -10 a 0 min. Foi constatado que esta variação com o

período de tempo é muito maior quando a funcionalização é mais espessa, possivelmente devido ao menor fator qualidade que aumenta o erro de leitura do equipamento e também ao equilíbrio com o meio ambiente. Moléculas de água podem ocupar o interior do sítio ativo das enzimas causando esta variação na frequência de ressonância, possivelmente pela variação de massa no microcantilever.

Por intermédio da mistura de 4 voláteis diferentes com a mesma quantidade de moléculas (Tabela 3), foi comparada a resposta do biossensor nas seguintes condições: 1 – 3 ensaios seguidos de 20 minutos expondo o biossensor a 10,0 μL de etanol (Figura 46 (B)); 2 – 3 ensaios seguidos de 20 minutos expondo o biossensor a 61,7 μL da mistura dos voláteis (etanol, diclorometano, hexano e tolueno), sendo que nesta quantidade 10,0 μL são de etanol (Figura 46 (C)). O branco foi testado de duas possibilidades diferentes: 1 – Com o biossensor colocado em exposição ao vapor da mistura de 3 voláteis (diclorometano, hexano e tolueno) e 2 – μC novo colocado em exposição ao vapor da mistura de 3 voláteis (diclorometano, hexano e tolueno) (Figura 46 (A)), e comparados com os ensaios do biossensor em exposição a 10,0 μL de etanol e 61,7 μL da mistura dos voláteis incluindo o etanol. O período de tempo de vaporização total de 10,0 μL de etanol é em torno de 5 minutos e o período de tempo para vaporização total de 61,7 μL da mistura foi de aproximadamente 10 minutos.

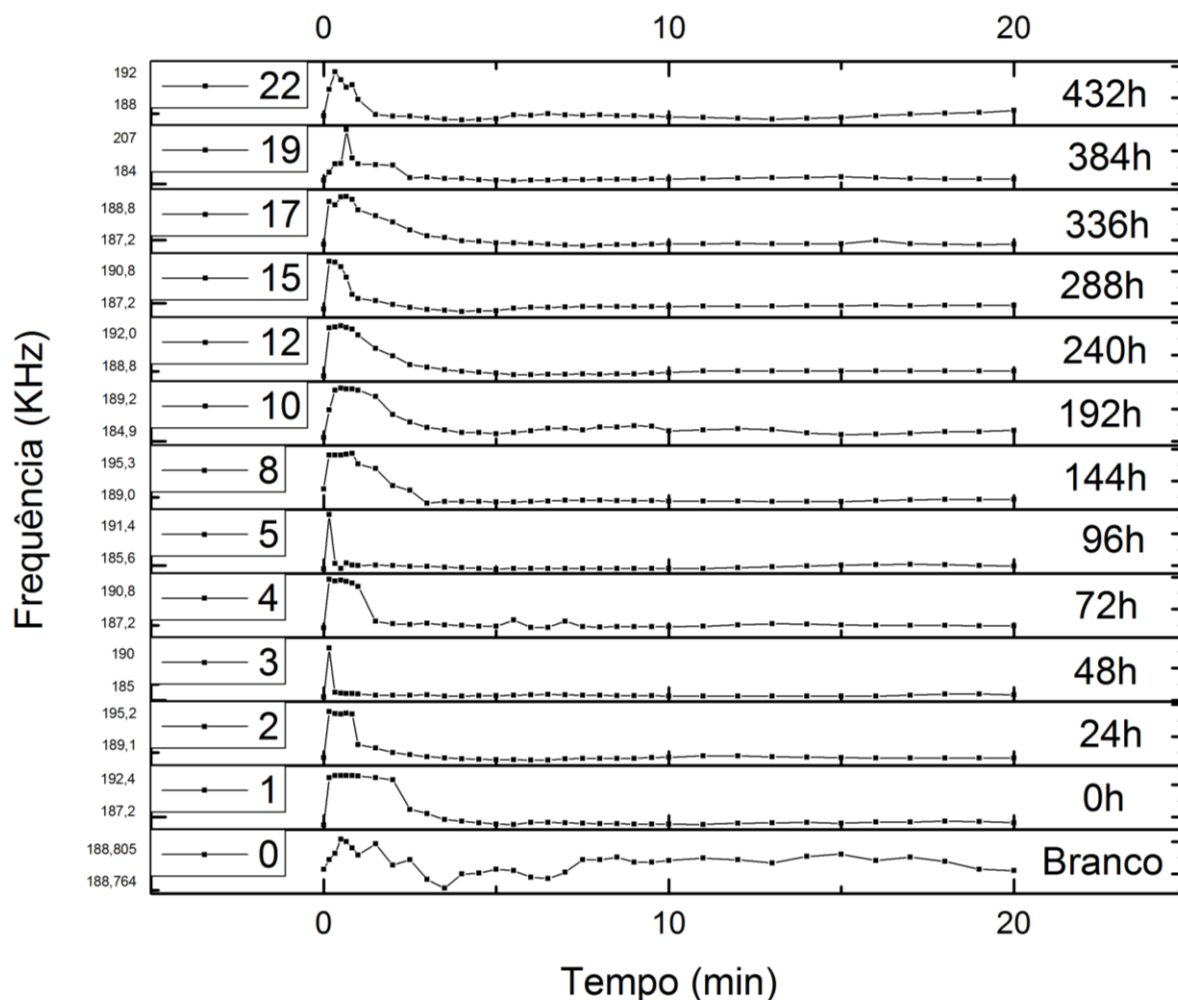
Figura 46 – São comparados a resposta da frequência de ressonância nas condições: Em (A) são comparados: BRANCO – NOVO, resposta de um μC novo sem funcionalização ao vapor da mistura dos voláteis (etanol, diclorometano, hexano e tolueno); BRANCO – Biossensor, μC funcionalizado colocado em exposição ao vapor da mistura dos voláteis (diclorometano, hexano e tolueno); 10,0 μL Etanol (1), μC funcionalizado colocado a exposição de 10,0 μL de etanol e; 61,7 μL Mistura (1) μC funcionalizado colocado na exposição do vapor da mistura dos 4 voláteis. Em (B), resposta do biossensor a 3 ensaios em seqüência com a exposição de 10,0 μL de etanol e em (C), resposta do biossensor a 3 ensaios seguidos com a exposição de 61,7 μL da mistura dos quatro voláteis.



Por intermédio dos gráficos (Figura 46) foi possível observar a seletividade do biossensor mesmo quando exposto ao vapor da mistura de diferentes voláteis. Na situação em que o biossensor foi exposto a mistura dos voláteis sem etanol, foi observada uma pequena diminuição na frequência de ressonância (adsorção) logo no primeiro contato, no entanto no período de tempo de 2 min a frequência de ressonância retornou ao seu valor original. O formato do comportamento da recuperação do biossensor (Figura 40), também se repetiu no ensaio com o vapor da mistura dos voláteis (Figura 46 (B e C)).

Os biossensores funcionalizados por SAM foram submetidos a testes diários para determinar a vida útil e a sensibilidade (Figura 47). Mesmo após 22 dias, o biossensor continuou sensível, no entanto foi constatado um aumento na opacidade, o que começou a dificultar a leitura pelo AFM. Percebeu-se também um aumento no período de tempo para o processamento do analito alvo, pelo período de tempo de recuperação do biossensor.

Figura 47 – Período de tempo de utilização do biossensor com enzima Álcool Desidrogenase. Após 22 dias, o biossensor continuou ativo, porém ocorreu um aumento da opacidade da superfície impedindo o equipamento de realizar a leitura, a variação (KHz) foi a sensibilidade nos 22 ensaios, realizados com vapor de 10,0 µL de etanol.



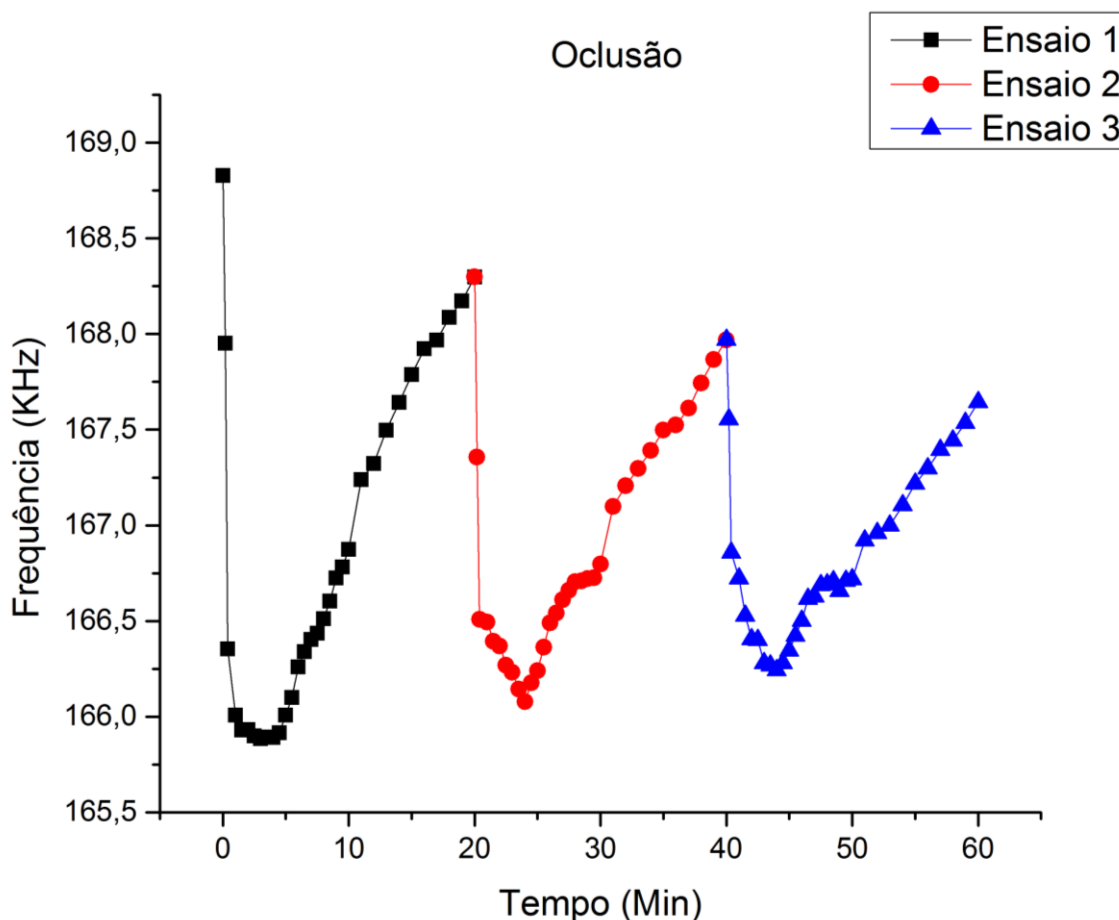
Min (KHz)	185,926	184,615	185,529	185,078	184,948	184,654	186,76	186,284	186,917	186,269	185,358
Max (KHz)	193,919	193,869	193,099	190,531	194,872	194,464	191,683	191,9	189,433	198,222	191,98
Variação (KHz)	7,993	9,254	7,57	5,453	9,924	9,81	4,923	5,616	2,516	11,953	6,622

4.4.2 Oclusão

No processo de oclusão, a ligação do glutaraldeído com os grupamentos laterais das enzimas, forma uma estrutura polimérica funcional (gel) que recobre a haste do μ C com apenas interações fracas entre a camada funcional e o silício/nitreto de silício. Nesta aplicação o μ C não sofre qualquer ativação/modificação química. O glutaraldeído sob temperaturas acima de 20 °C e pH acima de 7,0, inicia o processo de polimerização interligando as moléculas da enzima Álcool Desidrogenase pelos terminais de lisina disponíveis em quase toda superfície. Nesta configuração, o

revestimento funcional não induz qualquer tensão superficial no microcantilever, possibilitando mensurar a quantidade do analito alvo adsorvido na superfície pela redução na frequência de ressonância causada pelo aumento de massa (Figura 48).

Figura 48 – Variação da frequência de ressonância em μC funcionalizado pela técnica de oclusão com adição de vapor de $10\mu\text{L}$ de etanol em três repetições em sequência a cada 20 minutos, com apenas ligações fracas entre a camada sensível e a superfície do microcantilever.

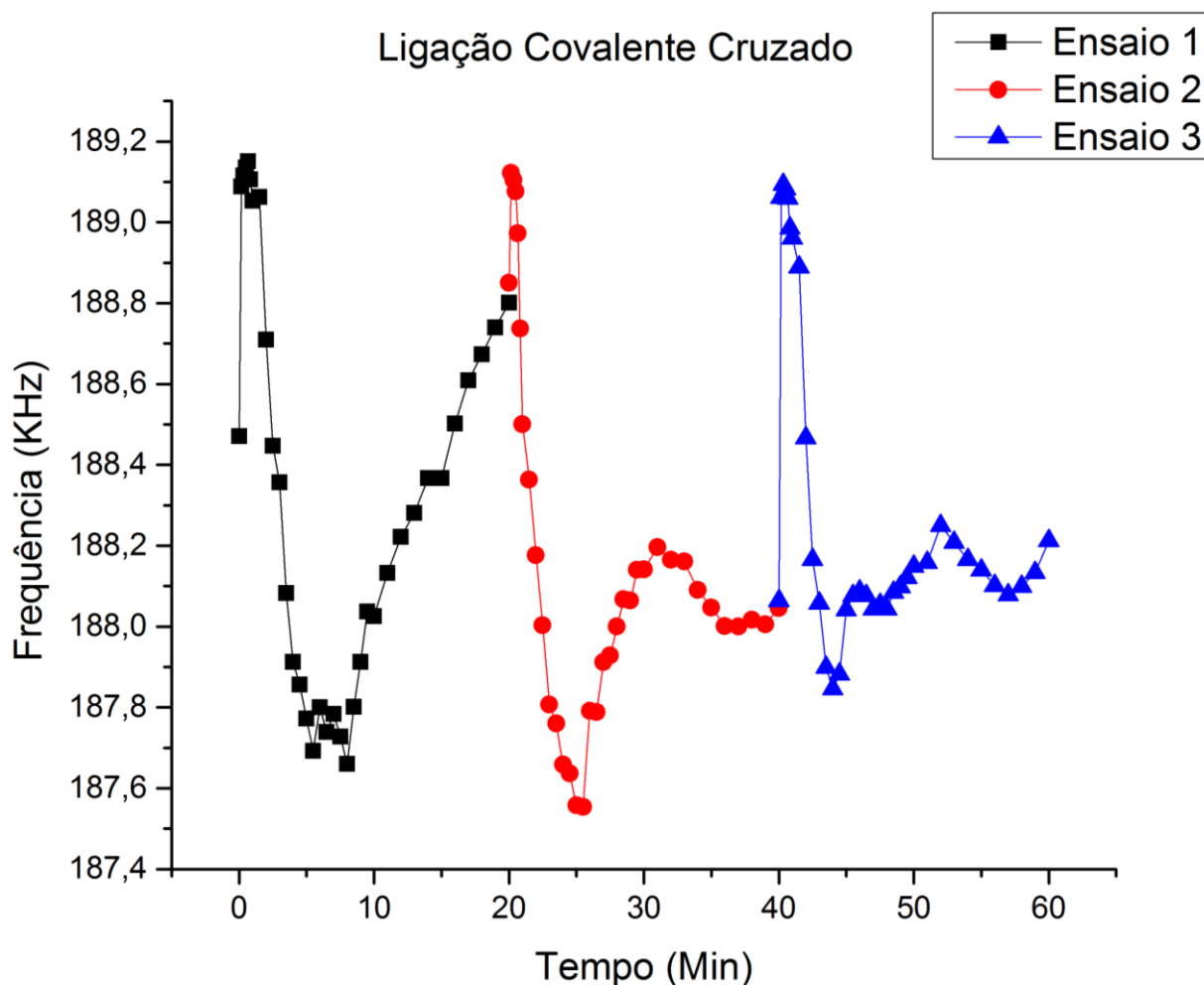


A funcionalização por oclusão não é uma boa opção, pois ocorre o processo de lixiviação muito facilmente devido ao fato da camada funcional estar ligada a superfície do μC apenas por ligações fracas. Outro fato importante a ser considerado, é a dificuldade para controlar a espessura da camada funcional. Como as moléculas bioativas se desprendem com facilidade, o biossensor se torna instável, como se observa o decaimento da sensibilidade a cada ensaio consecutivo no gráfico da Figura 48.

4.4.3 Ligação covalente cruzada

A ligação covalente cruzada utiliza-se do mesmo processo empregado na oclusão, porém o μC é previamente ativado com APTES ou TIOL e a estrutura polimérica formada pelo glutaraldeído e a biomolécula se liga covalentemente ao μC pelos terminais amina (NH_2) disponíveis na superfície. No entanto, a resposta de frequência de ressonância com a exposição ao vapor de etanol é similar ao processo de ligação covalente com camadas auto-organizada (SAM), diferindo apenas no período de tempo de resposta de recuperação. Por possuir uma camada funcional mais espessa e desorganizada esse processo requer mais tempo para atingir o equilíbrio após a exposição ao vapor do etanol (Figura 49).

Figura 49 – Ligação Covalente Cruzado, com três ensaios de 20 minutos em sequência, com a adição de $10\mu\text{L}$ de vapor de etanol em cada repetição.



A ligação covalente cruzada é uma técnica com resultados intermediários entre a ligação SAM e a oclusão, pois sente o efeito da tensão superficial e também o efeito da adsorção em maior escala. No entanto, é muito difícil controlar a espessura da camada funcional sendo também muito sensível a variações de temperatura e principalmente umidade. Dessa forma, o fator qualidade fica geralmente muito baixo dificultando a leitura pelo AFM. Entretanto, esta metodologia possibilitou comprovar que as biomoléculas induziram a tensão superficial no microcantilever, e devido à grande quantidade de moléculas presentes, foi possível registrar o aumento da massa devido à adsorção antes do efeito da tensão superficial ser mais significativo que o aumento de massa do biossensor.

Nos experimentos em que o μC foi apenas limpo em água milli-Q e etanol (sem ativação), não ocorreram à ligação do glutaraldeído nem do APTES/TIOL. Esse fato foi facilmente verificado pois após a limpeza com água para remover os reagentes não ligados, o μC continuou com a mesma frequência de ressonância e fator Q originais.

Outro fato observado, é que o μC logo após a funcionalização não deve ser secado diretamente com gás de nitrogênio e nem colocado em dessecador com pressão efetiva negativa. A retirada brusca da umidade danificou a estrutura da biomolécula causando perda da atividade. Os melhores resultados foram obtidos utilizando um dessecador sem pressão efetiva negativa com sílica gel e armazenando na geladeira a 8,0 °C.

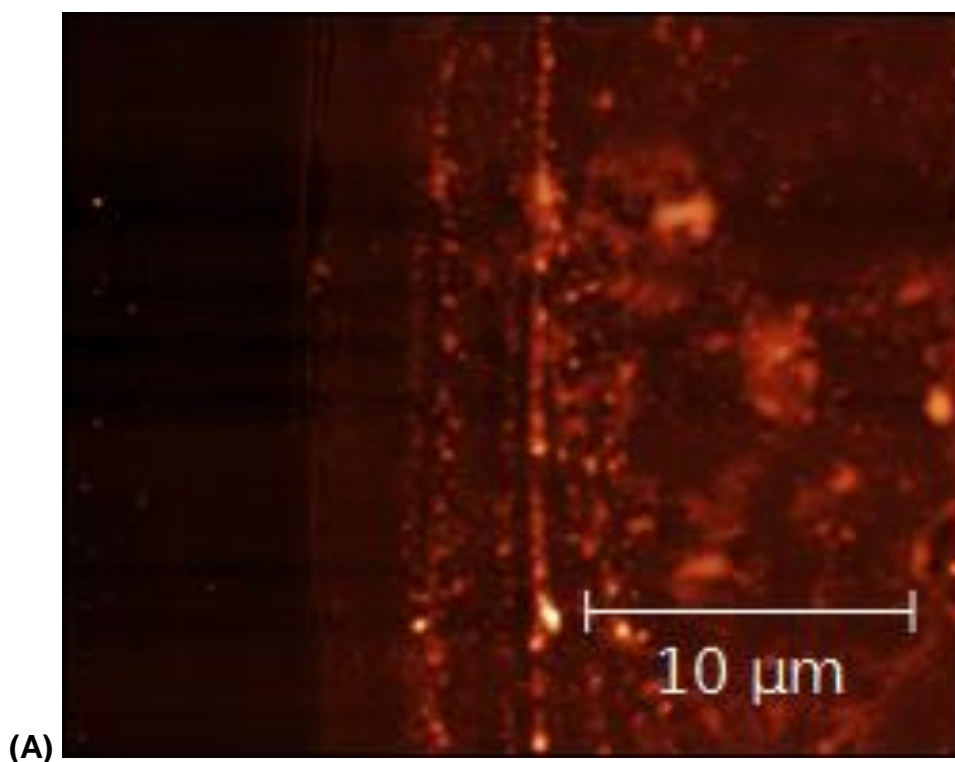
4.5 Caracterização da superfície do biossensor

Os ensaios para observação do comportamento da enzima imobilizada na superfície foram realizados a partir da leitura da superfície da base de um μC funcionalizado por inteiro com um AFM, onde a tensão superficial não é suficiente para o deformar. Para tanto, foi necessário realizar a leitura sobre a mesma área da superfície com e sem o vapor de etanol (analito alvo), e, como ocorre tensão superficial ao adicionar o vapor de etanol, ficou muito evidente o deslocamento da camada funcional na superfície. Dessa forma, foi necessário realizar uma imagem com área em torno de 90 μm^2 para cobrir uma região maior e conseguir localizar exatamente as mesmas regiões para posterior comparação (Figura 50).

Na Figura 50, foi identificada a mesma região para análise e comparação (círculo em azul). Os dados estatísticos da superfície mostraram que a ligação da enzima com o substrato etanol não apenas causou um deslocamento significativo gerado pela tensão superficial, mas também diminuiu a rugosidade. Pela variação da Curtose constatou-se que os picos ficaram mais altos e mais agudos, indicando que ocorreu alguma compressão positiva.

Foram realizadas análises estatísticas da mesma região com e sem a o vapor de etanol, o que possibilitou com grande precisão determinar a variação ocorrida na camada funcional. Foi observada de imediato, a tonalidade mais clara da mesma região com a presença do vapor de etanol (Figura 50 (B) e Figura 51), o que indica que a superfície está mais alta do que a inicial (Figura 50 (A), Figura 52 e Tabela 10).

Figura 50 – Superfície de Si_3N_4 funcionalizada ativada com APTES. Em (A-B) nota-se a esquerda a superfície lisa e mais escura (risco) e marcado com círculos em azul a mesma região em ambas as imagens de $30 \times 30 \mu\text{m}$.



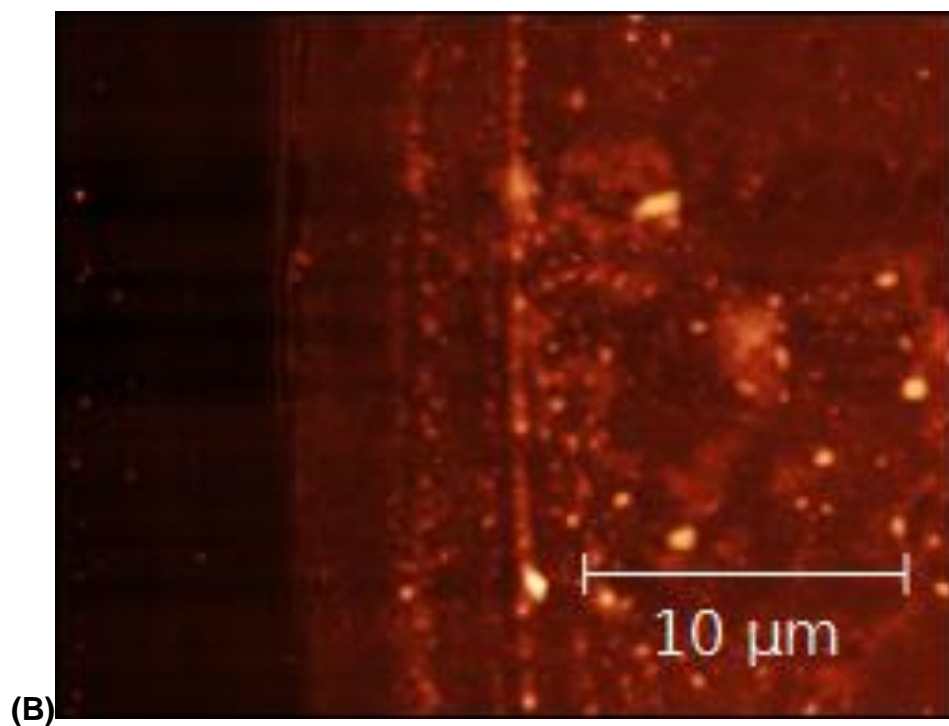


Figura 51 – Imagem da topografia da superfície funcionalizada em 3D sem a presença de vapor de etanol.

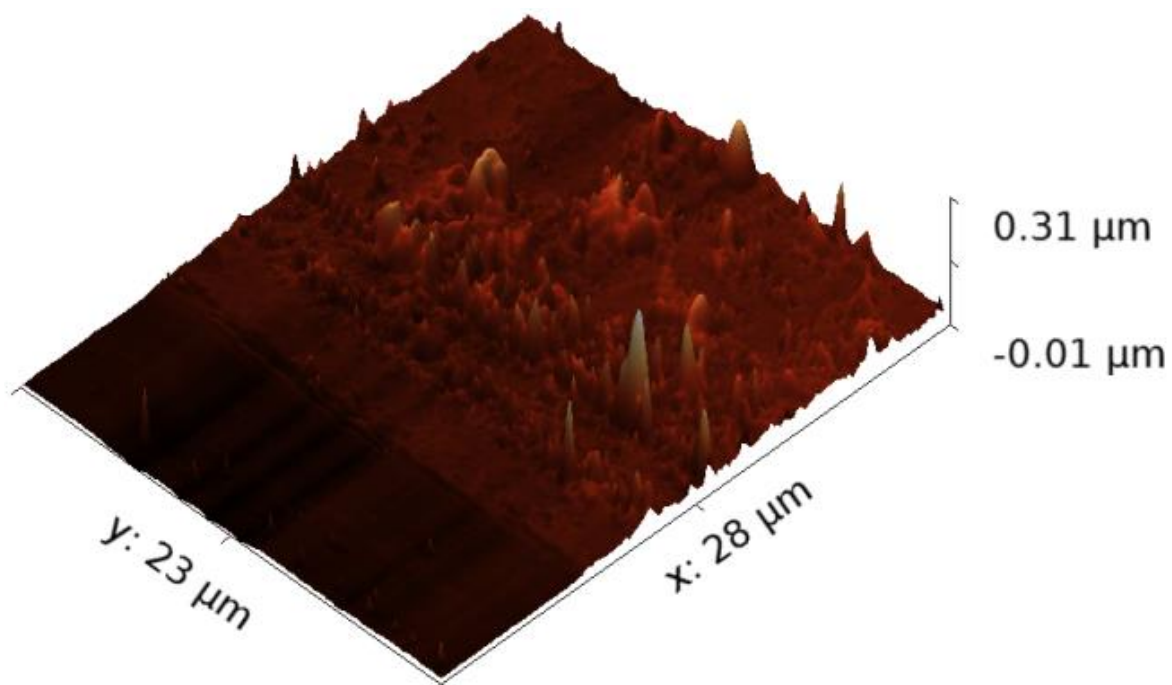


Figura 52 - – Imagem da topografia da superfície funcionalizada em 3D com a presença de vapor de etanol.

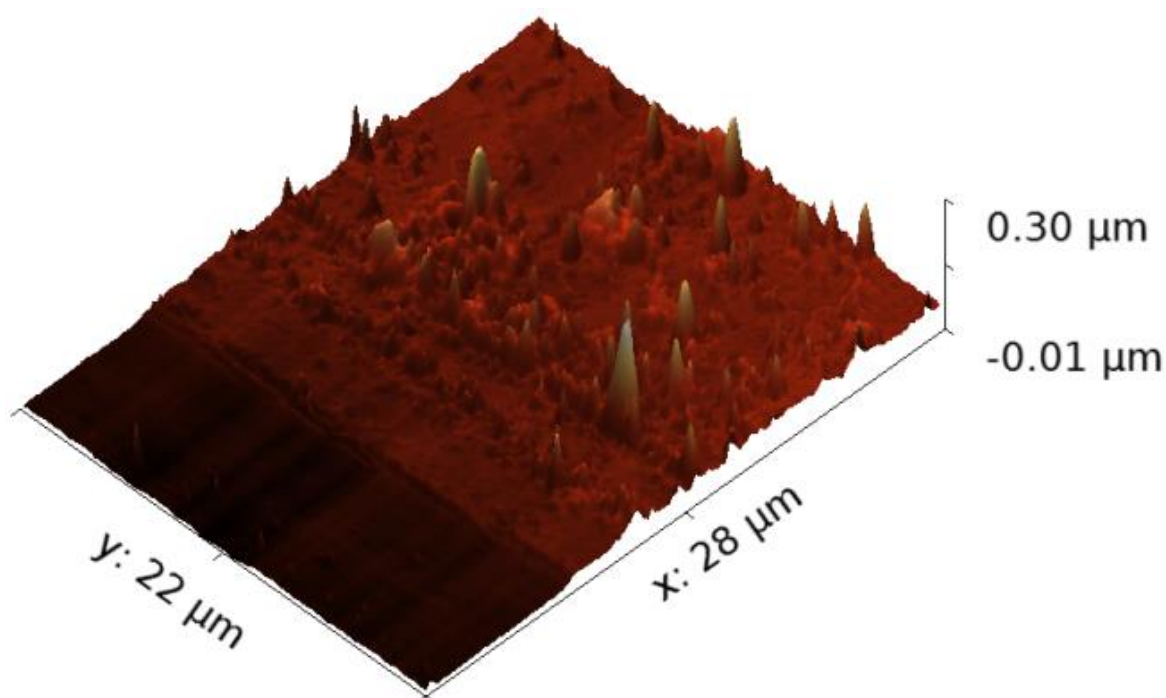


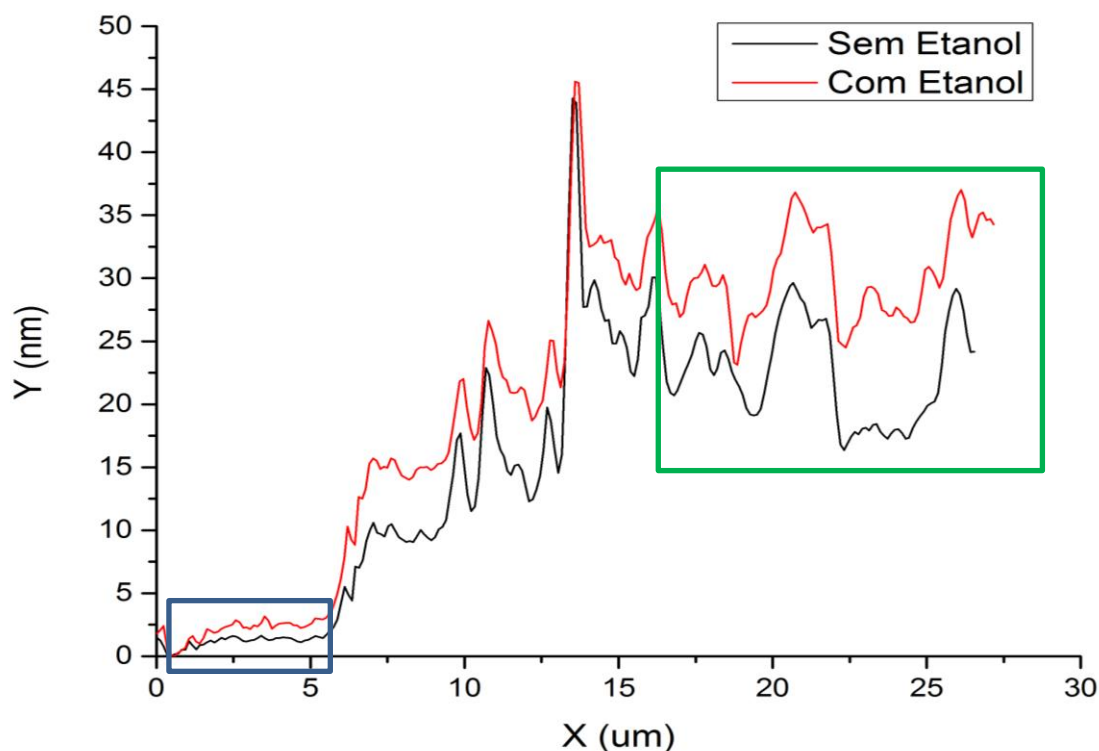
Tabela 10 – Informações estatísticas da superfície funcionalizada com e sem vapor de etanol.

Quantidades estatísticas	Sem etanol, região funcionalizada	Com etanol, região funcionalizada
Área Seleccionada (μm^2)	27,5 × 21,7	27,1 × 21,7
Altura mínima (nm)	4,27	12,14
Altura máxima (nm)	108,37	109,51
Valor médio (nm)	19,32	28,21
Mediana (nm)	16,13	25,53
Rugosidade (nm)	14,00	12,82
Curtose	8,08	13,18

O comportamento da tensão superficial pode ser mais bem observado ao fazer uma secção na área central da imagem, analisando uma região com 70 pontos de largura e comparando ambas as regiões em um mesmo gráfico onde as regiões se sobrepõem (Figura 53). Ao analisar o perfil da topografia, é notável que a

mesma região na presença do etanol apresentou uma altura mais elevada, com menor rugosidade e os picos estão mais agudos, como pode ser observado na Tabela 10.

Figura 53 – Análise da topografia em recorte de 70 pontos na mesma região, com e sem a presença do vapor de etanol.



A região do gráfico demarcada em azul (Figura 53) é a variação da espessura do material do substrato (Tabela 11) e a região demarcada em verde é a camada funcional (Tabela 12). A região intermediária é a rebarba formada pelo repuxo da lamina na camada funcional.

Foi observado na topografia da região em contato com o vapor do etanol, ocorreu uma compressão comparada com a região sem o analito alvo, em função de a Curtose ser mais elevada, significa que os relevos estão mais altos e agudos, indicando uma expansão da superfície.

Tabela 11 – Análise estatística da superfície sem a presença do vapor de etanol, o substrato equivale a região demarcada em azul e a camada funcional a região demarcada em verde no gráfico.

	Sem Etanol	Substrato	Camada Funcional
N total		44	99
Desvio Padrão		0,420	3,927
Mínimo (nm)		0,004	16,361

Média (nm)	1,264	22,724
Máximo (nm)	1,619	30,078

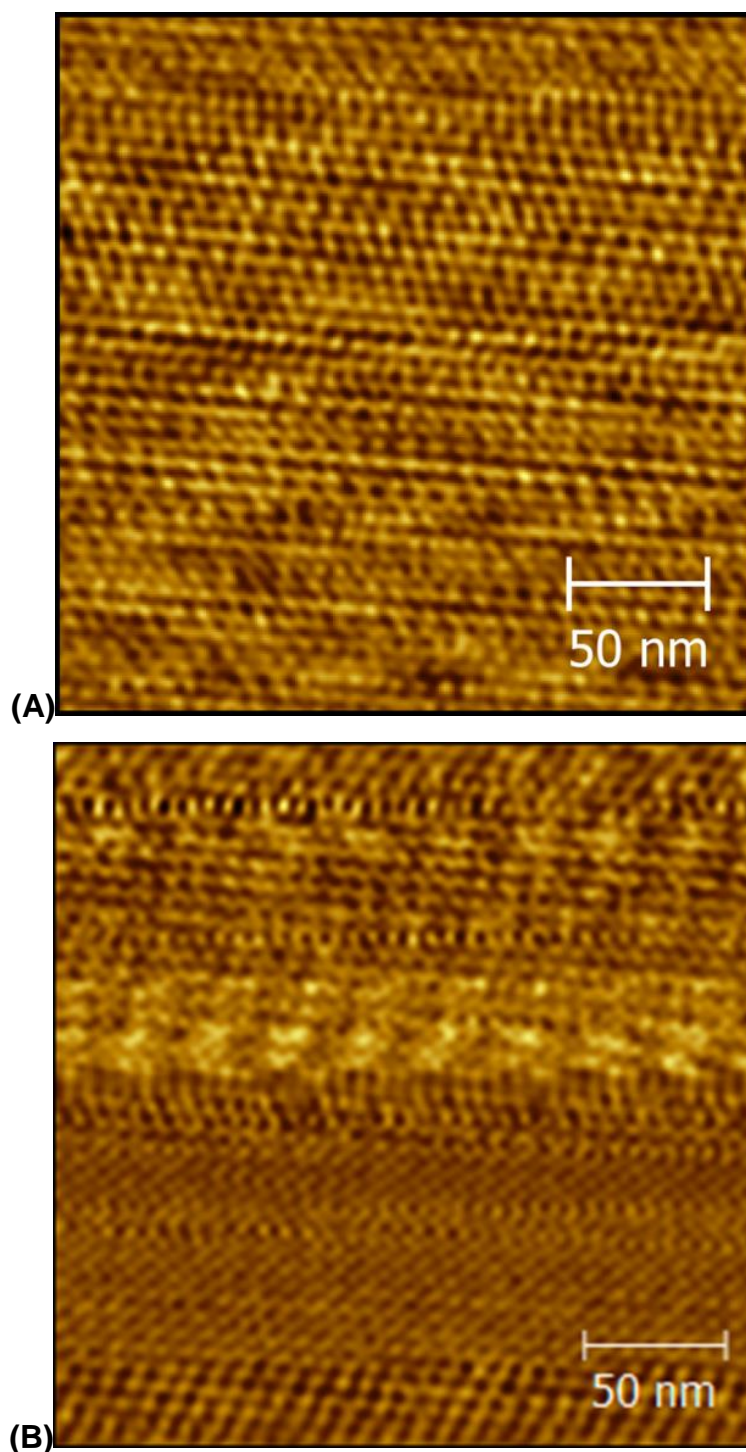
Tabela 12 – Análise estatística da superfície com a presença do vapor de etanol, o substrato equivale a região demarcada em azul e a camada funcional a região demarcada em verde no gráfico.

	Com Etanol	Substrato	Camada Funcional
N total		44	105
Desvio Padrão		0,796	3,448
Mínimo (nm)		0,003	23,121
Média (nm)		2,272	29,685
Máximo (nm)		3,153	37,010

Subtraindo-se a altura da superfície baixa (risco) (Tabela 11) da alta (camada funcional) (Tabela 12) possibilitou estimar a mudança da camada funcional com e sem a presença do etanol. Na situação (A), a altura estimada na região funcionalizada foi de $21,46 \pm 3,927$ nm e em (B), $27,413 \pm 3,448$ nm, uma variação média de $5,593 \pm 3,927$ nm, ou seja, aumento de 22,22 %.

Para fazer uma imagem da topografia em escala nanométrica, foi necessário encontrar uma região plana sem grumos ou imperfeições, o que possibilitou mensurar as enzimas imobilizadas na superfície, a imagem foi tratada pelo método de Fourier (Figura 54).

Figura 54 - Em (A) Enzima álcool Desidrogenase ligada em monocamada na superfície de silício na ausência de vapor de etanol e em (B) com vapor de etanol ligado ao sítio ativo, imagens de 200x200 nm.



Ampliando a Figura 54(A e B) foi possível analisar as mudanças na superfície em escala nanométrica (Figura 55 e Figura 56), pode-se analisar as imagens em dimensões de 90x90 nm detalhando a distribuição das enzimas, permitindo uma

comparação do diâmetro das moléculas presentes na ausência e presença do vapor de etanol.

Figura 55 - Leitura sem etanol (50x50 nm): média dos diâmetros das enzimas de 5,98 nm, desvio padrão de $\pm 0,539$ e erro experimental de 9,01 %.

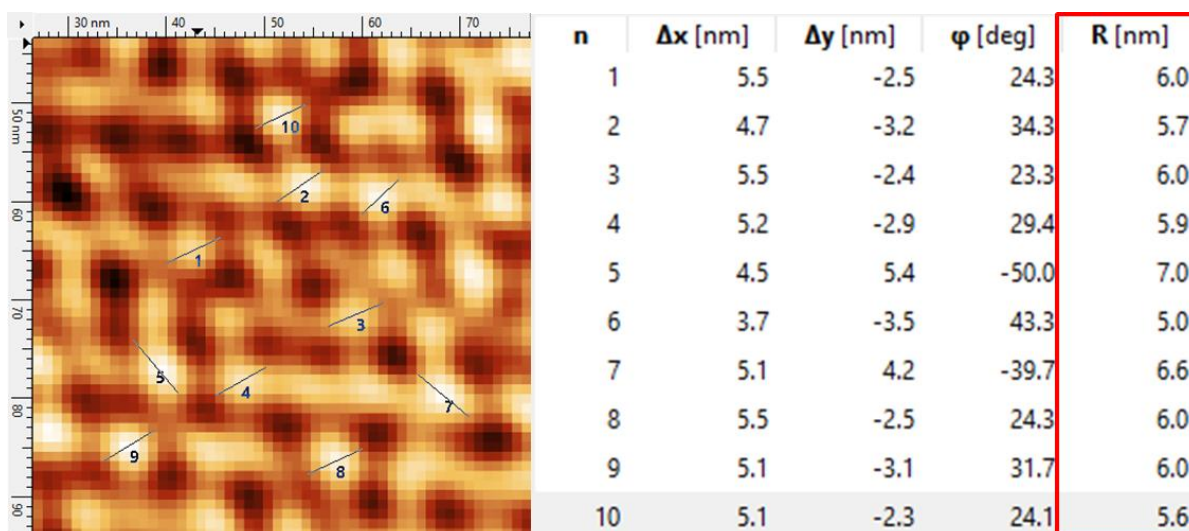
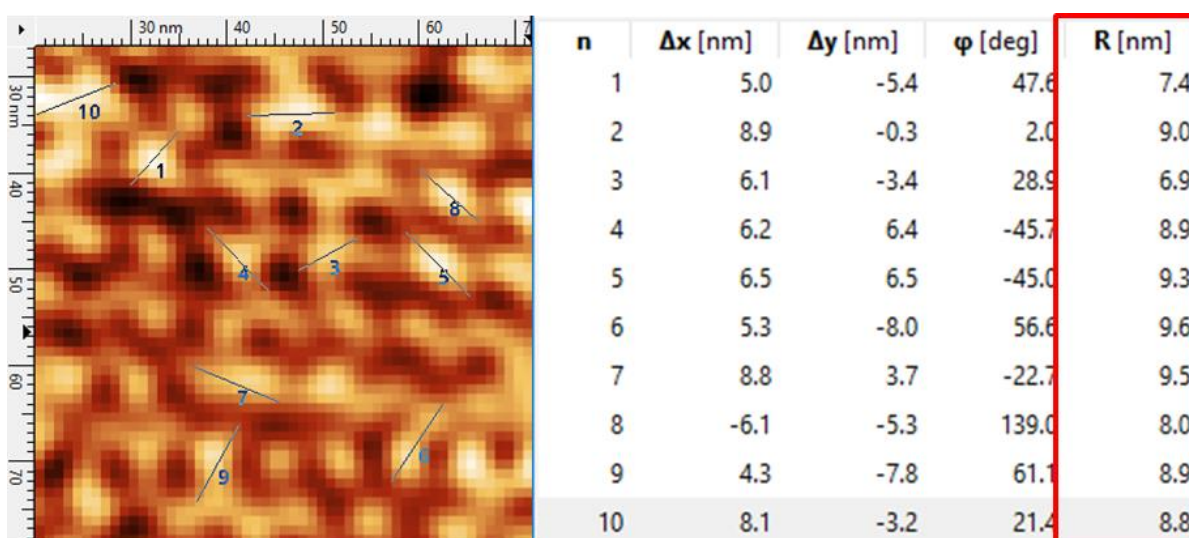


Figura 56 - Leitura com etanol (50x50 nm): média dos diâmetros das enzimas de 8,64 nm, desvio médio padrão de $\pm 0,71$ e erro experimental de 8,29 %.



O diâmetro das enzimas com a presença de etanol no sítio ativo, conferido no software Discovery Studio 4.5, é de 9,05 nm no maior eixo. Tal dado mostrou-se condizente com a medida feita por AFM sobre a camada funcional, com média de 8,64 nm, desvio médio de $\pm 0,71$ e erro experimental de 8,29 %. Foi identificada experimentalmente uma mudança de aproximadamente 30 % na conformação da

enzima ligada ao etanol em relação a não ligada, o que se supõe ser a causa do aumento da tensão superficial na superfície do microcantilever. Esse fato também foi confirmado experimentalmente pela diminuição da rugosidade e aumento da espessura e Curtose da camada funcional com o etanol ligado aos sítios ativos das enzimas.

4.6 Recuperando Microcantilevers

Devido ao alto custo dos microcantilevers, demora na aquisição devido a dificuldades no processo de importação e somado a situação econômica atual, torna-se necessário o desenvolvimento de alternativas viáveis para a recuperação dos microcantilevers e sua reutilização em biossensores. Além disso, a necessidade de uma grande quantidade de microcantilevers para sucessivos ensaios e também devido a extrema fragilidade desse item, a busca por meios de recuperação desse material torna-se cada vez mais interessante.

Na tentativa de recuperar os microcantilevers funcionalizados, foram testados diversos ácidos como H_2SO_4 , HCl , HNO_3 e algumas bases fortes. No entanto, em todas as situações houve a formação de resíduos que permaneceram ligados a superfície, impossibilitando a reutilização dos microcantilevers. Técnicas mais agressivas como raspagem e mesmo a utilização de ultrassom se mostraram inviáveis devido às dimensões do μC e sua fragilidade.

A melhor solução encontrada foi por intermédio do emprego de tratamento térmico, levando em consideração a temperatura de ebulição de cada componente da camada funcional e o ponto de fusão dos componentes do μC (Tabela 13). Várias temperaturas e períodos de tempo de exposição foram testados.

Microcantilevers com revestimento de Ouro, Alumínio ou que são dopados de Antimônio, em temperaturas acima de $600\text{ }^\circ C$ deterioram demasiadamente a superfície refletiva do microcantilever, ficando com aspecto poroso e espalhando o feixe de laser. O ideal é fazer com que o laser reflita bem na ponta da haste, mas dependendo da deterioração da superfície é necessário fazer uma varredura no μC até encontrar um ponto de menor espalhamento. A temperatura de $700\text{ }^\circ C$ /2h gerou

danos graves a superfície da haste e aumentou a frequência de ressonância em torno de 2 %.

A temperatura de 500 °C por 8 h com resfriamento de 10 °C/min causou mínimo dano à superfície refletiva quando observado o espalhamento do laser no fotodetector e não alterou as características físicas do microcantilever. Apenas sobraram alguns resíduos (pó) na haste os quais foram facilmente removidos com imersão em solução Piranha por 30 segundos (Figura 58).

Tabela 13 – Ponto de Fusão e Ebulição dos principais componentes de um biossensor (WHITESELL, 1998)

Material	Ponto de Fusão (°C)	Ponto de Ebulição (°C)
Silício	1,414	2,357
Ouro	1,064	2,970
Alumínio	660,3	2,470
Antimônio	630,8	1,587
Glutaraldeído	-14,0	187,0
APTES		213,0 – 216,0
Etanol	-114,0	78,4

De uma forma geral, a maioria dos compostos orgânicos se decompõe a temperaturas inferiores a 300 °C. Utilizando uma mufla a 500 °C/8h foi constatada a degradação total da camada funcional, com formação de alguns poucos grânulos escuros soltos (carvão) que ao lavar em água Milli-Q ou etanol a remoção não foi completa (Figura 59(B)). Esse aspecto pode ser observado pelo contorno escuro entre os grãos da superfície. Entretanto, a remoção desses resíduos foi completa após tratamento do μC em solução Piranha por alguns segundos (Figura 58(B e C)). Com temperaturas abaixo de 400 °C não temos garantias que irá ocorrer deterioração total da camada funcional e como foi verificado, acima de 600 °C ocorre a deformação da superfície refletiva de ouro e alumínio, tornando-a opaca ou com grande porosidade e espalhando o feixe refletido.

Outros benefícios do tratamento térmico foram constatados, como o auxílio na formação da oxidação da superfície do μC (grupamento OH), tornando desnecessária a utilização da solução Piranha por períodos de tempo de 5 minutos antes de outra funcionalização, alguns segundos foram o suficiente. Para microcantilevers com

revestimento de ouro, o tratamento térmico proporcionou uma melhor adesão do ouro a superfície do microcantilever, constatado não apenas pelo descolamento visível na caixa de armazenamento (Figura 57), mas também quando em tratamento com solução Piranha e pela mudança na frequência de ressonância com aumento em ordem de 5 %.

Figura 57 – (A) Descolamento do banho de ouro da superfície dos microcantilevers novos quando retirados da caixa de armazenamento (posições de 6 a 20), (B) tratamento térmico dos microcantilevers.

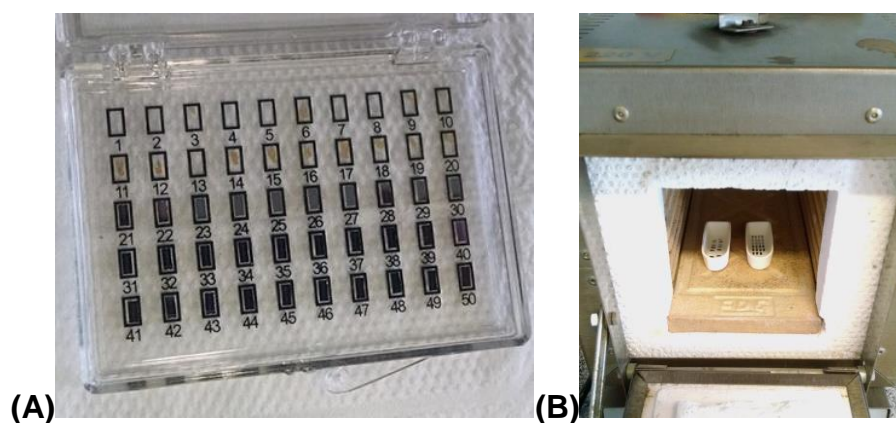
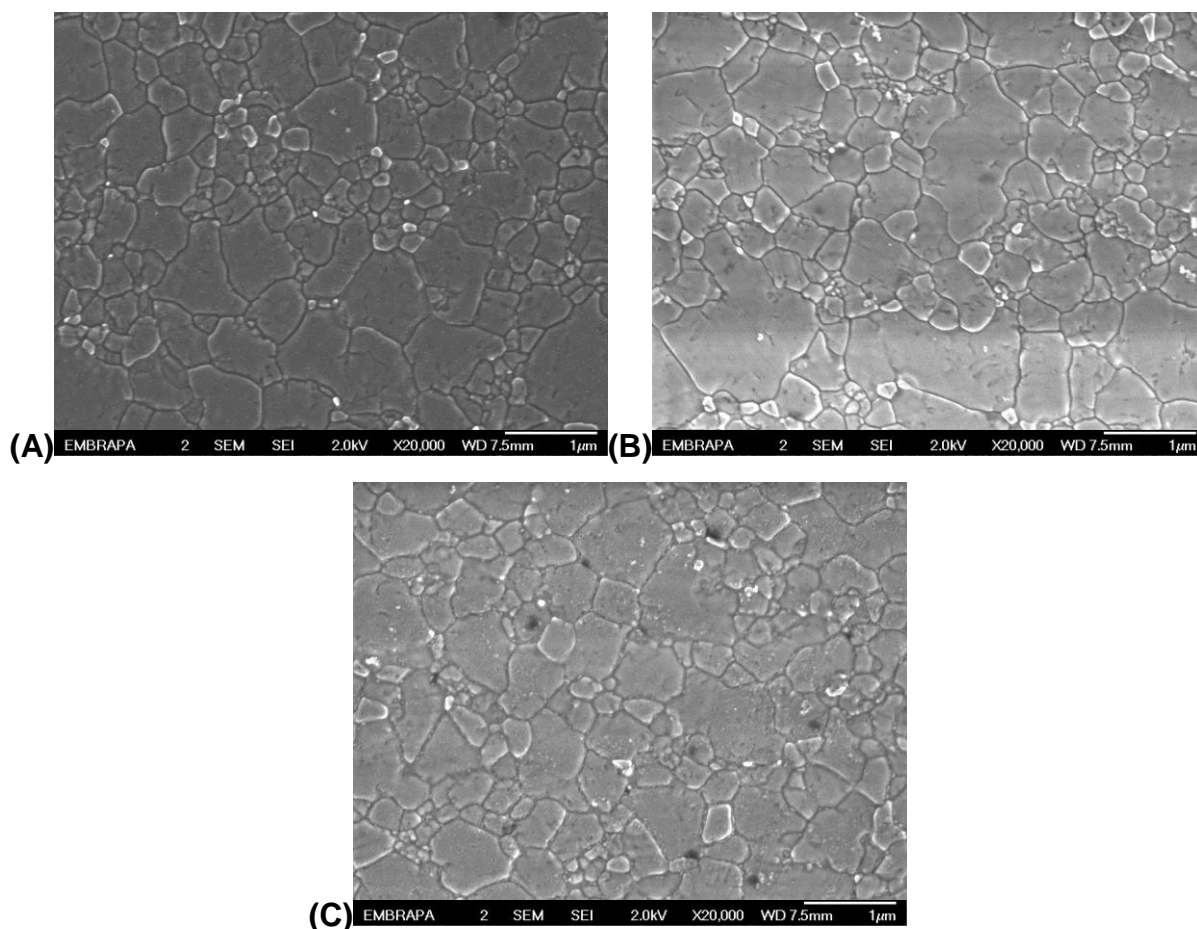
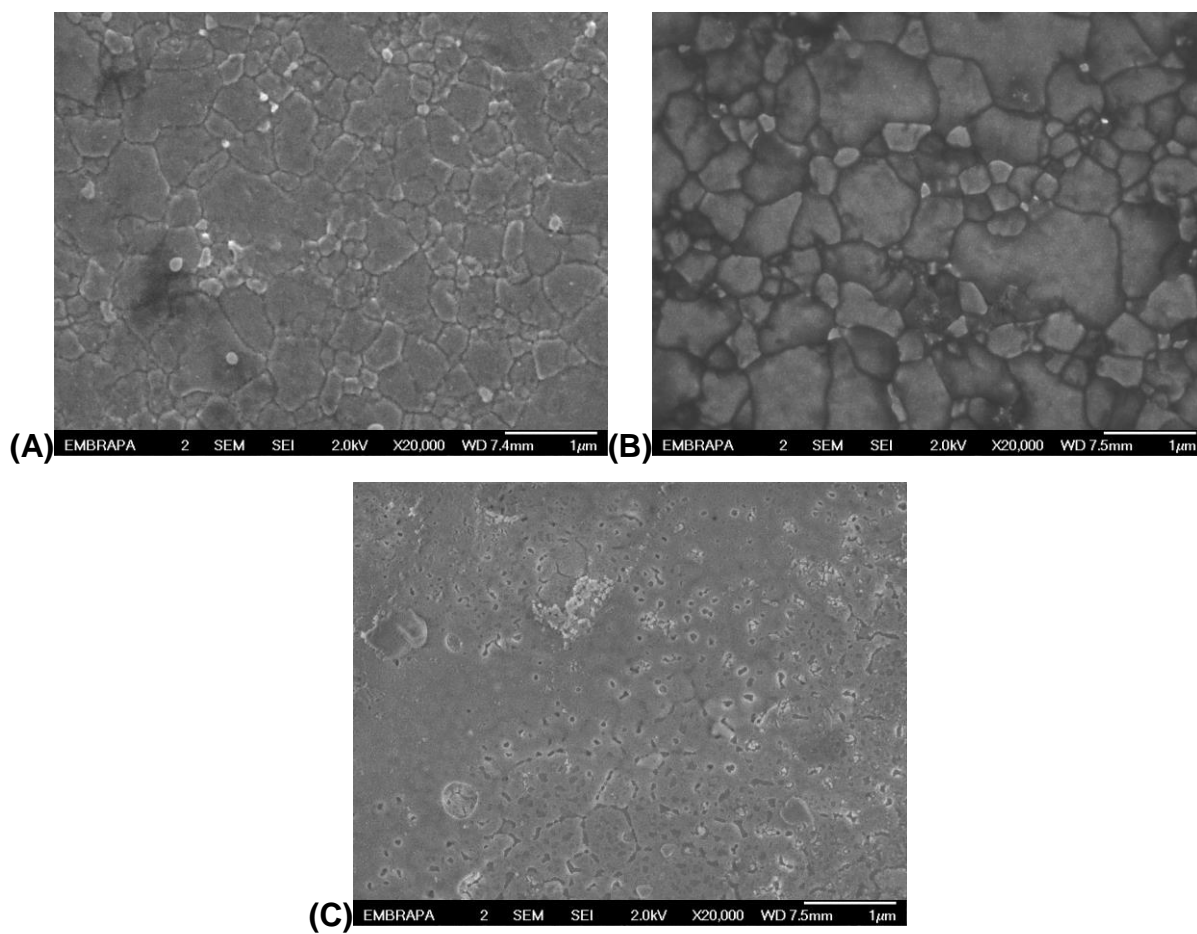


Figura 58 – (A) Microcantilever novo, (B) funcionalizado e recuperado por tratamento térmico 500 °C 8h e limpo com solução Piranha (C) funcionalizado e recuperado por tratamento térmico 500 °C 16 h limpo com piranha.



Mesmo após dois tratamentos térmicos e seguido de limpeza rápida com solução Piranha os microcantilevers mantiveram suas características físicas praticamente inalteradas, porém a ativação deixa a superfície mais opaca a cada processo de funcionalização. Os biossensores obtiveram sucesso a até dois processos de recuperação, a partir do terceiro a superfície apresentou opacidade elevada ao ponto de impedir a reflexão do laser e não operar devidamente no equipamento de AFM. Nos microcantilevers TAP300G, compostos somente por Si (100), sem recobrimento refletor, temperaturas de até 700 °C por 8 h pouco influenciaram em suas características físicas, e a partir de 900 °C por 8 h suas características físicas foram alteradas de forma significativa, inutilizando o μC (Figura 59).

Figura 59 – Em (A) Superfície funcionalizada, (B) Superfície funcionalizada e depois tratamento térmico por 500 °C por 8 h e limpa somente com etanol, (C) Tratamento térmico por 900 °C por 8 h.



Capítulo 5

CONCLUSÕES E SUGESTÕES

Neste trabalho, foram avaliadas por intermédio do modo dinâmico de leitura em AFM, as alterações das respostas de frequência de ressonância em microcantilevers funcionalizados por diferentes metodologias empregando a enzima Álcool Desidrogenase em diferentes condições de temperatura e umidade relativa. Dessa forma, apresentamos um biossensor que utiliza método de transdução bioquímico, diferente dos sensores químicos convencionais.

5.1 Enzima Álcool Desidrogenase

A enzima Álcool Desidrogenase teve primeiramente sua atividade testada em meio aquoso, no entanto, também apresentou atividade quando imobilizada na superfície do microcantilever. Sugerimos pelo fato da enzima imobilizada não possuir o β -NAD em seus sítios ativos, a molécula de etanol se liga ao sítio, mas não ocorre qualquer transformação na molécula, e esta acaba se desligando por lixiviação. Tal fato foi constatado nos ensaios com o AFM devido ao aumento de massa e mudança na tensão superficial durante o experimento apenas com os analitos alvos que se ligam a enzima.

5.2 Resultados experimentais

Ao modificar a superfície do μC com camadas funcionais bioativas, confeccionadas com os mesmos reagentes, mas de arranjos diferentes, obtivemos comportamentos distintos de acordo com as condições a que foram aplicados.

Com a utilização de técnicas de XPS, foi possível caracterizar o processo de ativação dos microcantilevers, que é um dos passos mais importantes e significativos na obtenção dos biossensores.

Mesmo utilizando microcantilevers com hastes de comprimento e constante de mola (k) diferentes, o comportamento físico sob diversas condições se assemelhou proporcionalmente, demonstrando que hastes mais longas com constante de mola baixa estão mais propensas a interferências do ambiente como umidade relativa, temperatura e tendem a formar dois ou mais picos de ressonância, que dependendo da proximidade inviabiliza a aplicação em modo dinâmico. Os experimentos mostraram que o biossensor que apresentou melhor estabilidade, sensibilidade e período de tempo de resposta foi o funcionalizado com somente ligações covalentes auto-organizada (SAM) em todas as etapas e ativado por vapor de APTES. Esse biossensor apresentou espessura mais próxima à calculada pela soma do comprimento de cada monocamada aplicada. Também ficou comprovado que o μC mais próximo do ideal para aplicação em biossensores operando em condições ambientes, e no modo dinâmico, preferivelmente possuir uma haste entre 80 a 130 μm . Dessa forma, fornecerá uma área suficiente para ligar uma quantidade significativa de biomoléculas e apresentará uma constante de mola k superior a 20 N/m. Quanto mais alta a frequência de ressonância natural, maior é sua variação quando em contato com o analito alvo, desta maneira obtivemos fatores de qualidade (Q) próximos do μC novo, com picos de ressonância bem definidos e sem a formação de picos secundários próximos, gerando pouco ofuscamento da superfície, maior sensibilidade e menor período de tempo de resposta. A umidade relativa é um fator determinante no amortecimento do microcantilever, tendo maior influência em revestimentos mais espessos que possibilitam maior adsorção. A ligação cruzada em ambas as situações demonstrou não haver ganhos quanto a variação da amplitude de vibração, principalmente em temperaturas mais baixas onde pode ocorrer o congelamento da camada superficial, amortecendo a vibração da haste.

Em biossensores confeccionados com os mesmos reagentes, mas de arranjos diferentes, concluiu-se que somente quando há ligações covalentes entre a superfície do μC e a camada funcional, é constatado o efeito da tensão superficial. Esse efeito pode ser facilmente detectado pelo aumento da frequência de ressonância, o que possibilitou identificar e quantificar a concentração de etanol necessária para alterar a tensão superficial.

Imagens realizadas com o microscópio de força atômica (AFM) possibilitaram analisar e comparar a topografia da superfície funcionalizada, com e sem a ligação do analito alvo ao sítio ativo das enzimas presentes na superfície. Foi observado também, nas imagens topográficas da superfície funcionalizada com e sem a presença de etanol, sendo com a presença do vapor de etanol um aumento na altura em torno de 22 % e o diâmetro médio das enzimas aumentado em aproximadamente 30 %, tendo em vista a diminuição da rugosidade e aumento da Curtose, sugerindo que a mudança conformacional da enzima realizada para o analito alvo se ligar no sítio ativo é um dos principais motivos pelo qual ocorre a mudança na tensão superficial. A operação em modo dinâmico permitiu detectar desde a menor variação da massa adsorvida na camada bioativa (poucas moléculas), até o momento em que a tensão superficial foi mais significativa que o aumento da massa, estimando pela variação frequência da ressonância a concentração do analito alvo diluído em meio gasoso. No modo estático a detecção se inicia quando a tensão superficial é suficientemente grande para iniciar a flexão da haste do microcantilever. Por todas estas observações, estamos supondo que além das interações intramoleculares, intermoleculares e termodinâmicas ocorridas nas enzimas ao se ligar o analito alvo, a mudança conformacional das enzimas desempenhou uma expressiva e notável mudança na rugosidade e espessura da camada funcional do microcantilever.

A biomolécula imobilizada na superfície permitiu a geração de um biossensor seletivo e com período de tempo de resposta rápido e sensível. Como a enzima imobilizada é grande em tamanho, bem maior do que a distância de dois terminais da superfície ativada, não foi observada diferença na sensibilidade na metodologia de ativação, mas certamente pelo fato da ativação com TIOL ser mais densa do que com APTES, possivelmente com biomoléculas de tamanho reduzido talvez podemos supor que tenha uma maior densidade de moléculas ligadas a superfície e conseqüentemente maior sensibilidade.

A enzima Álcool Desidrogenase obteve boa fixação ao microcantilever, sem perder a atividade e mesmo com sucessivas limpezas com solução tampão não ocorreu a remoção das biomoléculas. Foram testados diversos compostos orgânicos voláteis e somente as moléculas compatíveis com o sítio ativo da enzima realizaram ligação, constatado pela variação da frequência de ressonância. Outras maneiras de funcionalização também se mostraram sensíveis ao analito alvo, porém o fato de possuírem uma camada funcional mais espessa causaram diversos efeitos indesejados: como a redução do fator qualidade (Q) (aumentando o erro de leitura do AFM), aumento da opacidade da superfície refletora, oscilação da frequência de ressonância em repouso, alta susceptibilidade a variações de temperatura e da umidade relativa (UR(%)). Também foi comprovado a relação da biomolécula com o aumento da tensão superficial no microcantilever. A camada funcional mostrou-se estável e sensível em até 22 dias de experimentos aplicando vapor de etanol em excesso. Após este período o biossensor continuou sensível, porém aumentou o período de tempo de recuperação após a exposição ao analito alvo e apresentou um aumento na opacidade da superfície dificultando a leitura pelo AFM.

Os microcantilevers funcionalizados foram armazenados a 8,0 °C por 4 semanas, apresentando maior sensibilidade de 2 a 3 dias após a funcionalização. Após este período a sensibilidade se mantém praticamente estável, e após 4 semanas torna-se instável e com a leitura dificultada no AFM.

A detecção do biossensor, por intermédio do arranjo experimental desenvolvido, se iniciou com a concentração de 100 ppm em condições ambiente (pressão 1 ATM, 25,0 °C e UR 50,0%) até o limite de 230.000 ppm (Tabela 14). Sensores comerciais cerâmicos resistivos de alta sensibilidade (MQ-3 GAS SENSOR - HANWEI ELETRONICS CO. LTD) iniciam a detecção em 25 ppm até 5.000 ppm em condições ambiente, no entanto não são seletivos, ou seja, a presença de voláteis será detectada, mas não será possível a identificação do reagente presente. O biossensor por intermédio do AFM em condições específicas (baixa pressão e temperatura) alcança sensibilidade na ordem de ppt (partes por trilhão).

Tabela 14 – Características e parâmetros do biossensor desenvolvido na obtenção dos melhores resultados (SAM), considerando distúrbios provocados pelo ambiente.

Características e parâmetros do biossensor desenvolvido	
Sensibilidade	100 a 230.000ppm de etanol
Reprodutibilidade	>90%
Repetitividade	15 ensaios (93%)
Faixa ótima de temperatura	25,0 ± 3,0 °C
Umidade Relativa	0,2 a 50%
Tempo de meia vida	432h
Temperatura de armazenamento	8,0 °C
pH Ótimo	8,6
Linearidade	Não linear
Tempo de resposta	<1s
Transdutor	Mecânico/ótico
Sinal de saída	Frequência de ressonância (KHz)
Seletividade	Etanol, Metanol e Isopropanol
Microcantilever	Si e Si ₃ N ₄

5.3 Contribuições e Limitações

Neste trabalho, os biossensores com μC analisados em modo dinâmico em AFM, permitiram identificar qual o melhor processo de confecção assim como as reações a diversas concentrações diferentes e a diferentes voláteis orgânicos. Os resultados obtidos auxiliaram na identificação das suspeitas ao qual ocorre a modificação na tensão superficial com a aplicação de revestimentos com biomoléculas, a comprovação da atividade das biomoléculas imobilizadas e a caracterização da superfície em cada etapa. As únicas limitações somente foram para aquisição de alguns equipamentos e materiais laborais.

5.4 Lições aprendidas

Diferente do que se aprende em engenharia, quando se trabalha com biossensores inúmeros fatores fazem com que a reprodutibilidade exata na confecção seja muito difícil, ou talvez impossível com as tecnologias atuais, pois ainda não temos a produção de microcantilevers com exatamente as mesmas características físicas. Mesmo sendo da mesma marca e modelo, há diferenças na frequência de ressonância e dimensões, varia-se também a constante de mola k , os reagentes também sofrem pequenas mudanças de lote para lote e a forma como são armazenados e transportados pode interferir no procedimento experimental. O correto processo de imobilização da biomolécula também depende de fatores externos como contaminação, qualidade da ativação da superfície, controle de umidade relativa, pH e temperatura.

5.5 Trabalhos Futuros

Como perspectiva, é de extrema importância utilizar todo o conhecimento e potencial adquirido neste trabalho para a geração de novos modelos de biossensores, seja com o intuito de realizar a imobilização de diferentes biomoléculas ou na aplicação de outros métodos de imobilização e ativação da superfície de microcantilevers como, por exemplo, a utilização de plasma de oxigênio para a limpeza e oxidação do silício e aplicação de polímeros como polietilenoglicol para adesão de biomoléculas. A modelagem computacional da enzima Álcool Desidrogenase também poderá auxiliar no reconhecimento de sua mudança conformacional e nos fenômenos físicos e químicos que ocorrem com a interação do sítio ativo com o analito alvo. Outras aplicações na agricultura podem ser propostas, com o uso da metodologia de desenvolvimento de biossensores, tais como: a) detecção de feromônios, de interesse de doenças da agropecuária, como a questão do bicudo do algodão; b) O amadurecimento de frutas; c) O estado da maturação de carnes; d) Detecção de determinados agentes patológicos, e) Detecção de explosivos, f) Detecção de drogas, g) Detecção de infecções hospitalares e h) Aplicação como

biossensor para os novos métodos de fenotipagem de plantas, para a detecção de VOCs relacionados a doenças de plantas. Ainda como sugestão de trabalhos futuros, observa-se da literatura especializada arrays de microcantilevers com até 8 agulhas em uma única base, o que permite a criação de biossensores para análise de diferentes analitos alvos simultaneamente.

REFERÊNCIAS

ACRES, R. et al. Molecular Structure of 3-Aminopropyltriethoxysilane Layers Formed on Silanol-Terminated Silicon Surfaces. **Journal of Physical Chemistry C**, v. 116, n. 10, p. 6289-6297, MAR 15 2012 2012.

ALBRECHT, T. R. et al. Microfabrication of Cantilever Styli for the Atomic Force Microscope. **Journal of Vacuum Science & Technology a-Vacuum Surfaces and Films**, v. 8, n. 4, p. 3386-3396, Jul-Aug 1990.

ATAVIN, V. G.; KURANOV, V. V.; KHUDYAKOV, Y. V. Determination of the errors of resonance frequency and quality factor measurements from the resonance curves of vibration amplitudes. **Measurement Techniques**, v. 46, n. 3, p. 249-253, Mar 2003.

BAIN, C.; EVALL, J.; WHITESIDES, G. FORMATION OF MONOLAYERS BY THE COADSORPTION OF THIOLS ON GOLD - VARIATION IN THE HEAD GROUP, TAIL GROUP, AND SOLVENT. **Journal of the American Chemical Society**, v. 111, n. 18, p. 7155-7164, AUG 30 1989 1989.

BARR, T.; SEAL, S. NATURE OF THE USE OF ADVENTITIOUS CARBON AS A BINDING-ENERGY STANDARD. **Journal of Vacuum Science & Technology a-Vacuum Surfaces and Films**, v. 13, n. 3, p. 1239-1246, MAY-JUN 1995 1995.

BAUSELLS, J. Piezoresistive cantilevers for nanomechanical sensing. **Microelectronic Engineering**, v. 145, p. 9-20, SEP 1 2015 2015.

BENSEBAA, F. et al. Kinetics of formation of long-chain n-alkanethiolate monolayers on polycrystalline gold. **Langmuir**, v. 13, n. 20, p. 5335-5340, OCT 1 1997 1997.

BERGER, R. et al. Surface stress in the self-assembly of alkanethiols on gold probed by a force microscopy technique. **Applied Physics a-Materials Science & Processing**, v. 66, p. S55-S59, Mar 1998.

BOWEN, J. et al. On the calibration of rectangular atomic force microscope cantilevers modified by particle attachment and lamination. **Measurement Science & Technology**, v. 21, n. 11, Nov 2010.

BRUKER. **NanoScope V Controller Manual**. CORPORATION, B. 2009.

BUCHAPUDI, K. et al. Microcantilever biosensors for chemicals and bioorganisms. **Analyst**, v. 136, n. 8, p. 1539-1556, 2011 2011.

CAI, C. X. et al. Amperometric biosensor for ethanol based on immobilization of alcohol dehydrogenase on a nickel hexacyanoferrate modified microband gold electrode. **Talanta**, v. 44, n. 3, p. 339-47, Mar 1997.

CHAKI, N. K.; VIJAYAMOHANAN, K. Self-assembled monolayers as a tunable platform for biosensor applications. **Biosensors & Bioelectronics**, v. 17, n. 1-2, p. 1-12, Jan 2002.

CHONG, A.; ZHAO, X. Functionalization of SBA-15 with APTES and characterization of functionalized materials. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 107, n. 46, p. 12650-12657, NOV 20 2003 2003.

COLONNACESARI, F. et al. INTERDOMAIN MOTION IN LIVER ALCOHOL-DEHYDROGENASE - STRUCTURAL AND ENERGETIC ANALYSIS OF THE HINGE BENDING MODE. **Journal of Biological Chemistry**, v. 261, n. 32, p. 5273-5280, NOV 15 1986 1986.

DATAR, R. et al. Cantilever Sensors: Nanomechanical Tools for Diagnostics. **Mrs Bulletin**, v. 34, n. 6, p. 449-454, JUN 2009 2009.

DRELICH, J.; TORMOEN, G. W.; BEACH, E. R. Determination of solid surface tension from particle-substrate pull-off forces measured with the atomic force microscope. **J Colloid Interface Sci**, v. 280, n. 2, p. 484-97, Dec 15 2004.

EKLUND, H.; SAMAMA, J.; JONES, T. CRYSTALLOGRAPHIC INVESTIGATIONS OF NICOTINAMIDE ADENINE-DINUCLEOTIDE BINDING TO HORSE LIVER ALCOHOL-DEHYDROGENASE. **Biochemistry**, v. 23, n. 25, p. 5982-5996, 1984 1984.

FAEGH, S.; JALILI, N.; SRIDHAR, S. Ultrasensitive Piezoelectric-Based Microcantilever Biosensor: Theory and Experiment. **Ieee-Asme Transactions on Mechatronics**, v. 20, n. 1, p. 308-312, FEB 2015 2015.

FINOT, E.; PASSIAN, A.; THUNDAT, T. Measurement of mechanical properties of cantilever shaped materials. **Sensors**, v. 8, n. 5, p. 3497-3541, May 2008.

GODIN, M. et al. Surface stress, kinetics, and structure of alkanethiol self-assembled monolayers. **Langmuir**, v. 20, n. 17, p. 7090-6, Aug 17 2004.

GROGAN, C. et al. Characterisation of an antibody coated microcantilever as a potential immuno-based biosensor. **Biosensors & Bioelectronics**, v. 17, n. 3, p. 201-207, MAR 2002 2002.

GUPTA, A.; AKIN, D.; BASHIR, R. Single virus particle mass detection using microresonators with nanoscale thickness. **Applied Physics Letters**, v. 84, n. 11, p. 1976-1978, Mar 15 2004.

HANSEN, K.; THUNDAT, T. Microcantilever biosensors. **Methods**, v. 37, n. 1, p. 57-64, SEP 2005 2005.

HAYAT, M. A. **Principles and Techniques of Electron Microscopy: Biological Applications**.

. Boca Raton, Florida: Macmillan Press, London and CRC Press, 1989.

HERLEM, G. et al. Electrodeposition and characterization of silane thin films from 3-(aminopropyl)triethoxysilane. **Surface & Coatings Technology**, v. 202, n. 8, p. 1437-1442, JAN 15 2008 2008.

HERRMANN, P. S. P. et al. **Microscopia de varredura por sonda: aspectos práticos e suas aplicações na nanociência e nanotecnologia**. São Paulo: Artliber, 2006.

IGAMBERDIEV, A. U. Biomechanical and coherent phenomena in morphogenetic relaxation processes. **Biosystems**, v. 109, n. 3, p. 336-345, Sep 2012.

ILIC, B. et al. Single cell detection with micromechanical oscillators. **Journal of Vacuum Science & Technology B**, v. 19, n. 6, p. 2825-2828, Nov-Dec 2001.

IMAMURA, G.; SHIBA, K.; YOSHIKAWA, G. Finite Element Analysis on Nanomechanical Detection of Small Particles : Toward Virus Detection. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, APR 14 2016 2016.

JIN, X. et al. Multichannel Monolithic Quartz Crystal Microbalance Gas Sensor Array. **Analytical Chemistry**, v. 81, n. 2, p. 595-603, JAN 15 2009 2009.

KAWASAKI, M.; SATO, T.; YOSHIMOTO, T. Controlled layering of two-dimensional J-aggregate of anionic cyanine dye on self-assembled cysteamine monolayer on Au(111). **Langmuir**, v. 16, n. 12, p. 5409-5417, JUN 13 2000 2000.

LANG, H. et al. Nanomechanics from atomic resolution to molecular recognition based on atomic force microscopy technology. **Nanotechnology**, v. 13, n. 5, p. R29-R36, OCT 2002 2002.

LI, L. Recent Development of Micromachined Biosensors. **Ieee Sensors Journal**, v. 11, n. 2, p. 305-311, FEB 2011 2011.

LI, X.; LEE, D. Integrated microcantilevers for high-resolution sensing and probing. **Measurement Science and Technology**, v. 23, n. 2, FEB 2012 2012.

LOJOU, E.; BIANCO, P. Application of the electrochemical concepts and techniques to amperometric biosensor devices. **Journal of Electroceramics**, v. 16, n. 1, p. 79-91, Feb 2006.

LOVE, J. et al. Self-assembled monolayers of thiolates on metals as a form of nanotechnology. **Chemical Reviews**, v. 105, n. 4, p. 1103-1169, APR 2005 2005.

LU, X. et al. Biosensor platform based on stress-improved piezoelectric membrane. **Sensors and Actuators a-Physical**, v. 179, p. 32-38, JUN 2012 2012.

MANAI, R. et al. Grafting odorant binding proteins on diamond bio-MEMS. **Biosensors & Bioelectronics**, v. 60, p. 311-317, OCT 15 2014 2014.

MANERA, M. et al. Surface plasmon resonance study on the optical sensing properties of nanometric polyimide films to volatile organic vapours. **Sensors and Actuators B-Chemical**, v. 120, n. 2, p. 712-718, JAN 10 2007 2007.

MARGARIDO, A. et al. DEVELOPMENT BASED ON MICROCANTILVER BIOSENSOR FOR DETECTION OF ETHANOL. 11th International Workshop on Nanomechanical Sensing, NMC 2014, 2014. Madrid. 11th International Workshop on Nanomechanical Sensing, NMC 2014, 30 april.

MARIE, R. et al. Adsorption kinetics and mechanical properties of thiol-modified DNA-oligos on gold investigated by microcantilever sensors. **Ultramicroscopy**, v. 91, n. 1-4, p. 29-36, May 2002.

MENDOZA-MADRIGAL, A. G. et al. DETECTION OF *Lactobacillus plantarum* 299V USING MICROCANTILEVER-BASED BIOSENSOR WITH DYNAMIC FORCE MICROSCOPY. **Revista Mexicana De Ingenieria Quimica**, v. 12, n. 3, p. 379-389, Dec 2013.

MORAES, M. C. B. et al. Eletroantenografia: a antena do inseto como um biossensor. p. 22, 2008. ISSN 01020110.

MOTTA, V. T. **Bioquímica Básica**. 2. Medbook, 2011. 488 ISBN 9788599977668.

OLIVEIRA, G. S. et al. Molecular modeling of enzyme attachment on AFM probes. **J Mol Graph Model**, v. 45, p. 128-36, Sep 2013.

ONO, T. et al. Mass sensing of adsorbed molecules in sub-picogram sample with ultrathin silicon resonator. **Review of Scientific Instruments**, v. 74, n. 3, p. 1240-1243, Mar 2003.

OSKAM, G.; SEARSON, P. Electrochemical nucleation and growth of gold on silicon. **Surface Science**, v. 446, n. 1-2, p. 103-111, FEB 1 2000 2000.

PARK, J. et al. Electrical transport and mechanical properties of alkylsilane self-assembled monolayers on silicon surfaces probed by atomic force microscopy. **Journal of Chemical Physics**, v. 130, n. 11, MAR 21 2009 2009.

PONCE, G. et al. Simulation, Analysis and Optimization of Sugar Concentration in an In Situ Gas Stripping Fermentation Process for Bioethanol Production. **Icheap12: 12th International Conference on Chemical & Process Engineering**, v. 43, p. 319-324, 2015.

RAITERI, R.; GRATTAROLA, M.; BERGER, R. Micromechanics senses biomolecules. **Sensors and Actuators B-Chemical**, v. 5, n. 1, p. 22-29, Jan 2002 2002.

RASTEGAR, A. et al. Nanomechanical Actuation of a Silicon Cantilever Using an Azo Dye, Self-Assembled Monolayer. **Langmuir**, v. 29, n. 23, p. 7118-7124, JUN 11 2013 2013.

RATHOR, N.; PANDA, S. Aminosilane densities on nanotextured silicon. **Materials Science & Engineering C-Materials For Biological Applications**, v. 29, n. 8, p. 2340-2345, OCT 15 2009 2009.

SADER, J. E.; CHON, J. W. M.; MULVANEY, P. Calibration of rectangular atomic force microscope cantilevers. **Review of Scientific Instruments**, v. 70, n. 10, p. 3967-3969, Oct 1999.

SAMAMA, J.; WRIXON, A.; BIELLMANN, J. 5-METHYLNICOTINAMIDE-ADENINE DINUCLEOTIDE - KINETIC INVESTIGATION WITH MAJOR AND MINOR ISOENZYMES OF LIVER ALCOHOL-DEHYDROGENASE AND STRUCTURAL DETERMINATION OF ITS BINARY COMPLEX WITH ALCOHOL-DEHYDROGENASE. **European Journal of Biochemistry**, v. 118, n. 3, p. 479-486, 1981 1981.

SANG, S.; WITTE, H. A novel PDMS micro membrane biosensor based on the analysis of surface stress. **Biosens Bioelectron**, v. 25, n. 11, p. 2420-4, Jul 15 2010.

SANG, S. et al. Surface stress-based biosensors. **Biosens Bioelectron**, v. 51, p. 124-35, Jan 15 2014.

SATYANARAYANA, S.; MCCORMICK, D. T.; MAJUMDAR, A. Parylene micro membrane capacitive sensor array for chemical and biological sensing. **Sensors and Actuators B-Chemical**, v. 115, n. 1, p. 494-502, May 23 2006.

SCHALLER, E.; BOSSET, J.; ESCHER, F. 'Electronic noses' and their application to food. **Food Science and Technology-Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie**, v. 31, n. 4, p. 305-316, 1998 1998.

SCHOTT, M. et al. Insect antenna-based biosensors for in situ detection of volatiles. **Adv Biochem Eng Biotechnol**, v. 136, p. 101-22, 2013.

SINGAMANENI, S. et al. Bimaterial microcantilevers as a hybrid sensing platform. **Advanced Materials**, v. 20, n. 4, p. 653-680, FEB 18 2008 2008.

Springer Handbook of Nanotechnology (Book). **Choice: Current Reviews for Academic Libraries**, v. 42, n. 2, p. 324-324, 2004.

STEFFENS, C. et al. Atomic Force Microscopy as a Tool Applied to Nano/Biosensors. **Sensors**, v. 12, n. 6, p. 8278-8300, JUN 2012 2012.

STEFFENS, C. et al. Bio-inspired sensor for insect pheromone analysis based on polyaniline functionalized AFM cantilever sensor. **Sensors and Actuators B-Chemical**, v. 191, p. 643-649, FEB 2014 2014.

THUNDAT, T. et al. Microcantilevers for physical, chemical, and biological sensing. **Sensors and Sensing in Biology and Engineering**, p. 337-355, 2003 2003.

TSOUTI, V. et al. Detection of DNA mutations using a capacitive micro-membrane array. **Biosensors & Bioelectronics**, v. 26, n. 4, p. 1588-1592, Dec 15 2010.

- UOSAKI, K. Formation and novel functions of self-assembled monolayers of thiol derivatives. **Electrochemistry**, v. 67, n. 12, p. 1105-1113, DEC 1999 1999.
- VASELLA, A.; DAVIES, G. J.; BOHM, M. Glycosidase mechanisms. **Curr Opin Chem Biol**, v. 6, n. 5, p. 619-29, Oct 2002.
- VASHIST, K. S. A review of microcantilevers for sensing application. **Journal of Nanotechnology Online**, v. 3, p. 2-15, May 2007 2007.
- VASHIST, S. et al. Immobilization of Antibodies and Enzymes on 3-Aminopropyltriethoxysilane-Functionalized Bioanalytical Platforms for Biosensors and Diagnostics. **Chemical Reviews**, v. 114, n. 21, p. 11083-11130, NOV 12 2014 2014.
- VASHIST, S. K. et al. Immobilization of antibodies and enzymes on 3-aminopropyltriethoxysilane-functionalized bioanalytical platforms for biosensors and diagnostics. **Chem Rev**, v. 114, n. 21, p. 11083-130, Nov 12 2014.
- WANG, C. et al. Ultrasensitive biochemical sensors based on microcantilevers of atomic force microscope. **Analytical Biochemistry**, v. 363, n. 1, p. 1-11, APR 1 2007 2007.
- WANG, L. et al. Microcontact printing of multiproteins on the modified mica substrate and study of immunoassays. **Surface and Interface Analysis**, v. 38, n. 1, p. 44-50, JAN 2006 2006.
- WHITESELL, J. The Merck Index, 12th Edition, CD-ROM (Macintosh): An encyclopedia of chemicals, drugs & biologicals. **Journal of the American Chemical Society**, v. 120, n. 9, p. 2209-2209, MAR 11 1998 1998.
- WIESENDANGER, R. **Scanning probe microscopy and spectroscopy : methods and applications**. Cambridge England ; New York: Cambridge University Press, 1994. xxii, 637 p. ISBN 0521418100 0521428475 (pbk.).
- YIN, T. I. et al. A micro-cantilever sensor chip based on contact angle analysis for a label-free troponin I immunoassay. **Lab Chip**, v. 13, n. 5, p. 834-42, Mar 7 2013.
- YUE, M. et al. A 2-D microcantilever array for multiplexed biomolecular analysis. **Journal of Microelectromechanical Systems**, v. 13, n. 2, p. 290-299, Apr 2004.
- ZHAO, J. et al. Relative surface density and stability of the amines on the bio-chip. **Chinese Journal of Analytical Chemistry**, v. 34, n. 9, p. 1235-1238, SEP 2006 2006.
- ZIMMERMANN, M. et al. A CMOS-based integrated-system architecture for a static cantilever array. **Sensors and Actuators B-Chemical**, v. 131, n. 1, p. 254-264, Apr 14 2008.

Anexo A*

ENZIMA ÁLCOOL DESIDROGENASE

1 - Característica da Enzima Álcool Desidrogenase

Álcool Desidrogenase de *Saccharomyces cerevisiae*;

Sigma Aldrich código: A7011;

PDB: 4W6Z;

Temperatura de armazenamento -20°C ;

CAS RN 9031-72-5;

EC 1.1.1.1;

Sinónimos: ADH; Alcohol:NAD⁺ oxidoreductase;

Álcool Desidrogenase de fermento de padaria;

A Álcool Desidrogenase pode ser utilizada para a determinação enzimática de uma baixa concentração de etanol em solução aquosa;

Peso molecular: 141-151 kDa;

Comprimento [Å] Ângulos [°];

$a = 144.34$ (14,434nm) $\alpha = 90.00$;

$b = 144.34$ $\beta = 90.00$;

$c = 128.20$ $\gamma = 120.00$;

A enzima Álcool Desidrogenase é um tetramero que contém 4 subunidades iguais. Em cada sítio ativo contém um átomo de zinco, dois grupos sulfidrila ativos e um resíduo de histidina;

Ponto isoelétrico: 5.4-5.8;

pH ótimo: 8.6-9.0;

Cofatores: β -NAD and β -NADH;

Substratos: A enzima é mais ativa com etanol e a sua atividade diminui à medida que o tamanho do álcool aumenta ou diminui. álcoois de cadeia ramificada e álcoois secundários também têm muito baixa atividade.

KM (etanol) = 2.1×10^{-2} M;

KM (metanol) = 1.3×10^{-1} M;

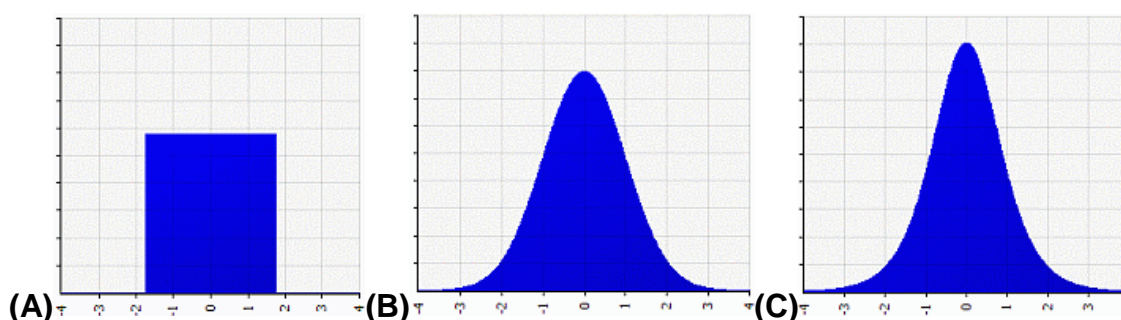
KM (isopropanol) = 1.4×10^{-1} M;

Inibidores: Os compostos que reagem com sulfidrilos livres, incluindo N-alquilmaleimidas e iodoacetamida.

2 – Curtose

A Curtose é uma medida de dispersão que caracteriza o pico de uma curva, significa verificar o grau de achatamento de uma curva, ou seja, identificar se o conjunto é mais afilado ou mais achatado em relação a uma curva padrão.

Figura 60 – Valores de Curtose para diferentes curvas, em (A) Curtose = 1.8, (B) Curtose = 3 e em (C) Curtose = 4.2



CASELLA, George, e BERGER, Roger L. Inferência estatística - tradução da 2ª edição norte-americana. Centage Learning, 2010 ISBN13: 9788522108947, ISBN10: 8522108943. Página 72

3 - Cuidados nos procedimentos experimentais

Ao lidar com os processos experimentais deste trabalho, vários detalhes foram constatados para a melhoria do produto final. Inicialmente apenas uma pequena parcela (~30%) dos microcantilevers funcionalizados efetivamente funcionou como biossensores. A maioria ou não apresentava sensibilidade suficiente ao analito alvo ou simplesmente não ocorria a adesão das biomoléculas a superfície.

Por se tratar de nano-biossensores, inúmeros fatores químicos e físicos podem influenciar e interferir na sua confecção, como contaminações, preparo e manuseio dos reagentes, calibração do equipamento laboratorial, temperatura, pH entre outros. Todo o cuidado é necessário, pois uma falha em qualquer passo do processo é o suficiente para não obtenção do biossensor funcional.

Um dos principais problemas que foi constatado no decorrer dos experimentos foi confirmado pela técnica de XPS, que é a contaminação. Foi constatada a contaminação por iodo e enxofre em algumas amostras analisadas, sendo que o iodo pode estar presente em alguns detergentes para limpeza da vidraria laboral e assim como no sal de uso doméstico, sendo que o simples toque com a pele humana é suficiente para contaminar a superfície. O enxofre é normalmente um resíduo do processo de limpeza e oxidação do microcantilever, que pode ser removido por aquecimento. O sucesso de quase 100% na obtenção dos biossensores só foi obtido tomando precauções extremas no manuseio e preparo dos componentes. A utilização de pipetadores e reagentes de uso comum em laboratórios são passíveis de contaminação. A utilização indevida de um pipetador pode vir a contaminar o embolo e todo mecanismo de acionamento, e a cada utilização propagar essa contaminação para diversos reagentes. A “tip” utilizada no pipetador também pode conter contaminantes, que mesmo em proporções muito pequenas em uma aplicação nano, já é suficiente para alterar os resultados. Dessa forma, a utilização de “tips” novas é obrigatório, e importante para o sucesso da correta funcionalização. Mesmo estufas para secagem tem enorme potencial para contaminações, pois os vapores de diferentes reagentes podem estar presentes (Figura 61). O isolamento dos reagentes e de pipetadores calibrados com “tips” novas, foram essenciais para a confecção dos biossensores.

Figura 61 – Pipetadoras, reagentes e estufas de uso comum, potenciais itens para contaminação.



No decorrer dos experimentos também foi constatado que reagentes de mesma marca e modelo, mas de lotes diferentes podem também alterar os resultados experimentais. Como exemplo, foi necessária a aquisição de mais enzimas Álcool Desidrogenase do tipo A7011, fornecido pela Sigma Aldrich (Figura 62). No primeiro lote, o aspecto da enzima apresentou coloração marrom escura e flocado, entretanto, no segundo lote, encontrou-se uma coloração branca e finamente granulada. Nos ensaios de atividade realizados pelo espectrofotômetro, o resultado de atividade foi proporcionalmente igual para ambos os lotes, no entanto, ao aplicar como camada funcional, foi constatada que o lote mais novo (coloração branca) apresentou uma maior facilidade para lixiviação, e conseqüentemente, a adesão com o glutaraldeído se mostrou menos eficaz. Tal fato pode ser comprovado ao testar o biossensor após o processo de funcionalização, ao se medir a sensibilidade antes e depois do processo de limpeza para remoção de biomoléculas não ligadas.

Figura 62 – Reagentes de lotes diferentes podem apresentar comportamentos diferentes em algumas situações.



O manuseio dos reagentes também exigiu atenção especial. No preparo da solução Piranha, verificou-se a necessidade de misturar os reagentes de forma intensa até o ponto de borbulhamento. Nos ensaios em que a solução foi preparada sem muita agitação, os microcantilevers depositados sobre a mesma solução apresentaram diferentes níveis de oxidação, sendo que são todos do mesmo material. Tal ocorrido indicou que a mistura dos reagentes não estava homogênea.

A diluição da enzima Álcool Desidrogenase, em solução tampão, com o pH devidamente ajustado, deve ser realizada de forma suave e constante, sem formação de bolhas de ar ou agitação intensa, o que pode provocar danos na molécula e diminuição ou perda da atividade. Após o processo de funcionalização, foi constatado experimentalmente que a secagem do biossensor deve ser realizada a temperatura e pressão ambientes, nos casos em que foi utilizado um sopro de gás de nitrogênio ou foi submetido a baixas pressões por meio de dessecador com pressão efetiva negativa, a expulsão rápida das moléculas de água presentes nas biomoléculas causou a perda de atividade das enzimas.