

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA METALÚRGICA,
MATERIAIS E DE MINAS

Tese de Doutorado

**Biossensor nanoestruturado construído através
da imobilização multicamada de enzimas**

Aluno: Marco Elísio Marques
Orientador: Prof. Herman Mansur, Dr.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA METALÚRGICA,
MATERIAIS E DE MINAS

Marco Elísio Marques

**Biossensor nanoestruturado construído através da
imobilização multicamada de enzimas**

Tese de doutorado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Engenharia
Metalúrgica, Materiais e de Minas da Universidade
Federal de Minas Gerais

Área de Concentração: Ciência e Engenharia de Materiais
Orientador: Prof. Herman Sander Mansur
Belo Horizonte

Às pessoas simples, que mesmo sem saber, através do pagamento dos impostos, são responsáveis pelo financiamento do desenvolvimento do país e me proporcionaram a possibilidade de concluir meu curso em uma das 500 melhores universidades do mundo.

AGRADECIMENTOS

A Deus que tem me guiado a cada passo dado.

Aos meus pais, Glessio da Silva Marques e Neuza Maria Fonseca Marques, e aos meus irmãos Gleiton e Gisele, que sempre estão presentes em minha vida.

À minha esposa, Miriam Paiva Barbosa Marques, pelo incentivo dado para a realização deste trabalho, pelo exemplo de busca de novos desafios e ao companheirismo a mim dedicados a cada passo dado.

Ao meu filho Maurício, pelo carinho que me deu sempre, e que foi tão necessário.

Ao meu orientador Herman Sander Mansur pela dedicação, confiança, incentivo e amizade a mim dispensadas.

À Alexandra A. P. Mansur, um obrigado especial, pelas discussões e apoio na realização deste trabalho.

À Prof^a. Edel Figueiredo pelos conhecimentos transmitidos.

Ao Tommi O. Reinikainen que apoiou com entusiasmo e viabilizou o início deste trabalho.

Ao Ricardo Zimmer Prados e ao Newton Borges Franco que viabilizaram a continuação deste trabalho conjuntamente com outras atividades profissionais.

À Patrícia Mara Trigueiro de Azevedo que realizou os ensaios de EDS.

Aos Colegas: Agda, Joyce, Hermes, Vanessa, André, Fábio e Juliana pelo convívio salutar e discussões que em muito me ajudaram.

Ao Departamento de Pós-Graduação em Engenharia Metalúrgica e de Minas da UFMG: aos professores pelos conhecimentos transmitidos, infraestrutura dos laboratórios e materiais para realização dos ensaios, e em especial aos funcionários Maria Aparecida Pacheco e Nelson Azevedo pela presteza e amizade.

Aos órgãos de fomento, CNPq, CAPES e FAPEMIG, pelo auxílio financeiro para participação de eventos ligados minha formação.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	1
2	OBJETIVOS.....	4
2.1	Objetivo Geral.....	4
2.2	Objetivos Específicos.....	4
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	5
3.1	Consulta de Bases de Dados de Patentes.....	5
3.2	Biossensores.....	6
3.2.1	Elementos de Biorreconhecimento.....	8
3.2.1.1	Enzimas.....	8
3.2.1.2	Anticorpos.....	18
3.2.1.3	Célula.....	20
3.2.1.4	Receptores.....	20
3.2.2	Tipos de Transdução / Transdutores.....	20
3.2.2.1	Transdução Óptica.....	20
3.2.2.2	Transdução Capacitiva.....	24
3.2.2.3	Transdução Condutiva.....	25
3.2.2.4	Transdução Calorimétrica.....	25
3.2.2.5	Transdução Acústica.....	25
3.2.2.6	Transdução Micromecânica.....	27
3.2.2.7	Transdução Eletroquímica.....	28
3.2.2.8	Transduções Especiais.....	30
3.2.3	Estratégia de Imobilização.....	32
3.2.3.1	Métodos de Funcionalização.....	35
3.2.3.2	Uso de Agentes de Imobilização Covalente.....	40
3.2.3.3	Ligação Biotina – Avidina.....	42
3.2.3.4	Multi-imobilização.....	43

3.2.3.5	Alguns Materiais Usados para a Imobilização.....	45
3.2.4	Métodos de Caracterização.....	46
3.2.4.1	Ângulo de Contato.....	46
3.2.4.2	Espectroscopia de Energia Dispersiva (EDS).....	47
3.2.4.3	Espectroscopia de Ultravioleta-Visível (UV-Vis).....	47
3.2.4.4	Espectroscopia de Infravermelho.....	49
4	PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL.....	53
4.1	Materiais.....	54
4.2	Caracterização do Suporte Vítreo via EDS.....	54
4.3	Funcionalização da Superfície dos Suportes Vítreos.....	55
4.3.1	Método de Funcionalização da Superfície dos Suportes Vítreos.....	55
4.3.2	Caracterização das Superfícies - Medidas de Ângulo de Contato.....	57
4.3.3	Caracterização das Superfícies – Infravermelho.....	57
4.4	Biotinização das Enzimas.....	57
4.5	Imobilização de Monocamadas de Enzimas.....	58
4.5.1	Imobilização da GOx em Suportes Sólidos Vítreos.....	58
4.5.1.1	Imobilização Covalente.....	58
4.5.1.2	Imobilização por Adsorção.....	60
4.5.2	Procedimento de Imobilização de Monocamadas de Enzimas em Microplacas.....	60
4.5.2.1	Imobilização de Monocamadas em Microplacas com Funcionalização Amina.....	60
4.5.2.2	Imobilização de Monocamadas em Microplacas Não Funcionalizadas (Adsorção).....	61
4.6	Procedimento de Imobilização de Estruturas Multienzimáticas em Microplacas.....	61
4.7	Medidas de Atividade Enzimática.....	64
4.7.1	Medidas de Atividade Enzimática da GOx em Solução e Imobilizada em Suportes Vítreos utilizando Cubeta de Quartzo.....	64
4.7.1.1	Medidas de Atividade Enzimática da GOx em Solução na Cubeta de Quartzo.....	65

4.7.1.2	Medidas de Atividade Enzimática em Suportes Sólidos Vítreos na Cubeta de Quartzo.....	65
4.7.2	Medidas de Atividade Enzimática em Microplacas.....	66
4.7.2.1	Medidas de Atividade Enzimática de Enzimas em Solução.....	66
4.7.2.2	Medidas de Atividade Enzimática para Monocamadas.....	69
4.7.3	Medidas de Atividade Enzimática com Estruturas Bienzimáticas.....	70
4.7.3.1	Medidas de Atividade Enzimática em Tampão PBS.....	70
4.7.3.2	Ciclos de Biocatálise Enzimática.....	72
4.7.3.3	Avaliação da Especificidade Cascata Bienzimática.....	72
4.7.3.4	Detecção de Glucose Originada da Hidrólise da Sacarose em Refrigerantes com o Uso de Estruturas Bienzimáticas.....	73
4.7.3.5	Medidas de Atividade Enzimática em Tampão Citrato.....	73
4.7.4	Medidas de Atividade Enzimática com Estruturas Trienzimáticas.....	74
4.7.4.1	Medidas de Atividade Enzimática em Tampão Citrato.....	75
4.7.4.2	Ciclos de Biocatálise Enzimática.....	77
4.7.4.3	Avaliação da Especificidade Cascata Trienzimática.....	77
4.8	Otimização da Biotinização da Invertase.....	78
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	80
5.1	Caracterização do Suporte Vítreo.....	80
5.2	Caracterização da Funcionalização da Superfície de Suportes Sólidos.....	81
5.2.1	Caracterização por Ângulo de Contato.....	81
5.2.2	Caracterização por Espectroscopia na Região do Infravermelho – FTIR.....	84
5.3	Imobilização Monocamada.....	88
5.3.1	Atividades Enzimáticas da GOx Imobilizada em Suportes Vítreos com Diferentes Funcionalizações para Comparação de Diferentes Estratégias de Imobilização.....	88
5.3.1.1	Cinética Enzimática – Michaelis-Menten.....	96
5.3.1.2	Curvas de Absorbância x Concentração para a Produção de Biossensores.....	104

5.3.2	Imobilização da Proteína Glucose Oxidase em Microplacas com Superfície Modificada com Grupos Amina.....	106
5.3.2.1	Avaliação da Atividade Enzimática.....	106
5.3.2.2	Cinética Enzimática – Michaelis-Menten.....	110
5.3.2.3	Curvas de Absorbância x Concentração para a Construção de Biossensores.....	115
5.4	Estruturas Nanométricas Bienzimáticas.....	116
5.4.1	Atividade Enzimática.....	116
5.4.2	Reprodução da Construção das Estruturas.....	123
5.4.3	Ciclos de Biocatálise Enzimática.....	125
5.4.4	Especificidade.....	126
5.4.5	Ensaio de Aplicação do Biossensor Nanoestruturado.....	128
5.5	Estruturas Nanométricas Trienzimáticas.....	130
5.5.1	Atividade da Invertase em Solução.....	130
5.5.2	Atividades Enzimáticas da Cascata Trienzimática.....	131
5.5.3	Ciclos de Biocatálise Enzimática.....	134
5.5.4	Especificidade.....	135
5.6	Estudo de Fatores que Afetam a Atividade das Cascatas Trienzimáticas (Efeitos Difusionais, Topologia e pH).....	136
5.6.1	Estudos de Efeitos Difusionais.....	136
5.6.2	Estudos de Topologia.....	141
5.6.3	Avaliação do pH na Atividade do Sistema Multienzimática.....	143
5.7	Experimento para Otimização da Biotinização da Invertase.....	148
6	CONCLUSÕES.....	152
7	SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	154
8	CONTRIBUIÇÕES PARA A LITERATURA.....	151
9	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	152
10	ANEXOS.....	169

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 3.1	Diagrama esquemático de um biossensor.....	6
Figura 3.2	Representação pelo modelo de fitas da enzima glucose oxidase.....	8
Figura 3.3	Sequência de aminoácidos da GOx.....	9
Figura 3.4	Ação enzimática descrita pelo diagrama de coordenadas da reação.....	11
Figura 3.5	Gráfico representativo do modelamento da cinética enzimática da equação de Michaelis-Menten.....	13
Figura 3.6	Detalhamento do sítio ativo da GOx.....	14
Figura 3.7	Representação esquemática das etapas do ciclo catalítico da enzima GOx.....	14
Figura 3.8	Representação pelo modelo de fitas da enzima HRP.....	15
Figura 3.9	Sequência de aminoácidos da HRP.....	15
Figura 3.10	Representação esquemática do ciclo catalítico da HRP.....	16
Figura 3.11	Representação da hidrólise da sacarose com ação enzimática da invertase.....	17
Figura 3.12	Representação pelo modelo de fitas da enzima invertase – INV.....	17
Figura 3.13	Sequência de aminoácidos da INV.....	18
Figura 3.14	Representação esquemática de um anticorpo.....	19
Figura 3.15	Representação da oxidação da TMB.....	21
Figura 3.16	Interferometria Mach-Zehndler.....	23
Figura 3.17	Cristal usado na balança QCM.....	28
Figura 3.18	FET com canal de nanofio de Si.....	30
Figura 3.19	Diagrama demonstrando o princípio do efeito Hall.....	31
Figura 3.20	Representação esquemática das estratégias de imobilização: amardilhamento, adsorção, ligação covalente e afinidade.....	34

Figura 3.21	Fórmula geral dos agentes silanos.....	36
Figura 3.22	Típica formação de filmes por funcionalização por agentes silanos.....	37
Figura 3.23	Ilustração da compressão da monocamada.....	38
Figura 3.24	Deposição de monocadas em suporte sólidos hidrofílicos.....	39
Figura 3.25	Representação esquemática da estrutura do glutaraldeído.....	41
Figura 3.26	Esquema de reação do aldeído com amina primária.....	41
Figura 3.27	Esquema de reação do aldeído com tiol.....	42
Figura 3.28	Esquema de reação do aldeído com hidroxila.....	42
Figura 3.29	Representação da estrutura da biotina.....	43
Figura 3.28	Representação da avidina através do modelo de fitas.....	43
Figura 3.31	Medida do ângulo de contato indicando diagrama de equilíbrio.....	46
Figura 3.32	Diagrama de energia de orbitais moleculares com as diversas transições eletrônicas.....	48
Figura 3.33	Representação esquemática da espectroscopia UV-Vis.....	49
Figura 3.34	Representação esquemática dos modos de vibração moleculares.....	51
Figura 4.1	Representação das etapas fundamentais abordadas neste trabalho...	53
Figura 4.2	Fluxograma simplificado do processo utilizado para a aplicação do agente silano, sem o detalhamento das etapas de limpeza e hidrofilição.....	56
Figura 4.3	Fluxograma do processo utilizado para a biotinação das enzimas GOx, INV e HRP em tampão PBS.....	58
Figura 4.4	Fluxograma do processo utilizado para a imobilização de GOx em suportes sólidos modificados por agentes silanos.....	58
Figura 4.5	Representação esquemática da imobilização da enzima glucose oxidase através do uso de agente de imobilização covalente (glutaraldeído) em suportes com funcionalização: hidroxila (a), funcionalização amina (b) e funcionalização tiol (c) (Modelo da GOx por fitas - fonte: “Protein Data Bank – 1GAL”).....	59

Figura 4.6	Fluxograma do processo utilizado para a imobilização de monocamadas de enzimas em microplacas funcionalizadas.....	60
Figura 4.7	Representação esquemática das estruturas bienzimáticas nanoestruturadas denominadas Estrutura GOx-biot/HRP-biot e Estrutura HRP-biot/GOx-biot.....	62
Figura 4.8	Representação esquemática das estruturas trienzimáticas nanoestruturadas denominadas Estrutura GOx-biot/HRP-biot/Inv-biot e Estrutura HRP-biot/GOx-biot/INV-biot.....	62
Figura 4.9	Fluxograma da construção das estruturas multienzimáticas.....	63
Figura 4.10	Esquema do uso de microplacas para monitoração da atividade enzimática da GOx e GOx-biot.....	68
Figura 4.11	Esquema do uso de microplacas para monitoração da atividade enzimática da INV em solução utilizando tampões PBS e citrato.....	69
Figura 4.12	Esquema do uso de microplacas para monitoração da atividade das estruturas bienzimáticas em PBS.....	71
Figura 4.13	Esquema do uso de microplacas para avaliação de especificidade da estrutura bienzimática GOx-biot/HRP-biot.....	72
Figura 4.14	Esquema do uso de microplacas para detecção de glucose originada da hidrólise da sacarose de refrigerantes com uso das estruturas bienzimáticas GOx-biot/HRP-biot.....	73
Figura 4.15	Esquema do uso de microplacas para monitoração da atividade das estruturas bienzimáticas em microplaca utilizando tampão citrato.....	74
Figura 4.16	Esquema do uso de microplacas para monitoração da atividade enzimática nas estruturas avaliadas durante o experimento das estruturas trienzimáticas.....	76
Figura 4.17	Esquema do uso de microplacas para avaliação da especificidade da estrutura trienzimática HRP-biot/GOx-biot/INV-biot.....	77
Figura 4.18	Representações esquemáticas das estruturas bienzimáticas estudadas, utilizando-se das enzimas GOx-biot e INV-biot.....	78

Figura 4.19	Esquema do uso de microplacas para monitoração da atividade enzimática nas estruturas GOx-biot/INV-biot e INV-biot/GOx-biot.....	80
Figura 5.1	Resultado caracterização EDS para lâminas de vidro.....	80
Figura 5.2	Gráfico demonstrando a dependência do ângulo de contato em função da funcionalização de superfície e imagens típicas obtidas para avaliação da superfície dos suportes vítreos contendo valores médios para as condições estudadas ± 1 desvio padrão	81
Figura 5.3	Representação esquemática de suportes sólidos funcionalizados.....	83
Figura 5.4	Representação esquemática da camada formada após o processo de modificação de superfície utilizando-se se organossilanos, onde R_1 é o grupo funcional do silano em estudo e as setas mostram os espaçadores propil expostos na superfície.....	84
Figura 5.5	Espectro FTIR de suporte sólido sem funcionalização (a), suporte sólido “amino-funcionalizado” (b) e suporte sólido “amino funcionalizado + glutaraldeído” (c).....	85
Figura 5.6	Espectro FTIR de suporte sólido sem funcionalização (a), suporte sólido “tiol-funcionalizado” (b) e suporte sólido “tiol funcionalizado + glutaraldeído” (c).....	86
Figura 5.7	Representação esquemática da estrutura tridimensional da funcionalização tiol em sólido vítreo e suas interações com glutaraldeído.....	88
Figura 5.8	Atividade enzimática da GOx após imobilização em suporte com funcionalização NH_2 e representação esquemática da estrutura.....	89
Figura 5.9	Atividade enzimática da GOx após imobilização em suporte com funcionalização SH e representação esquemática da estrutura.....	89
Figura 5.10	Atividade enzimática da GOx após imobilização em suporte com funcionalização OH e representação esquemática da estrutura.....	90
Figura 5.11	Atividade enzimática da GOx obtida após imobilização em suporte não funcionalizado e representação esquemática da estrutura.....	90
Figura 5.12	Representação esquemática das reações em cascata utilizadas para monitorar as atividades enzimáticas da GOx imobilizada em sólidos vítreos.....	91

Figura 5.13	Atividade enzimática da GOx imobilizada em suportes sólidos vítreos com funcionalizações NH ₂ , SH, OH e imobilização por adsorção.....	92
Figura 5.14	Atividades enzimáticas obtidas em 9 minutos, para concentrações de glucose de 5mmol.L ⁻¹ e 15mmol.L ⁻¹ obtidas para todas as estratégias de imobilização em suportes vítreos estudadas e monitoração das absorbâncias das enzimas em solução.....	93
Figura 5.15	Representação esquemática da reação esperada do glutaraldeído com os grupos funcionais das superfícies funcionalizadas amina (a), hidroxila (b) e tiol (c).....	95
Figura 5.16	Representação esquemática das superfícies funcionalizadas quando da aplicação do glutaraldeído, funcionalização hidroxila (a), tiol (b) e amina (c).....	96
Figura 5.17	Formação de peróxido de hidrogênio x tempo para GOx imobilizada em suporte sólido NH ₂	97
Figura 5.18	Adequação dos resultados obtidos ao modelo de Michaelis-Menten para GOx em solução.....	98
Figura 5.19	Adequação dos resultados obtidos ao modelo de Michaelis-Menten da GOx imobilizada em suporte com funcionalização NH ₂ – 1 ^a amostra.....	98
Figura 5.20	Adequação dos resultados obtidos ao modelo de Michaelis-Menten da GOx imobilizada em suporte com funcionalização NH ₂ – 2 ^a amostra.....	99
Figura 5.21	Adequação dos resultados obtidos ao modelo de Michaelis-Menten da GOx imobilizada em suporte com funcionalização SH.....	99
Figura 5.22	Adequação dos resultados obtidos ao modelo de Michaelis-Menten da GOx imobilizada em suporte com funcionalização OH.....	100
Figura 5.23	Representação da ligação do glutaraldeído com o aminoácido lisina com a formação de uma base Schiff.....	102
Figura 5.24	Curvas de velocidade inicial de reação x concentração do substrato obtidas para a GOx em solução (a) e das três estratégias de imobilização estudadas: imobilização em suporte amina (b), imobilização em suporte tiol (c) e imobilização em suporte hidroxila (d), utilizando-se a equação de Michaelis-Menten e os parâmetros obtidos no modelamento.....	104

Figura 5.25	Curvas de absorvância x concentração do substrato obtidas com a GOx imobilizada em substratos com funcionalização NH ₂ (a), SH (b) e OH (c).....	105
Figura 5.26	Valores de atividade enzimática em microplaca para concentrações de glucose de 5mmol.L ⁻¹ e 15mmol.L ⁻¹ (tempo = 9 minutos).....	107
Figura 5.27	Esquema proposto da ligação entre a NHS-biotina e a enzima glucose oxidase.....	108
Figura 5.28	Representação esquemática de uma cadeia peptídica com restrição estérica pela ligação da biotina com aminoácidos lisinas. A seta mostra o local onde foi simulada uma possível restrição estérica do substrato a um aminoácido ácido glutâmico.....	109
Figura 5.29	Comparativo das atividades enzimáticas obtidas em 9 minutos para concentrações de glucose de 5mmol.L ⁻¹ e 15mmol.L ⁻¹ da GOx imobilizada em suporte vítreo e em solução com reação na cubeta de quartzo (a) e imobilização e reação em cavidades de microplacas (b) utilizando a correção do caminho óptico.....	110
Figura 5.30	Adequação dos resultados obtidos ao modelo de Michaelis-Menten da GOx imobilizada em microplaca com funcionalização NH ₂	111
Figura 5.31	Adequação dos resultados obtidos ao modelo de Michaelis-Menten da GOx-biot imobilizada em microplaca com funcionalização NH ₂	111
Figura 5.32	Adequação dos resultados obtidos ao modelo de Michaelis-Menten da GOx em solução em microplaca.....	112
Figura 5.33	Adequação dos resultados obtidos ao modelo de Michaelis-Menten de GOx-biot em solução em microplaca.....	112
Figura 5.34	Curva de absorvância x concentração do substrato obtida para a imobilização de GOx em microplaca amina.....	115
Figura 5.35	Curva de absorvância x concentração do substrato obtida para a imobilização de GOx-biot em microplaca amina.....	115
Figura 5.36	Atividades enzimáticas para o branco e para concentrações de 1mmol.L ⁻¹ e 15mmol.L ⁻¹ de glucose utilizando-se a Estrutura GOx-Biot/HRP-biot (t = 50minutos).....	116
Figura 5.37	Atividades enzimáticas para o branco e para concentrações de 1mmol.L ⁻¹ e 15mmol.L ⁻¹ de glucose para a Estrutura HRP-biot/GOx-biot (t = 50minutos).....	117

Figura 5.38	Representação esquemática das reações em cascata das estruturas bienzimáticas estudadas.....	118
Figura 5.39	Comparação entre os atividades enzimáticas obtidas nas Estruturas GOx-biot/HRP-biot e HRP-biot/GOx-biot para concentrações de 1mmol.L^{-1} e 15mmol.L^{-1} de glucose (t = 50 minutos).....	119
Figura 5.40	Comparação entre as duas estruturas bienzimáticas em relação ao fluxo de substrato glucose.....	120
Figura 5.41	Possíveis direções de difusão do peróxido de hidrogênio nas Estruturas GOx-biot/HRP_biot e HRP-biot/GOx-biot.....	121
Figura 5.42	Representação esquemática (a) e atividades enzimáticas da cascata bienzimática da estrutura GOx-biot/HRP-biot em diferentes experimentos (b).....	124
Figura 5.43	Representação esquemática (a) e atividades enzimáticas da cascata bienzimática da estrutura HRP-biot/GOx-biot em diferentes experimentos (b).....	124
Figura 5.44	Atividades enzimáticas obtidas em três ciclos de exposição da Estrutura GOx-biot/HRP-biot à uma concentração de glucose de 15mmol.L^{-1} por um tempo 30 minutos (a) e representação esquemática da estrutura (b).....	125
Figura 5.45	Atividades enzimáticas obtidas em 2 ciclos de exposição da Estrutura HRP-biot/ GOx-biot à uma concentração de glucose de 15mmol.L^{-1} por um tempo 30 minutos (a) e representação esquemática da estrutura (b).....	126
Figura 5.46	Resultados de atividade enzimática para as concentrações de 1mmol.L^{-1} e 15mmol.L^{-1} de frutose para a Estrutura GOx-biot/HRP-biot (a) e representação esquemática do experimento (b).	127
Figura 5.47	Resultado da avaliação da especificidade da Estrutura GOx-biot/HRP-biot através da comparação das absorbâncias para as concentrações de 1mmol.L^{-1} e 15mmol.L^{-1} de frutose e glucose e representação esquemática da nanoestrutura (b).....	128
Figura 5.48	Aspecto das cavidades com as nanoestruturas bienzimáticas após serem testadas com refrigerante regular e dietético.....	129
Figura 5.49	Atividades enzimáticas da invertase em solução em diferentes tampões (PBS e citrato) para uma concentração de sacarose de 50mmol.L^{-1} e tempo de 50 minutos.....	130

Figura 5.50	Representação esquemática (a) e atividades enzimáticas da estrutura trienzimática GOx-biot/HRP-biot/INV-biot para o branco e concentração de sacarose de 100mmol.L^{-1} , tempo = 510 minutos (b).....	131
Figura 5.51	Representação esquemática (a) e atividades enzimáticas da estrutura trienzimática HRP-biot/GOx-biot/INV-biot para o branco e concentração de sacarose de 100mmol.L^{-1} , tempo = 510 minutos (b)	132
Figura 5.52	Representação esquemática das reações em cascata das estruturas trienzimáticas HRP-biot/GOx-biot /INV-biot (a) e GOx-biot/HRP-biot/INV-biot (b).....	133
Figura 5.53	Atividades enzimáticas das cascatas trienzimáticas das Estruturas GOx-biot/HRP-biot/INV-biot e HRP-biot/GOx-biot /INV-biot.....	134
Figura 5.54	Atividades enzimáticas da avaliação da reutilização da cascata trienzimática da Estrutura HRP-biot/GOx-biot/INV-biot (tempo= 510 minutos).....	134
Figura 5.55	Absorbâncias da avaliação da especificidade da Estrutura HRP-biot/GOx-biot/INV-biot utilizando-se frutose como substrato.....	135
Figura 5.56	Aspecto das cavidades com a nanoestruturas trienzimáticas referentes à Estrutura HRP-biot/GOx-biot/INV-biot após serem submetidas aos testes utilizando-se sacarose e frutose após um intervalo de 510 minutos.....	136
Figura 5.57	Atividades enzimáticas da avaliação da enzima GOx na Estrutura GOx-biot/HRP-biot/INV-biot (tempo = 9 minutos).....	137
Figura 5.58	Representação esquemática das configurações usadas para teste da GOx-biot imobilizada: (a) isolada, (b) parte integrante da cascata trienzimática.....	137
Figura 5.59	Atividades enzimáticas da avaliação da enzima HRP na Estrutura HRP-biot/GOx-biot/INV-biot (tempo = 9 minutos).....	138
Figura 5.60	Representação esquemática das configurações usadas para teste da HRP-biot imobilizada: (a) isolada, (b) parte integrante da cascata trienzimática.....	138

Figura 5.61	Atividades enzimáticas da avaliação da cascata bienzimática isolada e quando a mesma é parte da Estrutura GOx-biot/HRP-biot/INV-biot (tempo = 50 minutos).....	139
Figura 5.62	Representação esquemática das configurações usadas para teste da cascata bienzimática GOx-biot/HRP-biot imobilizada: (a) isolada, (b) parte integrante da cascata trienzimática.....	139
Figura 5.63	Atividades enzimáticas da cascata bienzimática HRP-biot/Gox-biot isolada e quando a mesma é parte da Estrutura HRP-biot/Gox-biot /INV-biot (tempo = 50 minutos).....	140
Figura 5.64	Representação esquemática das configurações usadas para teste da cascata bienzimática HRP-biot/GOx-biot imobilizada: (a) isolada, (b) parte integrante da cascata trienzimática.....	140
Figura 5.65	Atividades enzimáticas da GOx-biot quando montada na 1 e 2 camadas de uma estrutura trienzimática [t = 9 minutos] (a) e representação esquemática da posição relativa na 1ª camada e 2ª camada das estruturas multienzimáticas estudadas (b).....	141
Figura 5.66	Atividades enzimáticas da HRP-biot quando montada na 1 e 2 camadas de uma estrutura trienzimática (a) e representação esquemática da posição relativa na 1ª camada e 2ª camada das estruturas multienzimáticas estudadas (b).....	142
Figura 5.67	Estrutura (a) e atividades enzimáticas (b) da cascata bienzimática da Estrutura GOx-biot/ HRP-biot em diferentes condições de modulação de pH.....	144
Figura 5.68	Estrutura (a) e atividades enzimáticas (b) da cascata bienzimática da Estrutura HRP-biot/GOX-biot em diferentes modulações de pH.....	144
Figura 5.69	Representação esquemática do aminoácido histidina, com o grupo lateral na sua forma protonada (a) e deprotonada (b).....	145
Figura 5.70	Representação do aminoácido ácido glutâmico, com o grupo lateral na sua forma protonada (a) e deprotonada (b).....	146
Figura 5.71	Atividades enzimáticas da avaliação das cascatas bienzimáticas das Estruturas GOx-biot/HRP-biot e HRP-biot/GOx-biot em diferentes tampões.....	147

Figura 5.72	Atividades enzimáticas da invertase biotinizada em tampão PBS e citrato, sem imobilização, para um tempo de 30 minutos e concentração de sacarose de 100mmol.L^{-1}	148
Figura 5.73	Atividades enzimáticas obtidas quando da avaliação da GOx-biot imobilizada na primeira e segunda camadas para concentração de glucose de 15mmol.L^{-1} tempo de 9 minutos.....	149
Figura 5.74	Atividades enzimáticas obtidas quando da avaliação da INV-biot imobilizada na 1 ^a e 2 ^a camadas.....	150
Figura 5.75	Absorbâncias obtidas quando da avaliação das cascatas bienzimáticas GOx-biot/INV-biot e INV-biot/GOx-biot, para um tempo de 360 minutos.....	151

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela I.1	Evolução do número de publicações sobre biossensores.....	1
Tabela III.1	Classificação das diferentes enzimas.....	11
Tabela III.2	Código IUPAC das enzimas GOx, HRP e INV.....	11
Tabela III.3	Regiões do espectro de infravermelho.....	50
Tabela III.4	Regiões de absorção de IR para diferentes grupos vibracionais..	52
Tabela IV.1	Matriz de experimentos para funcionalização de superfícies de suporte vítreos.....	55
Tabela IV.2	Denominação dadas aos experimentos realizados da imobilização da GOx em suportes vítreos.....	66
Tabela V.1	Resultado da análise química semi-quantitativa através de EDS, para as lâminas de vidro.....	81
Tabela V.2	Medidas de ângulo de contato para diferentes funcionalizações.....	81
Tabela V.3	Estimativa dos parâmetros de Michaelis-Menten para a imobilização de GOx em suporte sólidos com funcionalização amina, tiol e hidroxila.....	102
Tabela V.4	Comparação dos parâmetros de Michaelis-Menten para GOx imobilizada ou em solução para os sistemas suporte vítreo/cubeta de quartzo e placas de titulação.....	113
Tabela V.5	Comparação dos parâmetros de Michaelis-Menten para GOx e GOx biotinizadas utilizando-se de placas de titulação.....	114

ÍNDICE DE EQUAÇÕES

Equação 3.1	Equação de sensibilidade de um sensor.....	7
Equação 3.2	Equação de conversão substrato em produto num processo enzimático.....	10
Equação 3.3	Equação cinética enzimática segundo modelo de Michaelis-Menten.....	12
Equação 3.4	Equação da reação da HRP.....	16
Equação 3.5	Equação da reação da Invertase.....	17
Equação 3.6	Expressão da capacitância para capacitores de eletrodos interdigitados.....	24
Equação 3.7	Equação de Sauerbrey para a frequência de ressonância de balanças de quartzo.....	27
Equação 3.8	Equação de Nernst relacionando o potencial medido no eletrodo e a concentração do analito.....	29
Equação 3.9	Equação da tensão de efeito Hall considerando um portador de carga.....	32
Equação 3.10	Equação de Young.....	46
Equação 3.11	Equação da lei de Beer-Lambert.....	49
Equação 3.12	Equação para cálculo das vibrações fundamentais para moléculas lineares	50
Equação 3.13	Equação para cálculo das vibrações fundamentais para moléculas não lineares	50
Equação 4.1	Equação de correção dos valores de absorbância.....	64
Equação 5.1	Equação da constante de Michaelis-Menten.....	100
Equação 5.2	Equação de $V_{\text{máx}}$ do modelamento de Michaelis-Menten.....	100
Equação 5.3	Equação da constante de Michaelis-Menten levando-se em consideração a simplificação que a formação do complexo ES é mais rápido que a formação do produto.....	101

Equação 5.4	Primeira lei de Fick.....	120
Equação 5.5	Equação diferencial relacionando os concentrações de peróxido de hidrogênio levando em consideração a ação enzimática e fenômenos difusionais.....	122
Equação 5.6	Segunda lei de Fick.....	122
Equação 5.7	Equação diferencial da ação enzimática	122
Equação 5.8	Detalhamento da Equação 5.6.....	122
Equação 5.9	Equação da reação enzimática da 1 ^a enzima em uma estrutura multienzimática.....	132
Equação 5.10	Equação da reação enzimática da 2 ^a enzima em uma estrutura multienzimática.....	132
Equação 5.11	Equação da reação enzimática da 3 ^a enzima em uma estrutura multienzimática.....	132
Equação 5.12	Equação da reação enzimática da n ^é zima enzima em uma estrutura multienzimática.....	132
Equação 5.13	Lei de Coulomb.....	145
Equação 5.14	Equação de Henderson-Hasselbach.....	147

ABREVIATURAS

APTMS	Aminopropiltrimetoxisilano
BW	Ondas propagando no interior do sólido estendido (“Bulk Waves”)
BIOFET	Transistor de efeito de campo biológico
CMOS	Semicondutor metal-óxido complementar (“complementary metal-oxide-semiconductor”)
DNA	Ácido desoxirribonucléico
Da	Dalton
EC	Enzyme Commission
EDS	Espectroscopia de energia dispersiva (“Electron Dispersive Spectroscopy”)
EIS	Espectroscopia de impedância eletroquímica (“Electrochemical Impedance Spectroscopy”)
EnFETs	Transistor de efeito de campo enzimático
ELISA	Imunoensaio marcado por enzima (“Enzyme-Linked Immuno Absorbent Assay”)
F	Farad
FET	Transistor de efeito de campo (“Field Effect Transistor”)
FTIR	Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (“Fourier Transform Infrared Spectroscopy”)
GA	Glutaraldeído
GOx	Enzima glucose oxidase extraída do fungo <i>Aspergillus Niger</i>
GOx-biot	Enzima glucose oxidase extraída do fungo <i>Aspergillus Niger</i> submetida ao processo de biotinação
HRP	Enzima peroxidase extraída do rábano silvestre
HRP-biot	Enzima peroxidase extraída do rábano silvestre submetida ao processo de biotinação
Hz	Hertz
h	Hora

IgG	Imunoglobulina G
INV	Enzima invertase, extraída de leveduras de pão
INV-biot	Enzima invertase, extraída de leveduras de pão submetida ao processo de biotinizacão
ISFETS	Transistor de efeito de campo íon seletivo
ITO	Óxido de índio e estanho
IUPAC	União Internacional de Química Pura e Aplicada (“International Union of Pure and Applied Chemistry”)
JFET	Transistor de efeito de campo de junção de porta (“Junction Gate Field-Effect Transistor”)
LB	Filmes Langmuir-Blodget
LbL	Camada sobre camada (“layer-by-layer”)
MIP	Polímeros com conformacão molecular (“Molecular Imprinted Polymers”)
MOSFET	Transistor de efeito de campo de semicondutor de óxido metálico (“Metal–Oxide–Semiconductor Field-Effect Transistor”)
MPTMS	Mercaptopropiltrimetoxissilano
MZI	Interferometria de Mach-Zehner (“Mach-Zehner interferometry”)
PANI	Polianilina
PBS	Soluçã salina de tampão fosfato
PVA	Poli (álcool vinílico)
QCM	Microbalanç por cristal de quartzo (“Quartz Cristal Microbalance”)
RNA	Ácido ribonucléico
SAM	Monocamada automontada (“Self Assembly Monolayer”)
SAW	Ondas acústicas de superfície (“Surface Acoustic Waves”)
SPR	Ressonância de Plásmos de superfície (“Surface Plasmon Resonance”)
TMB	3,3', 5,5' tetrametilbenzidina
UV-Vis	Espectroscopia de ultravioleta-visível
V	Volt
Å	Ångstrom

λ	Comprimento de onda
π	Mudança da pressão de superfície
γ	Tensão superficial

RESUMO

A construção de biossensores tem sido bastante estudada nos últimos anos, em especial os biossensores enzimáticos os quais são, dentre os demais, os que atingiram maior maturidade e maior escala industrial. O uso de nanotecnologia abriu novas perspectivas na construção destes componentes. A capacidade de controle a nível molecular carrega consigo a possibilidade do planejamento da estrutura a ser construída, por vezes antevendo a melhor configuração a ser empregada.

O objetivo desta pesquisa foi a construção de um biossensor enzimático multicamada com estruturas nanométricas, utilizando-se de três enzimas: glucose oxidase extraída do fungo *Aspergillus Niger* (GOx), peroxidase proveniente do rábano silvestre (HRP) e invertase proveniente de leveduras de pão (INV), previamente submetidas a uma etapa de biotinizacão. Foi usado para sua construção o método de deposição camada sobre camada (LbL-“layer-by-layer”) através de imobilização covalente da 1ª camada e imobilização por afinidade nas camadas superiores.

A construção de biossensores com estruturas contendo múltiplas camadas foi obtida com sucesso. Estas estruturas foram comparadas entre si e diferenças significativas foram encontradas entre as mesmas em função da sequência da imobilização das enzimas e do pH em que foi avaliado o sistema:

- Estruturas bienzimáticas construídas pela imobilização da GOx na primeira camada e HRP na segunda camada apresentaram resultados de atividade enzimática aproximadamente 1,7 vezes maiores que as estruturas obtidas pela imobilização da HRP na primeira camada e GOx na segunda camada, quando avaliadas em tampão PBS (pH=7,4). Este comportamento apresentou inversão quando as estruturas foram avaliadas em tampão citrato (pH= 5,3);
- Estruturas trienzimáticas construídas pela imobilização da HRP na primeira camada, GOx na segunda camada e INV na terceira camada apresentaram resultados de atividade enzimática aproximadamente 1,5 vezes maiores que as estruturas

construídas pela imobilização da GOx na primeira camada, HRP na segunda camada e INV na terceira camada, em tampão citrato;

Estas diferenças foram creditadas à existência de microambientes nas proximidades das enzimas, causadas por interações eletrostáticas entre os aminoácidos das enzimas, o substrato e o suporte sólido.

As estruturas bienzimáticas foram submetidas a amostras de refrigerantes regular (adoçado com açúcar) e dietético, como prova de conceito, e apresentaram resposta catalítica na detecção de glucose em amostras de refrigerante regular.

A estrutura tridimensional empregada na construção das estruturas bienzimáticas e trienzimáticas tem potencial aplicação para nanosensoreamento em indústrias de alimentação e bebidas, detecção de agentes alergênicos, componentes tóxicos e contaminação, além de que tal estratégia pode ser potencialmente usada para mimetizar os canais metabólicos existentes nas células.

ABSTRACT

Biosensors design study has increased in the last years, especially for enzymatic biosensors, witch among the biosensors, are the most mature and the ones that have reached bigger industrial scale. The use of nanotechnology has opened new perspectives in the biosensor construction. The molecular capacity control brings the possibility of design of the structure, sometimes foreseeing the best possible configuration.

The objective of this research was to build enzymatic multilayer biosensors with nanometric structures, using three enzymes: glucose oxidase from *Aspergillus Niger* (GOx), horseradish peroxidase (HRP) and invertase from bakers' yeast (INV), previously submitted to biotinylation, using a layer-by-layer deposition approach and through covalent immobilization of the 1st layer and affinity immobilization in subsequent layers.

Multiple layers biosensor constructions were successful obtained. Comparison between them was made and the tested assemblies were significantly altered by the designed sequence of enzymes within the structures and the pH of the system:

- Bi-enzymatic structures built with GOx in the first layer and HRP in the second layer have presented enzymatic activity results of approximately 1,7 times greater than structures built with HRP in the first layer and GOx in the second layer, when evaluated at PBS buffer (pH = 7.4). This behavior was inverted when the structures were evaluated with citrate buffer (pH = 5.3);
- Tri-enzymatic structures built with HRP in the first layer, GOx in the second layer and INV in the third layer have presented enzymatic activity results of approximately 1,5 times greater than structures built with GOx in the first layer, HRP in the second layer and INV in the third layer, when evaluated at citrate buffer.

The differences among these assemblies were credited to the microenvironments in the enzymes vicinities due to electrostatic interactions between enzymes aminoacids, substrate and solid support.

Bi-enzymatic structures were submitted to regular (sugar-sweetened) and “sugar-free” soft drinks real samples, as a proof of concept, and they have presented catalytic response in the detection of glucose in regular samples.

The designed three dimensional structure used to build the bi-enzymatic and tri-enzymatic structures has a potential for nano-sensing in food and beverage industries, detection of allergenic species, toxic components and contamination and also this strategy can potentially be used to mimic cell metabolic channels.

1. INTRODUÇÃO

No início dos anos 60 temos a primeira pesquisa publicada sobre biossensores, por Clark e Lyons, onde se apresenta a imobilização da glucose oxidase em um detector eletroquímico. Neste trabalho foi observado que o decréscimo da concentração de oxigênio era proporcional a concentração de glucose (CLARK e LYONS, 1962). Alguns anos depois Updike e Hicks apresentaram a fabricação de um eletrodo enzimático para a detecção de glucose (CASTRO-OTIZ et al., 2007; MALHOTRA e CHAUBEY, 2003).

Desde então os biossensores se tornaram um novo campo da ciência, campo que se expandiu enormemente nos últimos anos. Para ilustrar esta evolução, a Tabela I.1 apresenta os resultados da publicação de artigos sobre biossensores em diferentes períodos. Os valores atribuídos ao número de publicações representam o número acumulado de artigos publicados entre 1960 e o ano em análise. A pesquisa foi feita através da ferramenta de procura “SCOPUS”, utilizando-se como chave de procura o termo “biosensors”.

Tabela I.1 – Evolução do número de publicações sobre biossensores (Fonte: SCOPUS, 2012)

Ano	Número de publicações
1985	146
1995	3102
2005	32290
2012	93146

Especial interesse são os biossensores para aplicações clínicas de forma a atender a demanda em diversas aplicações. (DELVAUX et al., 2005). Para estes dispositivos os pesquisadores usam diversas biomoléculas, mas as enzimas oferecem algumas propriedades interessantes como a variedade de produtos mensuráveis, resultantes da sua ação catalítica (CHAMBERS et al., 2008).

Recentemente estão sendo incorporados os conhecimentos de nanotecnologia para a construção de biossensores, tanto para a melhoria da sensibilidade como de outros atributos

(CHEN et al., 2012; JEYKUMARY e NARAYANAN, 2008; JIANRONG et al., 2004). A fusão da biotecnologia com a nanotecnologia originou o termo nanobiotecnologia que consegue agregar o conceito de dimensões nanométricas com materiais biológicos (FORTINA et al., 2006).

A fabricação de biossensores através da aplicação de sucessivas camadas organizadas, de forma controlada, tem sido uma área ativa de pesquisa, especialmente através da técnica de “layer-by-layer” (L-b-L). Esta técnica tem se mostrado simples e versátil para controlar a estrutura e as propriedades dos filmes depositados a um nível molecular (PESCADOR et al., 2008). Interações específicas entre as moléculas hospedeiras (“host”) e depositadas (“guest”) são a força motriz para a deposição L-b-L de biomoléculas (KIN et al., 2010).

Desde a segunda metade do século 20, atenção especial tem sido dada para a imobilização de enzimas em biossensores devido as suas vantagens em comparação com os métodos anteriores de sensoriamento por enzimas em solução (PENG et al., 2012; LI et al., 2010; CAO et al., 2005). Também pode ser ressaltado que biossensores baseados na reação da β -D-glucose com a glucose oxidase (GOx) tem sido frequentemente utilizados como um modelo que pode ser estendido para outros modelos bioanalíticos e diferentes substratos (MANSUR et al., 2011).

Dentro desta perspectiva o objetivo deste trabalho é o estudo de biossensores enzimáticos obtidos através da construção de nanoestruturas que consistem em cascatas de enzimas. A nanoestrutura foi construída através da metodologia de deposição L-b-L, e foram empilhadas até três enzimas. A avaliação da eficiência das alternativas estudadas a cada camada era então realizada, de tal forma que fossem obtidas as melhores condições para a ordem relativa dos elementos da microestrutura.

Para este fim, estruturas multienzimáticas foram construídas em suportes funcionalizados utilizando-se de glucose oxidase (extraída do fungo *Aspergillus Niger*), peroxidase (proveniente do rábano silvestre) e invertase (proveniente de leveduras de pão). A imobilização foi realizada utilizando-se glutaraldeído na primeira camada e interações

avidina-biotina em camadas subsequentes. O funcionamento das mesmas traz à luz a possibilidade do emprego da estratégia adotada na construção de diferentes estruturas com utilização de diferentes biomoléculas em diferentes aplicações.

O trabalho está composto das seguintes avaliações:

- estudo de alternativas de funcionalização de superfícies com agentes modificadores de superfície silanos com adição de agente de imobilização covalente (glutaraldeído) para a imobilização de enzimas, através de medidas de cinética enzimática;
- estudo da influência da biotinação na eficiência da enzima através da cinética enzimática;
- comparação de estruturas multienzimáticas, incluindo a comparação em relação à ordem relativa dos seus constituintes e a variação das condições de reação (diferentes modulações de pHs).

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Este trabalho tem por objetivo o desenvolvimento, obtenção e caracterização de um biossensor nanoestruturado que consiste em uma cascata multienzimática.

2.2. Objetivos Específicos

A – Avaliar o processo de funcionalização de superfície por agentes modificadores silanos com o uso de suporte sólidos vítreos através da medição do ângulo de contato e espectroscopia por infravermelho (FTIR);

B – Avaliar a eficiência das superfícies funcionalizadas com agente modificador silano na imobilização de enzimas, com uso de agente de imobilização covalente (glutaraldeído), através da avaliação da cinética enzimática feita com o auxílio de espectroscopia ultravioleta-visível;

C – Avaliação do efeito da biotinação sobre a eficiência das enzimas através da avaliação da cinética enzimática, feita com o auxílio de espectroscopia ultravioleta-visível;

D – Avaliação da eficiência de diferentes estruturas bienzimáticas através do auxílio de espectroscopia ultravioleta-visível;

E - Avaliação da eficiência de diferentes estruturas trienzimáticas através do auxílio de espectroscopia ultravioleta-visível;

F- Avaliação da topologia da nanoestrutura no comportamento biocatalítico da arquitetura multienzimática.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Consulta de Bases de Dados de Patentes

A consulta de base de dados de patentes foi feita em duas etapas:

- Acesso ao Site do INPI (Instituto Nacional de Propriedade Industrial)

Quando da consulta no site do INPI em 10 de abril de 2012 selecionando-se a opção de procura por “palavra aproximada” na ferramenta de busca:

- setenta e uma patentes foram mostradas utilizando-se o termo “biossensor”;
- duzentas e setenta e três patentes foram mostradas utilizando-se o termo “enzima”.

Estas patentes tem escopo diferente da proposta deste trabalho.

- Acesso ao Site da World Intellectual Property Organization” (WIPO)

Utilizando a ferramenta de pesquisas de patentes disponível no site do “World Intellectual Property Organization” (WIPO) foram feitas, em 03 de maio de 2012, as seguintes pesquisas envolvendo os termos exatos:

- “trienzyme”: sete patentes foram apontadas;
- “cascaded biosensor”: quatro patentes foram apontadas;
- “cascaded reactors”: uma patente foi apontada;
- “cascade reaction”: quatrocentas e sessenta e seis patentes foram apontadas;
- “cascade enzymes”: cento e cinquenta e seis patentes foram apontadas.

Porém, todas as patentes possuem escopo diferente da proposta deste trabalho.

Estes resultados são positivos quanto à possibilidade de obtenção de patentes do objeto do trabalho.

3.2. Biossensores

Existem dezenas de definições de biossensores. Essencialmente o biossensor pode ser definido como um dispositivo de detecção (medição) que incorpora (MOHANTY e KOUGIANOS, 2006):

- elemento sensor biológico, ou derivado biologicamente, conhecido como **elemento de biorreconhecimento ou biorreceptor**;
- **estratégia de imobilização** que abrange tanto a funcionalização de superfície quanto o uso de espaçadores, quando aplicável;
- **transdução** para prover a indicação, sinal, ou outra forma de reconhecimento da concentração da espécie química ou do agente biológico a ser detectado (medido).

A Figura 3.1 representa um diagrama de um biossensor e seus elementos constituintes:

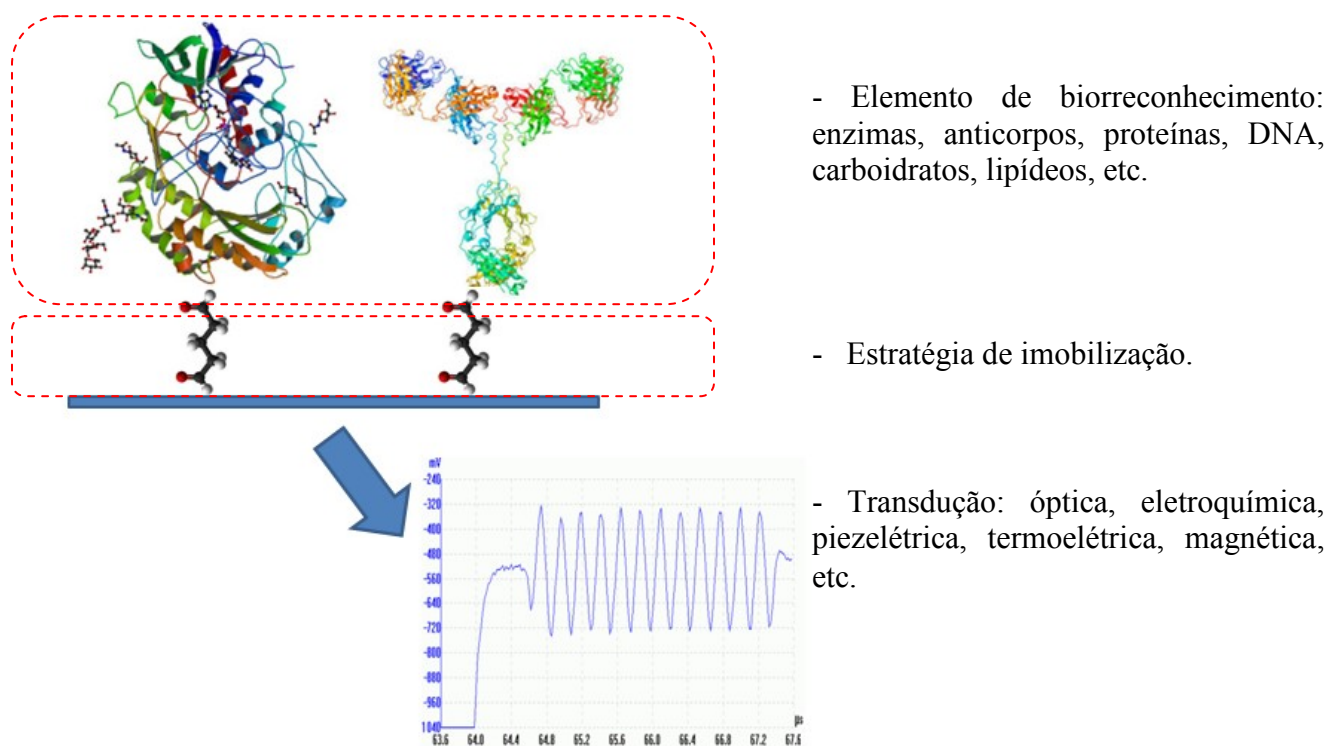


Figura 3.1 - Diagrama esquemático de um biossensor (Adaptado de: ROGER, 2006).

Algumas características desejáveis de um biossensor são:

A - Especificidade

É definida como a capacidade de discriminação da espécie de interesse pelas demais contidas no meio de medição. Esta característica é principalmente definida pelo elemento de biorreconhecimento (CASTILLO et al., 2004).

B - Sensibilidade

É definida como a resposta, em estado estacionário, da saída de um biossensor em função da mudança das espécies detectadas em sua entrada. Esta característica pode ser mais bem descrita pela equação 3.1 (TURNER et al., 1987).

$$S = \Delta O / \Delta I \quad (\text{Equação 3.1})$$

Sendo:

- ΔI = variação da concentração da espécie detectada;
- ΔO = variação do sinal de saída.

C - Ruído de Fundo

Usualmente os biossensores possuem algum ruído de fundo que deve ser subtraído das medições realizadas de forma a obter o valor correto da concentração da espécie detectada. Vários fatores podem gerar este ruído, tais como o efeito “seebeck” proveniente da junção de diferentes metais, fugas de corrente, adsorção não específica e fatores eletroquímicos diversos (BUERK, 1993).

D - Estabilidade

Esta característica está ligada à manutenção da sensibilidade por “longos” períodos de tempo. Formação de óxidos, saturação de substâncias podem comprometer a sensibilidade e por consequência a estabilidade do biossensor (THÉVENOT et al., 2001).

3.2.1. Elementos de Biorreconhecimento

Elementos de biorreconhecimento, ou biorreceptores, são elementos que tem a capacidade de interagir com o analito (elemento de interesse). Até o momento, não há um elemento de biorreconhecimento que possua todas as características ideais, existindo limitações de estabilidade mecânica, térmica e de preservação das suas propriedades por longos períodos (LIEBERZEIT e DICKERT, 2008). Há, porém, características que vão definir a sua escolha, sendo elas específicas para cada analito a ser detectado.

3.2.1.1. Enzimas

Enzimas são substâncias orgânicas de natureza geralmente proteica que catalisam reações químicas “in vivo”. Elas possuem dobramentos tridimensionais que lhes conferem formas características e exclusivas (diferentes enzimas tem diferentes formas), culminando nas suas especificidades (BYFIELD e ABUKNESHA, 1994). Na Figura 3.2 está representada a enzima glucose oxidase usando o modelo de fitas.

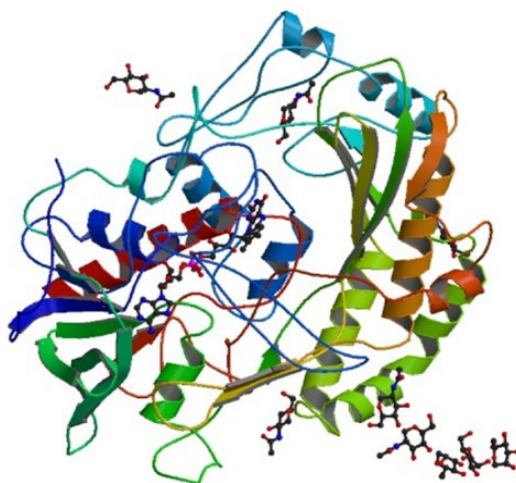


Figura 3.2 – Representação pelo modelo de fitas da enzima glucose oxidase (Fonte: “PROTEIN DATA BANK” – Entrada: 1GAL).

As enzimas possuem quatro estruturas que definem o seu funcionamento (REDD e NAGODAWITHAMA, 1995):

- Uma estrutura primária que consiste na sequência dos aminoácidos. Como por exemplo, pode ser vista a sequência de aminoácidos da GOx na Figura 3.3;
- Uma estrutura secundária obtida pela rotação de ligações da estrutura primária;
- Uma estrutura terciária que consiste em uma estrutura tridimensional formada a partir da interação dos grupos laterais da estrutura secundária;
- Uma estrutura quaternária – estrutura formada pelo conjunto de estruturas terciárias culminando na forma final da enzima

```

1  sngieasllt dpkdvsgrtv dyiiagggl t glttaaarlte npnisvlvie sgsyesdrgp
61  iiedlnaygd ifgssvdhay etvelatnq talirsgngl ggstlvnggt wtrphkaqvd
121 swetvfgneg wnwdnvaays lqaerarapn akqiaaghyf naschgvngt vhagprdtgd
181 dyspivkalm savedrgvpt kkdfgcgdph gvsmfpntlh edqvrdaar ewllpnyqrp
241 nlqvltgqyv gkvllsqngt tpravgvfeg thkgnthnvy akhevllaag savsptiley
301 sgigmksile plgidtvvdl pvglnlqdqt tatvrsrits agagggqaaw fatfnetfgd
361 ysekahelln tkleqwaeaa varggfhntt alliqyenyr dwivnhnvay selfldtagv
421 asfdvwdllp ftrgyvhild kdpylhhfay dpqyflnel llgqaaatql arnisnsgam
481 qtyfagetip gdnlaydadl sawteyipyh frpnyhgvgt csmmpkemgg vvdnaarvyg
541 vqqlrvidgs ipptqmsshv mtvfyamalk isdailedya smq

```

Figura 3.3 – Sequência de aminoácidos da GOx (Fonte: “NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION” – Entrada: 1GAL_A).

Adicionalmente, algumas enzimas necessitam de componentes adicionais para seu funcionamento, chamados cofatores. Os cofatores podem ainda ser classificados em coenzimas (se modificam durante a interação enzima-substrato), grupos prostéticos (grupos que possuem ligações fortes com as enzimas) e ainda íons metálicos (REDD e NAGODAWITHAMA, 1995).

A substância na qual as enzimas irão atuar é denominada “substrato” (S). A interação enzima-substrato gera outra substância: o “produto”(P). A região da enzima que se liga ao substrato e que interage na reação, é denominada de sítio catalítico ou sítio ativo, este está localizado no interior da sua estrutura proteica para reduzir interações não específicas (BYFIELD e ABUKNESHA, 1994).

Mesmo que reações de conversão de substratos em produtos sejam termodinamicamente favoráveis, com valores negativos de energia livre de Gibbs, há uma barreira energética que deve ser transposta e limita a cinética da reação. As enzimas são agentes biológicos que reduzem seletivamente as energias de ativação, que é a energia mínima para que o substrato alcance o estado de transição. A ação de redução da energia de reação através das enzimas pode ser visto no diagrama de coordenadas da reação da Figura 3.4.

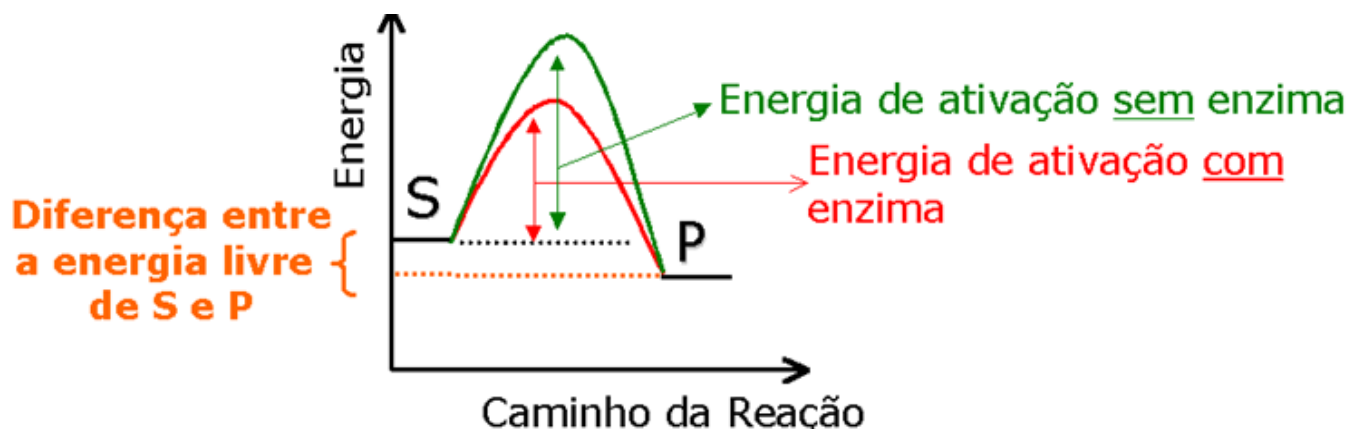


Figura 3.4 - Ação enzimática descrita pelo diagrama de coordenadas da reação (Adaptado de COPELAND, 2000).

É importante lembrar que não há efeito termodinâmico pela adição de enzimas. O ΔG (variação da energia livre de Gibbs) com ou sem adição da enzima tem o mesmo valor.

A conversão do complexo E(enzima)-S(substrato) em P(produto) pode ser descrita pela equação 3.2 (IM et al., 2012; KOLOMEISKY, 2011; BUERK, 1993).



Sendo:

- k_1 razão direta de formação do intermediário ES;
- k_{-1} razão reversa de formação do intermediário ES;
- k_2 razão de formação do produto.

As enzimas podem ser classificadas por diversos critérios, sendo o mais importante o estabelecido pela IUPAC (União Internacional de Química Pura e Aplicada - “International Union of Pure and Applied Chemistry”). Esta classificação permite a divisão das enzimas em seis classes distintas, de acordo com a reação por cada uma catalisada, conforme Tabela III.1. As enzimas possuem um código constituído por quatro partes, precedido das iniciais EC (iniciais de “Enzyme Commission”), em que: a primeira parte (1 dígito) se refere à classe a que a enzima pertence, a segunda parte (2 dígitos) determina mais especificamente o substrato nas quais ela reage e a terceira e quarta partes complementam a capacidade de individualização da enzima (COPELAND, 2000). A Tabela III.2 apresenta o código IUPAC das enzimas: glucose oxidase extraída do fungo *Aspergillus Niger*, peroxidase do rábano silvestre e da invertase de leveduras de pão, usadas na parte experimental.

Tabela III.1 – Classificação das diferentes enzimas (Fonte: COPELAND, 2000)

Número EC	Classe da Enzima	Reação
1	Oxido-Redutases	Reações de oxidação-redução
2	Transferases	Transferência de grupos químicos
3	Hidrolases	Reações de hidrólise
4	Liases	Remoção de grupos químicos (sem ser por hidrólise)
5	Isomerasas	Reações de mudança no arranjo dos átomos nas moléculas
6	Ligases	Reações de síntese acopladas à hidrólise de uma molécula de ATP

Tabela III.2 – Código IUPAC das enzimas GOx, HRP e INV (Fonte: SIGMA-ALDRICH)

Número EC	Enzima
EC 1.1.3.4	Glucose oxidase extraída do fungo <i>Aspergillus Niger</i>
EC 1.11.1.7	Peroxidase extraída do rábano silvestre
EC 3.2.1.26	Invertase extraída de leveduras de pão

Lembrando que a ação enzimática está no aumento da velocidade de reação (catálise enzimática), então para estudarmos o efeito da imobilização sobre a atividade enzimática torna-se necessário estudar os efeitos na **cinética** da reação envolvendo a enzima.

Cinética Enzimática

Tomando o aspecto termodinâmico, as enzimas são catalisadores biológicos que abaixam seletivamente as energias de ativação das reações químicas aumentando sua velocidade. Assumindo-se o caso envolvendo um único substrato se transformando em um único produto, conforme já descrito na equação 3.2, e que o passo limitante para a reação enzimática é a quebra do complexo ES para formar o produto e a enzima livre, podemos usar a equação de Michaelis-Menten para modelar a cinética enzimática (COPELAND, 2000).

Através deste modelamento, é possível obter uma equação que descreve a velocidade inicial de reação (v_0), ver equação 3.3, em função dos seguintes parâmetros (KOLOMEISKY, 2011; LIU et al., 2006; MARANGONI, 2003):

- $V_{\text{máx}}$: Velocidade máxima da reação, que é função da quantidade total de enzima do sistema;
- k_m : Constante de Michaelis-Menten, que depende das constantes de reação da equação 3.2. No gráfico resultante de Michaelis-Menten representa a concentração de substrato necessária para que a reação atinja a metade da sua velocidade máxima. É usada para comparação entre diferentes enzimas, pois com algumas considerações feitas ele pode dar uma **indicação da afinidade** da enzima pelo substrato;
- $[S]$: concentração do substrato.

$$v_0 = \frac{V_{\text{Máx}}[S]}{k_m + [S]} \quad (\text{Equação 3.3})$$

A Figura 3.5 apresenta o gráfico resultante do modelamento da atividade enzimática pelo modelo de Michaelis-Menten com a indicação dos parâmetros da equação.

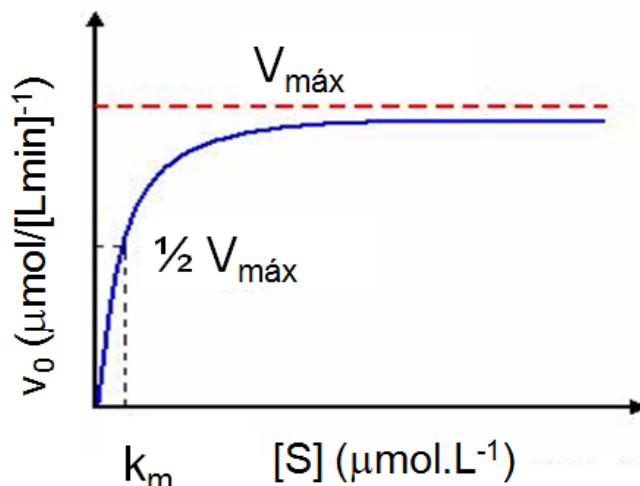


Figura 3.5 – Gráfico representativo do modelamento da cinética enzimática pela equação de Michaelis-Menten (Adaptado de MILLER e TANNER, 2008).

Enzimas Imobilizadas

Em adição à melhoria de manuseio, a fácil separação do produto, a possibilidade da imobilização multienzimática para reações em cascata são razões para a imobilização das enzimas (SHELDON, 2007).

Várias aplicações de enzimas imobilizadas tem sido relatadas, tais como no uso em biossensores para aplicações biomédicas (HOU et al., 2011; ELNASHAR, 2010), biossensores para detecção de contaminantes (SOLDATKIN et al., 2012; ROGER et al., 2006) e também em outras aplicações tais como uso em embalagens ativas - “active packing” (SUPPAKUL et al., 2003; CUTTER, 2002).

Exemplos de Enzimas

A - Glucose Oxidase (GOx):

A Glucose Oxidase é uma enzima oxidorreductase que catalisa a reação de transferência de elétrons da glucose (substrato) para o oxigênio molecular formando peróxido de hidrogênio. O seu sítio ativo, mostrado na Figura 3.6, inclui os resíduos de Glu 412 (ácido glutâmico), His 559 (histidina) e His 516 (SU e KLINMAN, 1999).

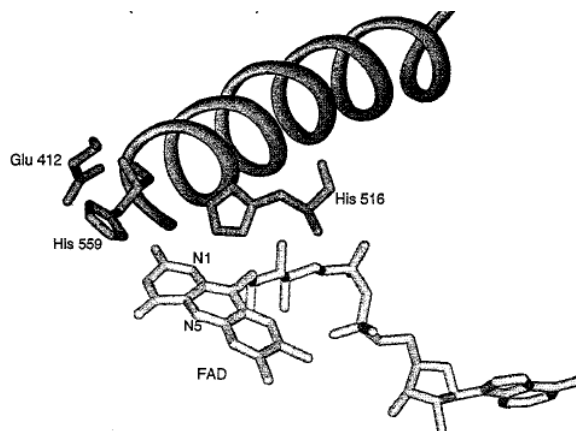


Figura 3.6 – Detalhamento do sítio ativo da GOx (Fonte: SU e KLINMAN,1999).

O ciclo catalítico da glucose oxidase, ilustrado na Figura 3.7, pode ser dividido em duas meias reações de redução e oxidação. Na reação de redução a GOx catalisa a oxidação da β -D-glucose formando glucono- δ -lactona que espontaneamente se hidrolisa, formando ácido glucônico). Nesta meia reação o cofator da GOx, o dinucleótido de flavina-adenina - FAD é reduzido para a forma FADH₂. Na reação de oxidação o cofator da GOx, antes reduzido na forma FADH₂, é reoxidado a FAD pelo oxigênio molecular e ocorre a formação de peróxido de hidrogênio(LESCOVAC et al., 2005; SU e KLINMAN,1999).

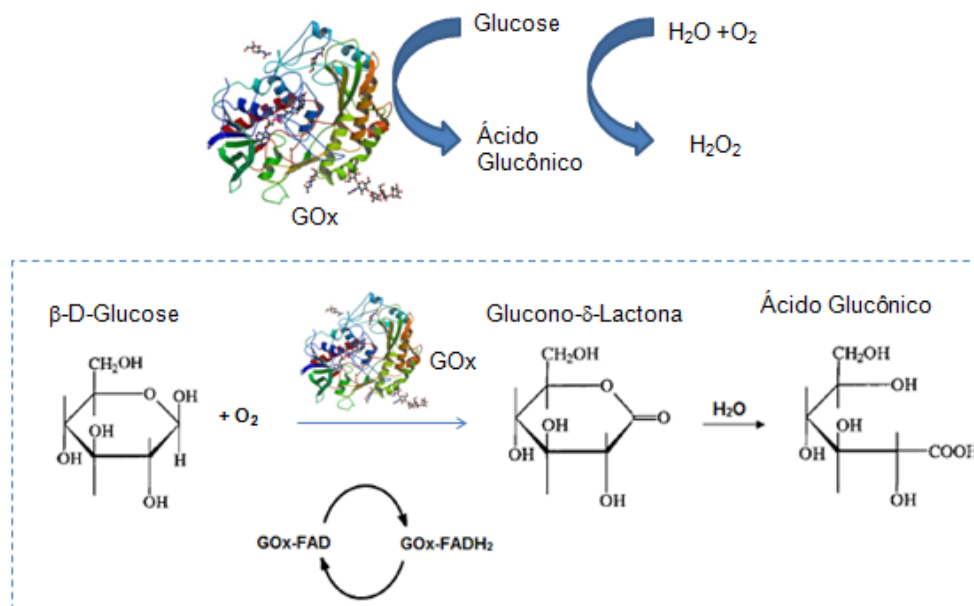


Figura 3.7 – Representação esquemática das etapas do ciclo catalítico da enzima GOx (Adaptado de MANSUR et al., 2011 e WITT et al., 2000).

Uma das formas de acompanhamento destas reações é recorrendo à outra reação de oxidação-redução, catalisada por outra enzima, em que se faz reagir o peróxido de hidrogênio com um substrato cromógeno (SONG et al., 2010).

B - Peroxidase proveniente do rábano silvestre (HRP):

A peroxidase proveniente do rábano silvestre é uma glicoproteína, classificada como oxidoreductase, que contém um grupo prostético heme ligado a dois íons cálcio. A Figura 3.8 apresenta a HRP pelo modelo de fitas, já a Figura 3.9 apresenta sua sequência de aminoácidos.



Figura 3.8 – Representação pelo modelo de fitas da enzima peroxidase proveniente do rábano silvestre (Fonte: “PROTEIN DATA BANK” – Entrada: 1HCH).

```

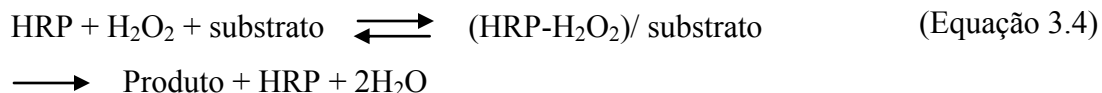
1  mqltptfydn scpnvsnivr dtivnelrsd priaasilrl fhhdcfvngc dasilldntt
61  sfrtekdafg nansargfpv idrmkaaves acprtvscad lltiaaqqsv tlaggpswrv
121 plgrrdslqa fldlananlp apfftlpqlk dsfrnvglnr ssdlvalsgg htfgknqcrf
181 imdrlynfsn tglpdptlnt tylqtlrglc plngnlsalv dfdlrtptif dnkyvvnlee
241 qkgliqsdqe lfsspnatdt iplvrfsfans tqtffnafve amdrmgnitp ltgtqgqirl
301 ncrvvnnsns

```

Figura 3.9 – Sequência de aminoácidos da HRP (Fonte: “NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION” – Entrada: CAA00083).

O ciclo de oxidação e redução do grupo heme, em presença do peróxido de hidrogênio, possibilita à enzima a oxidação de um variado grupo de compostos orgânicos e inorgânicos. Estes substratos incluem aminas, sulfonatos, fenóis aromáticos e ácidos fenólicos (VEITCH, 2004).

A maioria das reações da HRP pode ser descrita pela equação (ODENDAAL, 2009).



O seu sítio ativo inclui os resíduos de Glu 412 (ácido glutâmico), Phe 221 (fenilalanina) e ASP 247 (asparagina) (VISSER et al, 2003). O ciclo catalítico da HRP utilizando-se de TMB (3,3', 5,5' tetrametilbenzidina) como substrato está ilustrado na Figura 3.10.

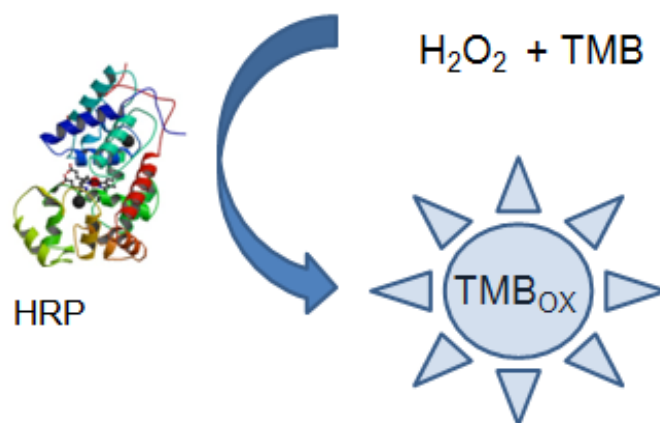


Figura 3.10 – Representação esquemática do ciclo catalítico da HRP pela oxidação de TMB (Adaptado de MANSUR et al., 2011 e RHEE et al., 2010).

C - Invertase proveniente de leveduras de pão (INV):

A invertase foi a primeira enzima a ser imobilizada em suporte sólido. Os primeiros trabalhos de imobilização foram feitos utilizando-se de carvão e hidróxido de alumínio, estes trabalhos foram relatados por Nelson e Griffin em 1916 (KOTWAL e SHANKAR, 2009).

Invertases são enzimas que catalisam a hidrólise da sacarose, resultando em glucose e frutose (DHATHATHREYAN, 2011), conforme pode ser visto na Figura 3.11. A reação segue a equação 3.5. (SOLDATKIN et al., 2012).

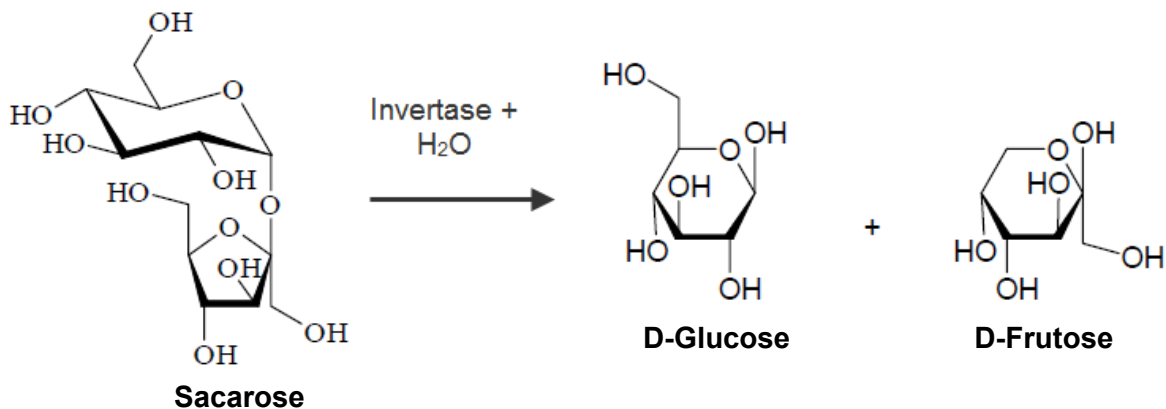
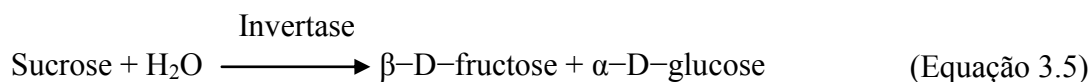


Figura 3.11 – Representação da hidrólise da sacarose com ação enzimática da invertase em meio aquoso (Adaptado de FERREIRA e ROCHA, 2009 e MATHLOUTHI e LUU, 1980).



Na Figura 3.12 está representada a invertase pelo modelo de fitas, já a Figura 3.13 apresenta sua sequência de aminoácidos.

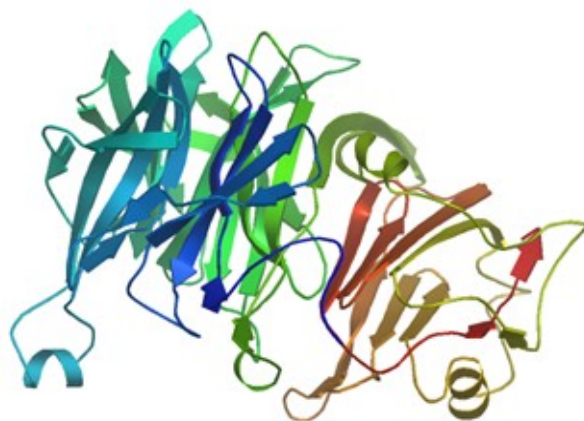


Figura 3.12 – Representação pelo modelo de fitas da enzima invertase - INV (Fonte: UNIPROT – Entrada: P00724).

MLLQAFLLFLLAGFAAKISASMTNETSDRPLVHFTPNKQWMDPNGLWYDEKDAKWHLYFQYNPNDTVWGTPLFWGHATSD
 DLTNWEDQPIAIAIPKRNDSGAFSGSMVVDYNNTSGFFNDTIDPRQRCVAIWYNTPESEEQYISYSLDGGYTFTEYQKNP
 VLAANSTQFRDPKVFVWYEPSQKWIMTAAKSQDYKIEIYSSDDLKSWKLESANEGFLGYQYECPLIEVPTQDPSKSY
 WVMFISINPGAPAGGSFNQYFVGSFNGTHFEAFDNQSRVVDFGKDYALQTFNTDPTYGSALGIAWASNWEYSFAVPTN
 PWRSSMSLVRKFSLNTEYQANPETELINLKAEPILNISNAGPWSRFATNTTLTKANSYNVDLSNSTGTLEFELVYAVNTT
 QTISKSVFADLSLWFKGLEDPPEEYLRMGFEVSSASSFFLDRGNSKVKFVKENPYFTNRMSVNNQPFKSENDLSYYKVYGLL
 DQNIILELYFNDGDVVSNTYFMTTGNALGSVNMTTGVDNLFYIDKQVREVK

Figura 3.13 – Sequência de aminoácidos da INV (Fonte: UNIPROT – Entrada: SUC2 [YIL162W]).

Em soluções aquosas a α -D-glucose sofre mutarotação, resultando numa solução de equilíbrio entre os anômeros β -D-glucose e α -D-glucose respectivamente na proporção aproximada de 64% e 36% (HA et al., 1991; FRANKS, 1987). Experimentos realizados com o anômero α -D-glucose em solução aquosa (pH =7) mostram que 50% da condição de equilíbrio é atingida em 20 minutos e 80% do equilíbrio é atingido em 50 minutos (GERAUDEAU et al., 2011; BARC'H et al., 2001).

Experimentos realizados por ADAMS e colaboradores (1960) mostram que a α -D-glucose em tampão citrato (pH= 4,8) atinge aproximadamente 50% da sua condição de equilíbrio em 12 minutos e aproximadamente 80% da condição de equilíbrio em 20 minutos, demonstrando a catálise ácida da reação.

3.2.1.2. Anticorpos

Anticorpos, ou imunoglobulinas, são glicoproteínas encontradas no soro sanguíneo ou em outros líquidos corpóreos dos vertebrados e que são usadas pelo sistema imunológico para identificar e neutralizar substâncias estranhas ao organismo. Normalmente um anticorpo só reconhece uma substância específica: o antígeno (BYFIELD e ABUKNESHA, 1994).

Depois que o sistema imunológico entra em contato com um antígeno (proveniente de bactérias, fungos, etc.), são produzidos anticorpos específicos contra ele. Uma representação da constituição do anticorpo pode ser vista na Figura 3.14.

Anticorpos são extensamente utilizados como elementos sensores em sistemas de detecção rápida. Sua principal vantagem é que não requer uma purificação prévia do analito - substância que será detectada (CHAMBERS et al., 2008).

A região de particular interesse para aplicação de biossensores é a Fab, por ser a região onde há a interação entre o antígeno-anticorpo, sendo responsável pela especificidade do sistema. As forças moleculares responsáveis pela ligação antígeno-anticorpo são baseadas em interações não covalentes (SANTOS, 2007).

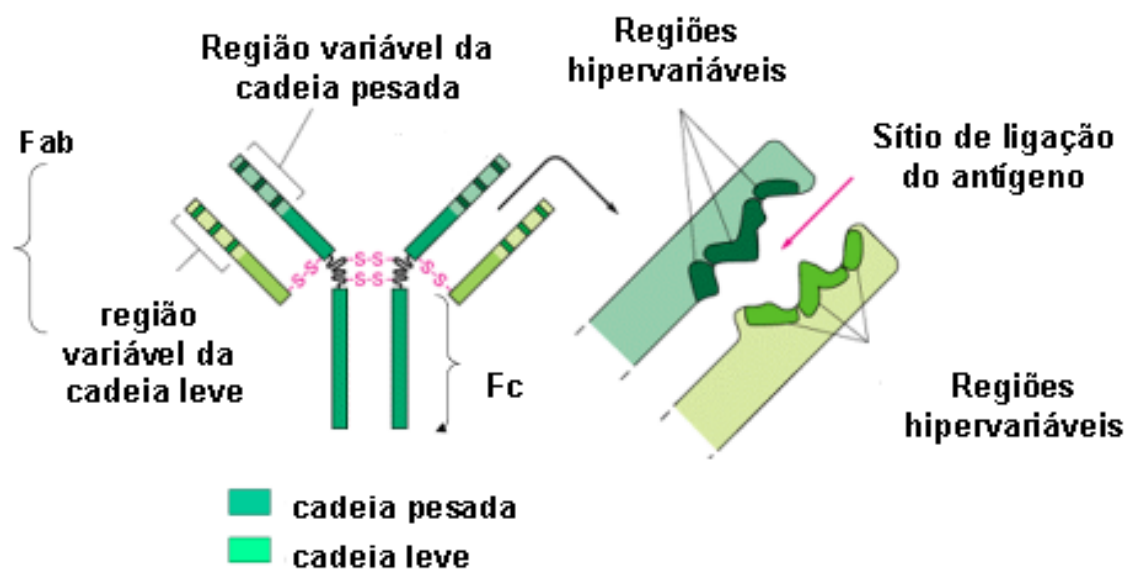


Figura 3.14 – Representação de um anticorpo (Fonte: UNICAMP).
Sendo:

- Fc = fração cristalina;
- Fab = fração de ligação com o antígeno.

Outra estratégia também utilizada é a da imobilização do antígeno. Para o caso de transdução elétrica esta imobilização pode ser vantajosa devido a seu pequeno peso molecular e alta constante dielétrica em comparação aos anticorpos (LISDAT e SCHÄFER, 2008).

3.2.1.3. Células

Células são pequenas estruturas ligadas a uma membrana que contém uma alta concentração de substâncias químicas, incluindo enzimas, ácidos nucleicos, íons, diferentes tipos de proteínas, células orgânicas pequenas e muitas outras. A complexidade das células tanto estrutural como química lhe conferem uma sensibilidade a uma vasta gama de compostos. Células de organismos mais simples, tais como algas, têm sido utilizadas com mais frequência em biossensores devido à sua maior robustez, depois de isoladas, do que aquelas obtidas de organismos mais complexos (BYFIELD e ABUKNESHA, 1994).

KÖSTER e colaboradores (2006) apresentam uma aplicação de imobilização de células para a detecção de compostos orgânicos dissolvidos.

3.2.1.4. Receptores

Receptores são proteínas ou glicoproteínas celulares que se ligam especificamente a substâncias químicas, resultando numa mudança conformacional na estrutura da proteína e assim desencadeando uma resposta celular. Apesar da sua atratividade, principalmente pela sua especificidade e afinidade, inicialmente os problemas relacionados com seu baixo rendimento, instabilidade relativa, dificuldade de isolamento e purificação e sua difícil transdução provocaram dificuldades na sua aplicação para a fabricação de biossensores (BYFIELD e ABUKNESHA, 1994).

3.2.2. Tipos de Transdução / Transdutores

3.2.2.1. Transdução Óptica

No desenvolvimento de biossensores a transdução óptica atraiu muito interesse e esforço de pesquisa desde seus primórdios. A razão para isto é que este tipo de transdução tem características tais como: alta sensibilidade, ser sensível a fenômenos de interface e possibilidade de uso em meio aquoso que normalmente são limitações impostas pelos biossensores (GIZELI e LOWE, 2002). Alguns exemplos de transdução óptica são:

A - Transdução Colorimétrica

A transdução colorimétrica emprega uma substância que muda de cor em função da presença da outra que se deseja quantificar (analito). Como por exemplo, para o acompanhamento da atividade enzimática da glucose oxidase é comum recorrer à reação de oxidação da 3, 3', 5, 5'-tetrametilbenzidina (TMB), catalisada com a enzima HRP (EISENTHAL e DANSON, 2002; GAO et al., 2011).

Neste tipo de sistema o peróxido de hidrogênio formado pela reação redox catalisada pela GOx é consumido, na presença da enzima HRP (peroxidase de rábano silvestre), durante a reação de oxidação do substrato cromógeno TMB formando o TMB_{ox} (TMB oxidado), resultando em um produto oxidado de cor azul. A oxidação da TMB resulta num cátion que forma um complexo de transferência de carga com o produto não oxidado, podendo ser monitorada através de espectroscopia UV-Vis, utilizando-se os comprimentos de onda de aproximadamente 215, 295, 370 e 655nm (MANSUR et al., 2011; SONG et al., 2010; LI et al., 2009; JOSEPHY et al., 1982).

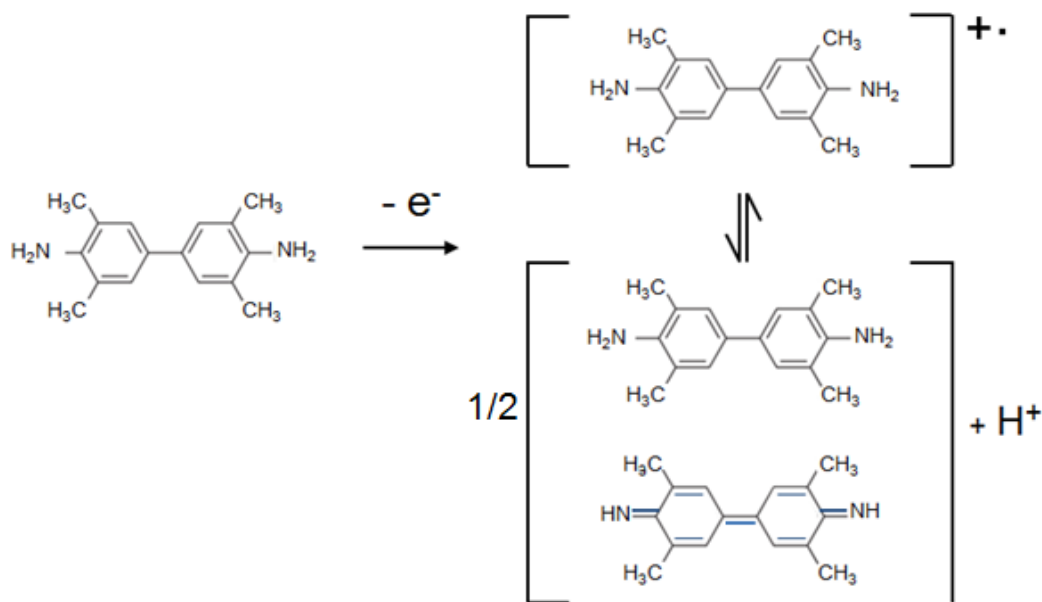


Figura 3.15 – Representação da oxidação da TMB (Adaptado de: SZILI et al., 2011).

A ocorrência da subsequente oxidação do TMB ou interrupção da reação do TMB com solução ácida resulta em um produto oxidado amarelo, com pico de UV-Vis em 450nm (RHEE et al., 2010; GAO et al., 2011).

B - SPR (Surface Plasmon Resonance)

“Surface Plasmons” ou plásmons de superfície, em português, são oscilações de densidades de carga que se propagam na direção paralela a interface de dois meios com constantes dielétricas de sinais opostos. Estas ondas são sensíveis a mudanças na superfície, tais como a adsorção de moléculas, micro-organismos, etc (LUPPA et al., 2001).

Para excitação destas ondas um feixe de luz (usualmente visível ou infravermelho) com polarização adequada incide no material, que normalmente constitui-se de folhas de Ag ou Au. A alteração da superfície incidente, pela imobilização do elemento de biorreconhecimento e depois pela interação analito com o mesmo, provoca a alteração do índice de refração da luz incidente e conseqüentemente alterando o seu ângulo de reflexão. Esta alteração do ângulo é correlacionada com a concentração da espécie detectada, neste caso, adsorvida na superfície (LUPPA et al., 2001).

SINGH e HILLIER (2007) ressaltam como vantagens da técnica de transdução SPR o uso de pequenos volumes de reagentes, a possibilidade de análise em tempo real e a eliminação da necessidade de reações marcadas.

DAMOS e colaboradores (2004) apresentam uma boa discussão sobre a técnica e TOBISKA (2005) descreve a complexidade do algoritmo necessário para o tratamento de dados.

C - Interferometria Mach-Zehnder

O princípio de funcionamento da interferometria Mach-Zehnder (MZI – “Mach-Zehnder Interferometry”) é ilustrado na Figura 3.16.

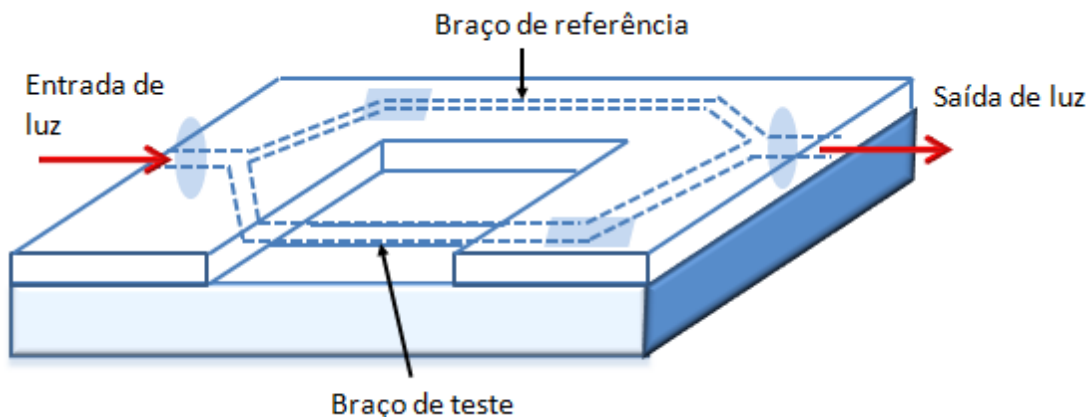


Figura 3.16 – Interferometria Mach-Zehndler (Adaptado de: FAN et al., 2008).

Luz coerente, de frequência e polarização únicas, é aplicada à entrada de uma guia de ondas e é dividida igualmente em uma junção de dois braços. Um dos braços possui uma janela que possibilita a interação do campo evanescente com a amostra, já o outro é isolado da mesma. As porções finais dos dois braços são combinadas na saída do dispositivo, resultando em interferência. Um fotodetector é colocado para medir a saída (FAN et al., 2008).

D - Interferometria de Young

A diferença desta técnica é que não há a recombinação dos braços conforme a interferometria MZI. Ao invés disso a saída ótica dos dois braços é usada para a formação de franjas de interferência numa tela de detecção (FAN et al., 2008).

E –Interferometria de Retro-Espalhamento

Um sistema de interferometria por retroespalhamento consiste num feixe de luz coerente focado numa pequena área e um detector para analisar a intensidade refletida. A presença de estruturas menores que o comprimento de onda na superfície de detecção resultará em interferência no detector (FAN et al., 2008).

3.2.2.2. Transdução Capacitiva

A interação entre a espécie a ser detectada e o elemento de biorreconhecimento provocará a alteração das propriedades dielétricas (BUERK, 1993). Duas abordagens são normalmente usadas:

A - Eletrodos Interdigitados

Neste caso a expressão de capacitância dada pela equação 3.6

$$C = \varepsilon_0 \varepsilon_r \frac{A}{d} \quad (\text{Equação 3.6})$$

Sendo:

- ε_0 = permissividade do ar: 8,85419pF/m;
- ε_r = constante dielétrica do eletrólito;
- A = área das placas;
- d = distância entre os eletrodos.

KALLEMPUDI e colaboradores (2008) relatam o uso desta técnica para a detecção e quantificação de proteínas que indicam risco cardiovascular.

B - Eletrodos por Membrana

Neste tipo de capacitor um dos eletrodos é fixo, no suporte sólido, e o outro flexível. Conforme as interações entre biomoléculas na superfície da membrana acontecem, há o aparecimento de forças de stress na superfície, causando sua deformação e consequente variação da capacitância (TSOUTI et al., 2008).

3.2.2.3. Transdução Condutiva

A condutividade entre dois eletrodos é usada para detecção da espécie de interesse. LU e colaboradores (2008) apresentam uma interessante detecção de bactéria através da medição da condutividade entre eletrodos de ouro. Neste estudo o biossensor era retirado do meio e submetido a uma etapa de secagem para retirar o efeito do eletrólito.

Uma aplicação desta técnica é a da medição de condutividade em fios poliméricos (“polymeric wires”), onde normalmente a condução entre dois eletrodos é alterada pela interação de analitos bioconjugados com polímeros condutores sobre um elemento de biorreconhecimento adequado. Exemplos desta aplicação podem ser vistos em YUK e colaboradores (2009), OKAFOR e colaboradores (2008) e PAL e colaboradores (2007).

3.2.2.4. Transdução Calorimétrica

A transdução calorimétrica está baseada na detecção do calor das reações biotérmicas e mudanças de entalpia. Porém apresenta baixa sensibilidade se comparado com métodos eletroquímicos (CHERAN et al., 2008).

3.2.2.5. Transdução Acústica

Materiais piezelétricos, na sua forma cristalina, têm habilidade de gerar e transmitir ondas acústicas. A frequência de ressonância destas ondas depende das propriedades físicas do cristal, resultando no efeito de alteração da frequência de ressonância, em comparação com a frequência inicial, quando houver a adição de massa na superfície do mesmo (DAMOS et al., 2004).

Em relação à propagação da onda, há duas classes de dispositivos a serem explorados para o uso desta transdução:

- dispositivos BW (“Bulk Waves”): a propagação da onda acústica se dá de uma face à outra do cristal, percorrendo o interior do material;

- dispositivos SAW (“Surface Acoustic Waves”) a propagação da onda acústica se dá ao longo de uma mesma face de um cristal, de uma posição à outra.

A seguir, serão apresentados os métodos de transdução acústica, sem se importar com a classificação em relação à propagação da onda.

A - Microbalança por cristal de quartzo (Quartz Cristal Microbalance QCM)

Esta consiste em um disco de cristal nos quais dois eletrodos são formados nas suas faces. A aplicação de um campo elétrico perpendicular aos eletrodos produz um deslocamento (efeito piezométrico) no cristal (ATASHBAR et al, 2005). Na Figura 3.17 temos uma foto de um cristal usado para a realização de medidas utilizando-se QCM.

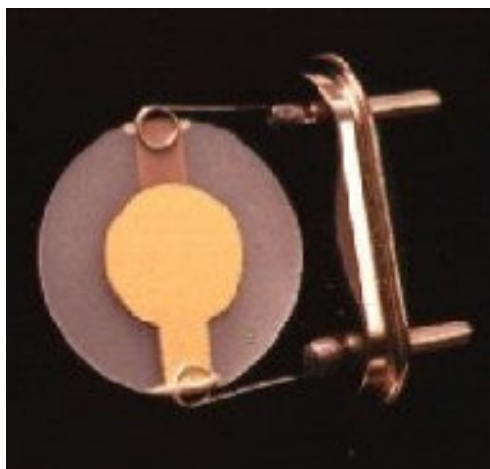


Figura 3.17 – Cristal usado na balança QCM (Fonte: INTERNATIONAL CRYSTAL MANUFACTURING, 2011).

Através da variação da frequência ressonante de oscilação de um cristal de quartzo, podemos detectar a alteração de sua massa. Esta técnica é conhecida como Microbalança de Cristal de Quartzo, ou “Quartz Cristal Microbalance” – QCM, e permite efetuar medidas de variação da ordem de nanogramas (YUWONO e LAMMERS, 2004; MARCH, 2009).

Esta relação entre o desvio na frequência de ressonância de uma microbalança de quartzo e sua variação de massa é dada pela relação de Sauerbrey (NAKAMURA et al., 2000). Que pode ser vista na equação 3.7:

$$\Delta f_m = f_m - f_c = - \left(\frac{2f_c^2 \Delta m}{A \sqrt{\mu_c \rho_c}} \right) \quad (\text{Equação 3.7})$$

Sendo:

- Δf_m = desvio da frequência de ressonância (f_c) ocorrido na microbalança devido à variação de massa (Δm) em sua superfície, resultando numa nova frequência de oscilação (f_m);
- A = área da face do cristal onde é feita a deposição dos filmes finos;
- μ_c = módulo de cisalhamento do cristal de quartzo;
- ρ_c = densidade do cristal de quartzo.

B - Dispositivos de Onda Acústica Superficial (SAW)

Estes dispositivos também se utilizam do efeito piezelétrico, mas diferentemente do cristal da balança QCM os eletrodos são construídos do mesmo lado do cristal, em lugar de em faces opostas. Um eletrodo é usado para induzir uma vibração que viaja por uma onda que atinge o outro eletrodo. Um atraso de propagação pode ser detectado e é relacionado com a alteração de massa na superfície (BUERK, 1993).

Uma interessante revisão sobre esta técnica de transdução pode ser vista em LÄNGE e colaboradores (2008).

3.2.2.6. Transdução Micromecânica

Nas últimas duas décadas, avanços nos sistemas microeletromecânicos (MEMS – “Microelectricalmechanical systems”) facilitaram o desenvolvimento de transdução que envolve energia mecânica (LAVRIK et al., 2004)

ZIEGLER (2004) classifica a transdução micromecânica em três métodos, de acordo com o sinal de saída do transdutor:

- mudança de frequência de vibração pela adição de massa;
- medida de temperatura pela flexão de um par bimetálico, provocada pelo calor gerado da adsorção de uma substância;
- pela medida do deslocamento devido a tensões superficiais em um lado do sensor.

3.2.2.7. Transdução Eletroquímica

A - Amperométrica

Um potencial constante é mantido entre os eletrodos de trabalho e referência. A corrente gerada pelas reações redox nos eletrodos é medida. O sinal gerado será proporcional à transferência de massa entre as espécies eletroativas e os eletrodos. Notadamente há consumo das espécies, bem como alteração do eletrodo, o que implica que seu uso contínuo pode gerar problemas de medição. O valor de pico de corrente medido sobre potencial constante é proporcional à concentração do analito. Mediadores eletroquímicos são utilizados nos casos de imobilização de proteínas, já que nem todas as proteínas são intrinsecamente capazes de servir como agente redox das reações (THÉVENOT et al., 2001).

GRIESHABER e colaboradores (2008) citam que os limites atuais de detecção desta técnica podem chegar próximos à 10^{-7} mol.L⁻¹ e relata que um simples exemplo de biossensor amperométrico é o biossensor que utiliza eletrodos de oxigênio de Clark. Este dispositivo determina a quantidade de oxigênio reduzido presente na substância a ser detectada. Durante seu desenvolvimento, problemas devidos à dependência da reação em função da concentração de O₂ na solução exigiram novas soluções e atualmente a transdução é obtida através da remoção de elétrons de enzimas reduzidas (biodetector) e os eletrodos são cobertos com sais orgânicos.

B - Potenciométrica

Esta transdução é feita pela medida da diferença de potencial entre os eletrodos de trabalho e referência com corrente nula ou não significativa.

A relação entre a concentração do analito e o potencial medido é ditada pela equação 3.8, denominada equação de Nernst (GRIESHABER et al., 2008).

$$E_{cell} = E_{cell}^0 - \frac{RT}{nF_k} \ln Q \quad (\text{Equação 3.8})$$

Sendo:

- E_{cell}^0 = potencial padrão de contribuição da célula;
- R = constante universal dos gases;
- T = temperatura absoluta;
- n = número de carga da reação no eletrodo;
- F_k = constante de Faraday;
- Q = razão entre as concentrações de íons no anodo e no catodo.

C - Condutivimétrica

Esta transdução é feita pela medida da condutividade entre os eletrodos de trabalho e referência com aplicação de uma corrente constante. Sua aplicação em reações enzimáticas é possível, nas quais há produção de variações de concentração de espécies carregadas na solução (SOLDATKIN et al., 2012).

Uma técnica particular é denominada espectroscopia de impedância eletroquímica (EIS - DATKIN “Electrochemical Impedance Spectroscopy”) na qual um potencial senoidal é aplicado a eletrodos interdigitados e mede-se, então, o valor da impedância entre os mesmos.

3.2.2.8. Transduções Especiais

A - Transistores de Efeito de Campo (FET – “Field Effect Transistors”)

Estes elementos consistem em semicondutores no qual a corrente entre dois terminais (denominados de fonte e dreno) é modulada pela aplicação de tensão em um terceiro terminal, denominado porta, ou mais usualmente “gate” (ESTRELA et al., 2005)

Várias tecnologias são utilizadas para a fabricação destes componentes, levando a diferentes formas da formação de um canal de condução entre a fonte e o dreno. Estas formas nos levam a diferentes acrônimos denotando a tecnologia de fabricação, tais como JFET (Transistor de efeito de campo de junção de porta - “Junction Gate Field-Effect Transistor”) e MOSFET (Transistor de efeito de campo de semiconductor de óxido metálico - “Metal–Oxide–Semiconductor Field-Effect Transistor”), por exemplo.

Para aplicações em biotecnologia, o “gate” é utilizado elemento biossensível, sendo hoje mais estudados os ISFETS (“Ion selective FETs”) e os EnFETs (“Enzime FETs”) (GRIESHABER et al., 2008).

Várias configurações para a fabricação de FETs para aplicações biológicas, ou mais simplesmente BioFETs, tem sido publicadas. GRIESHABER e colaboradores (2008) apresentam um relato sobre esta evolução e aponta uma classe especial de FETs que tem gerado interesse recentemente, estes são FETs que se utilizam de nanofios (“Nanowires”). A Figura 3.18 mostra uma ilustração deste componente

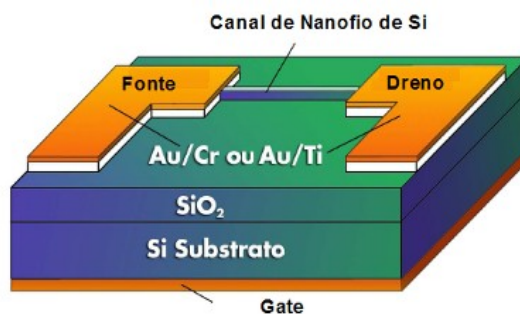


Figura 3.18 – FET com canal de nanofio de Si (Adaptado de GRIESHABER et al., 2008).

Devido a grande razão entre superfície e volume (“surface-to-volume ratio”) nos nanofios, influências externas por partículas biológicas ou cargas provocam alterações na sua condução tanto de superfície quanto do seu interior (GRIESHABER et al., 2008)

ESTRELA e colaboradores (2005) relatam a construção de FETs de filmes de polissilício para a medição de pH e de penicilina, obtendo sucesso.

CHANIOTAKIS e SOFIKITI (2008) fazem uma revisão do uso de novos materiais que podem ser usados como suporte sólido para a construção de FETs para biossensores: diamante e GaN.

B - Transdutores de Efeito Hall

O fenômeno de efeito Hall foi primeiramente descrito por Edwain Hall em 1879. Ele pode ser descrito de maneira simplificada como o aparecimento de uma diferença de potencial entre diferentes extremidades de um condutor quando uma corrente é exposta a um campo magnético perpendicular à mesma. Um diagrama mostrando o princípio do efeito Hall pode ser encontrado na Figura 3.19 (JOHNSTONE, 2008).

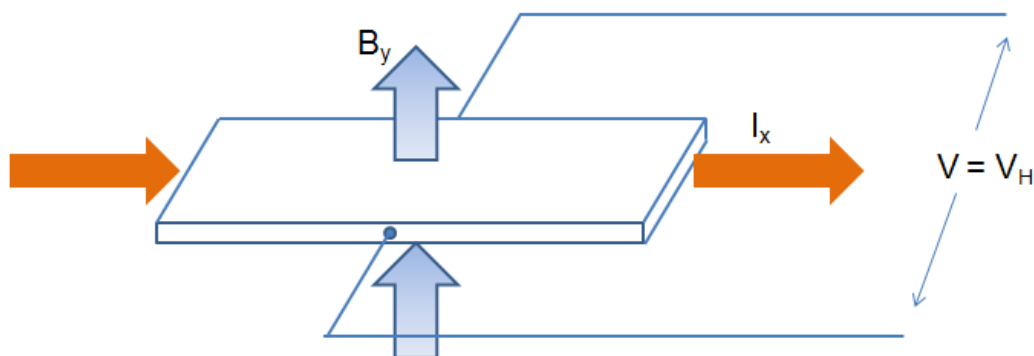


Figura 3.19 - Diagrama demonstrando o princípio do efeito Hall (Adaptado de JOHNSNTONE, 2008).

JOHNSTONE (2008) apresenta a equação que descrevem o efeito Hall, que pode ser descrita pela equação 3.9.

$$V_H = \frac{1}{nq} \frac{B_y I_x}{y} \quad (\text{Equação 3.9})$$

Sendo:

- V_H tensão de efeito Hall
- n densidade de portadores de carga;
- q carga de cada portador;
- B_y densidade de fluxo magnético;
- I_x corrente na direção X;
- y espessura do material.

- O termo $1/nq$ é conhecido como **Coefficiente Hall (R_H)**. A equação 3.9 leva em consideração apenas a existência de um portador de carga. Na eventualidade da necessidade de consideração de vários portadores de carga correções na equação devem ser empregadas.

3.2.3. Estratégia de Imobilização

A imobilização de biomoléculas, retendo todas as características, é a etapa crítica na construção de biossensores (SASSOLAS et al., 2012).

Para cumprir seu papel é importante que o produto da imobilização tenha uma ampla faixa de trabalho, em função de temperatura, pH e outros parâmetros ditados pela aplicação do biossensor (ELNASHAR, 2010).

Vários materiais orgânicos e inorgânicos têm sido experimentados tais como: polímeros condutivos, nanomateriais, materiais a base de carbono e metais. Técnicas tais como superfícies automontadas - SAMs (“Self Assembly Monolayers”), sol-gel, deposição de filmes Langmuir-Blodgett (LB) e polímeros com conformação molecular MIP (“Molecular Imprinted Polymers”) têm sido empregadas na aplicação destes materiais (RATNER et al., 2004).

SASSOLAS e colaboradores (2012), SHELDON (2007) e GÖPEL e HEIDUSCHACA (1995) relacionam de forma macro as seguintes estratégias de imobilização em suportes sólidos:

- Aprisionamento (“entrapment”): quando o elemento de detecção é preso ao agente imobilizador em matrizes tridimensionais durante alguma transformação, como por exemplo, durante a polimerização ou transição sol-gel. Nesta técnica o controle do tamanho dos poros deve ser feito de forma cuidadosa de forma a evitar que se torne um obstáculo para que o substrato tenha acesso à enzima;
- Adsorção física: este método envolve adsorção do elemento de biorreconhecimento formando um filme de moléculas ou átomos, sem haver difusão dos mesmos para o sólido. As forças presentes na fixação destas moléculas ou átomos são de natureza fraca (van der Waals), interações iônicas e interações hidrofóbicas entre o substrato e a elemento de biorreconhecimento. No caso de enzimas esta estratégia geralmente ocasiona mudanças conformacionais gerando diminuição das suas funções, além disso, a desorção das enzimas acontece em condições “amenas” de uso devido à baixa intensidade das forças envolvidas neste tipo de imobilização (SHELDON, 2007);
- Ligações covalentes: neste método as moléculas do elemento de biorreconhecimento têm ligações covalentes com o agente imobilizador. A ligação covalente se apresenta como uma forma direcionada de imobilização onde é possível o planejamento da imobilização através:
 - da escolha da funcionalização da superfície, elencando os grupos químicos a serem disponibilizados na superfície do suporte sólido;
 - da seleção de um eventual espaçador a ser utilizado;
 - do elemento de biorreconhecimento a ser imobilizado.

- Ligações por afinidade: baseiam-se na bioafinidade entre moléculas, como por exemplo, na bioafinidade da avidina-biotina. Possuem vantagens adicionais de controle de posicionamento e na especificidade dos sítios dos biorreceptores a serem empregados.

A representação esquemática das estratégias de imobilização pode ser vista na Figura 3.20.

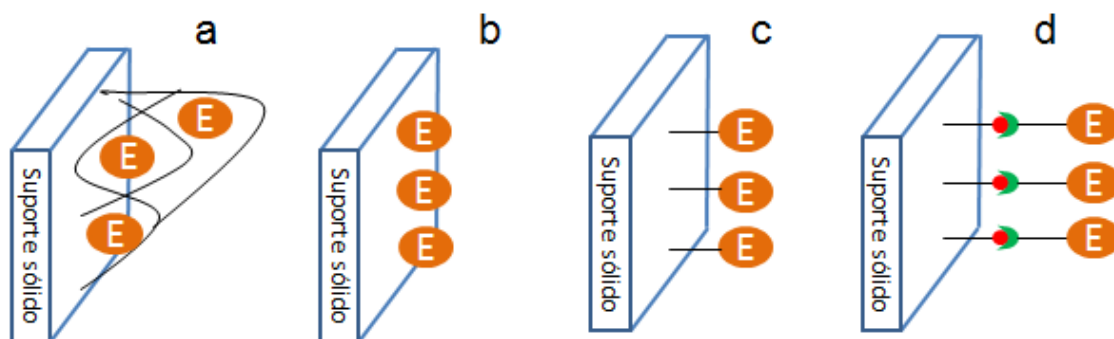


Figura 3.20 – representação esquemática das estratégias de imobilização: amarrilhamento [a], adsorção [b], ligação covalente [c] e afinidade [d] (Adaptado de SASSOLAS et al., 2012).

Para que a estratégia de imobilização seja colocada em prática muitas vezes é necessária a funcionalização da superfície de um suporte sólido, de forma a prover grupos reativos necessários para a imobilização do agente de biorreconhecimento (BALDRICH et al., 2008).

Quanto à espessura resultante da funcionalização no suporte sólido, camadas finas são desejáveis para que não haja modificação do mesmo, mas como desvantagem camadas muito finas estão sujeitas a reversão de superfície e erosão. O balanço entre estas afirmações é que tais camadas devem ser espessas somente o suficiente para garantir sua uniformidade, durabilidade, e funcionalidade (RATNER et al., 2004).

No item 3.2.3.1 serão apresentados alguns métodos de funcionalização de superfícies.

3.2.3.1. Métodos de Funcionalização

A – Funcionalização de Superfícies por Reação Química

Ocorre pela reação química entre o reagente e os átomos da camada superficial do suporte sólido, sem que haja a formação de uma nova camada. Estas reações podem ser classificadas como não específicas, quando a reação deixa diferentes grupos funcionais na superfície, ou específicas quando a reação deixa apenas um grupo funcional na superfície (RATNER et al., 2004).

B - Funcionalização de Superfícies por Enxertamento (“Grafting”)

A funcionalização por enxertamento baseia-se na quebra de ligações da superfície do material deixando radicais livres na superfície através da aplicação de radiação ou feixe de elétrons. Estes radicais podem então interagir com outras moléculas.

O mecanismo para promover a quebra destas ligações pode ser obtido através do uso de radiação ionizante, por feixes de elétron com alta energia ou por radiação ultravioleta (RATNER et al., 2004).

C - Funcionalização de Superfícies por Plasma

A técnica de plasma usualmente empregada para uso de funcionalização de superfícies opera em pressão ambiente ou ligeiramente abaixo da mesma.

Plasmas podem ser usados para funcionalizar as superfícies de duas formas: por deposição ou por desbaste. Algumas vantagens são sua boa conformação, aderência, e adesão ao suporte sólido, bem como a minimização de defeitos. Existem, porém, certas desvantagens que devem ser analisadas, tais como alto custo do equipamento, facilidade de contaminação dos gases a serem usados e no caso do método de deposição e que por vezes é difícil garantir a composição homogênea do suporte sólido (RATNER et al., 2004).

D - Funcionalização de Superfícies por Sol-Gel

Este processo tem aplicações tanto no aprisionamento de biorreceptores, apresentando diversas vantagens tais como: grande capacidade de aprisionamento (“entrapment”), estabilidade térmica e química, simplicidade de formação e flexibilidade de controle de tamanho de poros e geometria (ARYA et al., 2008), bem como na criação de filmes na superfície do suporte sólido com grupos funcionais sendo disponibilizados para a posterior imobilização do biorreceptor através do uso de agentes organossilanos (MANSUR et al., 2005).

Os agentes organossilanos provêm uma ligação entre materiais inorgânicos e orgânicos, ou modifica a superfície de materiais. A ligação orgânica é feita através de grupo funcional característico do agente em questão, que no caso de funcionalização de superfícies será também o responsável por suas propriedades (XIE et al., 2004; MANSUR et al., 2005).

A Figura 3.21 apresenta a fórmula geral dos agentes silanos, com dois grupos de funcionalidades distintas. O grupo hidrolisável e o grupo organofuncional (KATHI et al., 2009).

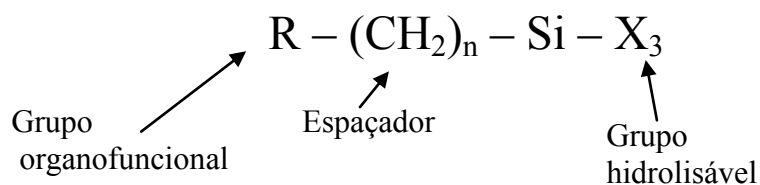


Figura 3.21 - Fórmula geral dos agentes silanos (Adaptado de KATHI et al., 2009).

A funcionalização por agentes silanos envolve uma reação química usada, na maioria dos casos, para modificar superfícies hidrofílicas tais como vidros, germânio, alumina, quartzo e vários óxidos metálicos, através da reação das hidroxilas do suporte sólido com os resíduos metoxi ou etoxi dos silanos. Estes últimos sofrem hidrólise formando silanóis para depois, através de uma reação de condensação, se ligar as hidroxilas do suporte sólido (BISTRIC et al., 2007).

Vários compostos silanos estão disponíveis comercialmente, permitindo uma incorporação de uma grande gama de funcionalidades na superfície. Um dos fatores que definem a escolha do silano a ser utilizado é o grupo reativo da molécula a ser imobilizada. (CASS e LIGLER, 1999).

Duas estruturas de filmes de superfície podem ser formadas por silanização. A primeira ocorre quando apenas reações na superfície estão presentes, já na segunda estrutura, somam-se ligações entre silanos que acontecem no “interior” do filme, fazendo estruturas tridimensionais (RATNER et al., 2004), como pode ser visto na Figura 3.22. A formação de filmes multicamadas é favorecida em condições de altas concentrações do agente silano, (ROSTAMI et al., 2011).

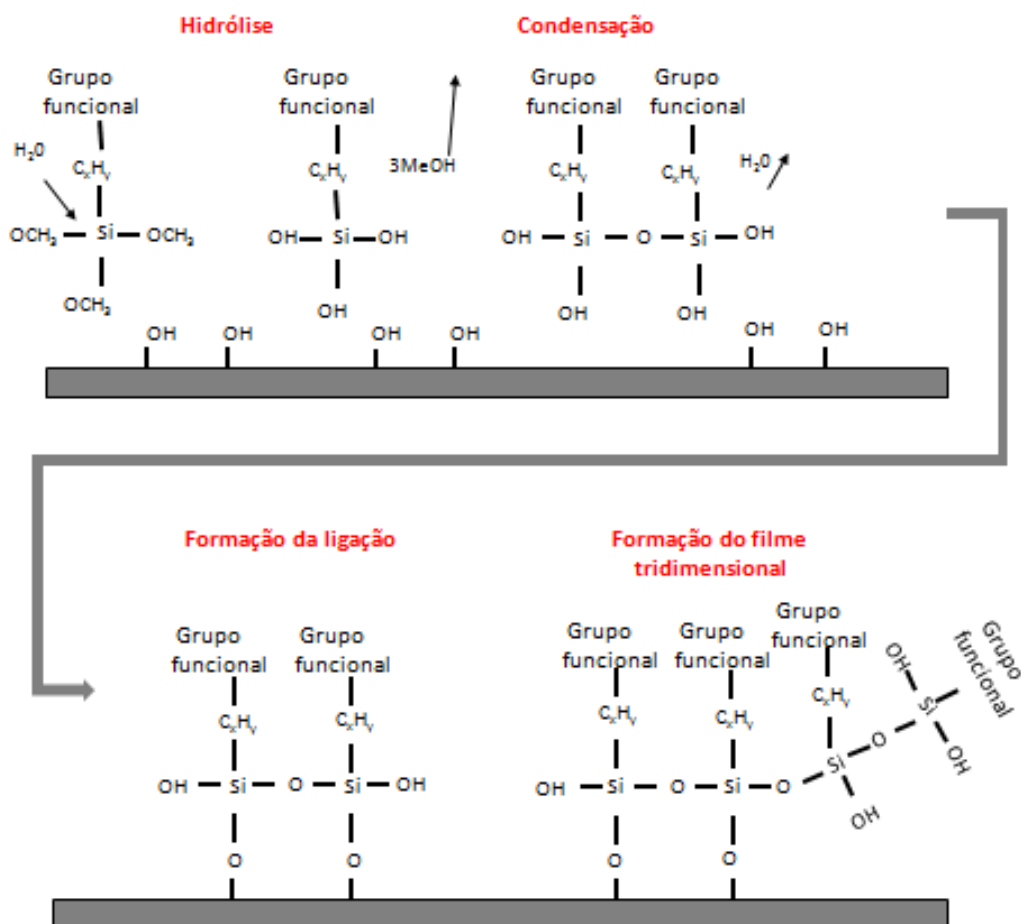


Figura 3.22 - Típica formação de filmes por funcionalização por agentes silanos. Adaptado de RATNER et al. (2004).

Para garantir a reprodutibilidade da modificação de superfícies é necessário o controle das reações de hidrólise e condensação. As reações de hidrólise e condensação podem ser catalisadas em condições ácidas ou básicas. Em condições ácidas há um favorecimento da hidrólise, a formação de gel é lenta e o processo determinante é o da nucleação, em condições de pH básicas há um favorecimento da condensação, a formação do gel é rápida e o processo determinante é o de crescimento (ARKLES, 1992).

E - Funcionalização de Superfícies pelo Uso de Filmes Langmuir Blodgett

O método de deposição de filmes de Langmuir-Blodgett (LB) pode ser definido como uma técnica de transferência de uma ou mais monocamadas de um filme orgânico, da superfície de uma solução aquosa, para um suporte sólido (MARTIN e SZABLEWSKI, 2001).

Quando da introdução de moléculas do material surfactante em uma superfície polar líquida, haverá uma orientação destas moléculas. A parte hidrofílica será atraída para o interior do líquido, enquanto a parte hidrofóbica irá se direcionar para o ar. Uma monocamada de superfície será formada se houver um equilíbrio entre estes dois componentes. Pode-se então fazer com que haja a compressão desta monocamada, com barreiras, fazendo com que as moléculas formem uma monocamada ordenada e compacta que denominamos filme Langmuir (MARQUES, 2003). Tal evento está representado na Figura 3.23.



Figura 3.23– Ilustração da compressão da monocamada (Adaptado de MARQUES, 2003).

A pesquisa de desenvolvimento e o estudo para caracterização dos materiais a serem depositados, geralmente envolvem o espalhamento do material do filme, seguido da sua compressão, com o auxílio de uma barra de teflon ou polipropileno deslizante sobre a

superfície do meio aquoso no tanque de deposição. Durante esta compressão há o monitoramento da variação de área média ocupada pelas moléculas com a variação da pressão superficial. (MANSUR et al., 2007b)

Através da imersão e retirada do suporte sólido na interface ar-líquido, é feita a transferência de uma monocamada do filme de Langmuir. A estrutura do filme resultante pode variar dependendo dos parâmetros de deposição e das características do suporte sólido e é denominada filme Langmuir-Blodgett (LB). Outras camadas podem ser sobrepostas a primeira quando da passagem do suporte sólido na interface água-ar. Desta forma um filme LB multicamada pode ser formado com espessura dependente do comprimento da cadeia molecular e do número de vezes que o suporte sólido cruzar a interface (MARTIN e SZABLEWSKI, 2001).

O processo acima descrito pode ser realizado em suportes sólidos hidrofílicos ou hidrofóbicos. A Figura 3.24 ilustra a primeira deposição para o suporte sólido hidrofílico.

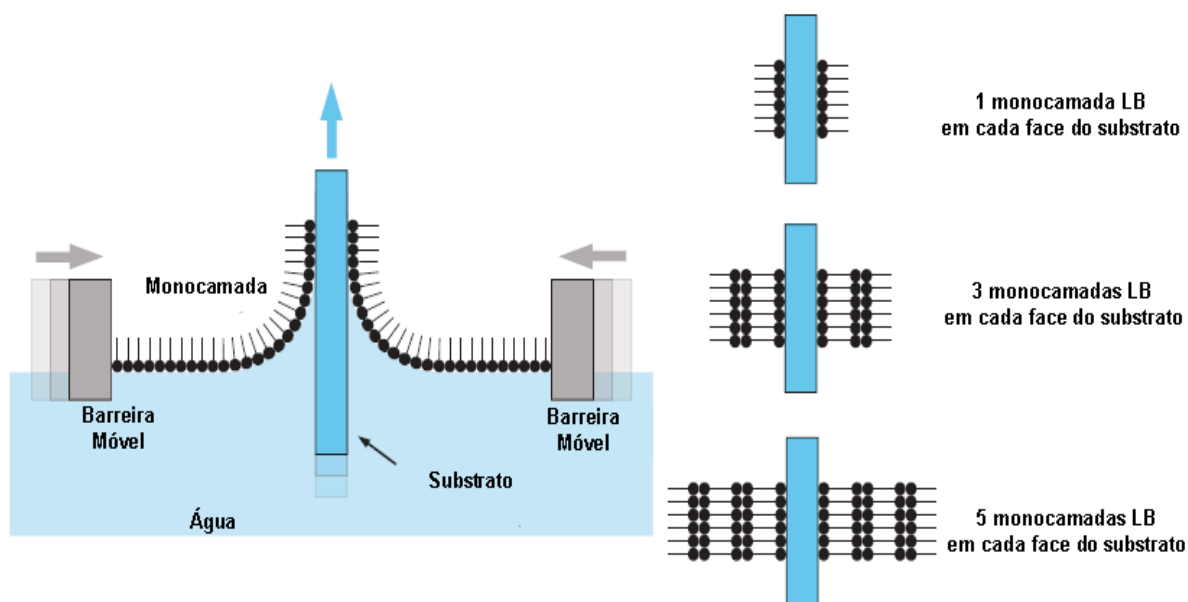


Figura 3.24 - Deposição de monocadas em suporte sólidos hidrofílicos (Adaptado de: MARTIN. e SZABLEWSKY, 2001).

F - Funcionalização de Superfícies pelo Uso de Monocamadas Automontadas (Self Assembly Monolayers – SAM)

Monocamadas automontadas são matrizes organizadas de substâncias anfífilas, onde uma das extremidades da molécula tem especial afinidade pelo suporte sólido. Estas matrizes possuem grande estabilidade, uniformidade de estrutura superficial e relativa facilidade de variação de suas funcionalidades (ARYA et al., 2008).

RATNER e colaboradores (2004) relatam que dois processos são particularmente importantes na formação de SAMs:

- uma forte adsorção química do grupo de ancoramento e o suporte sólido, que será responsável pelo preenchimento da superfície do suporte sólido;
- a existência de forças de van der Waals nas cadeias alquila que podem levar a sua cristalização

GRIESHABER e colaboradores (2008) relatam o uso de SAMs para imobilização do elemento de biorreconhecimento em Au e outras superfícies metálicas. As moléculas usadas para estes filmes se compõem normalmente de tióis, com funcionalizações para imobilização do elemento de biorreconhecimento.

3.2.3.2. Uso de Agentes de Imobilização Covalente

O uso de agentes com grupos funcionais que proporcionem um elo entre o elemento de biorreconhecimento com a superfície do suporte sólido, sendo portanto agentes de imobilização covalentes, tem disponível um grande leque de possibilidade. Estes agentes podem ser classificados de diversas maneiras. Uma possível classificação está ligada ao número dos grupos funcionais existentes, bem como na existência, ou não, de grupos funcionais **diferentes** em um mesmo agente. Dentro desta classificação temos os agentes homobifuncionais (dois grupos funcionais idênticos) no qual a molécula do glutaraldeído, ver Figura 3.25, pode ser enquadrada (HERMANSON, 2008).

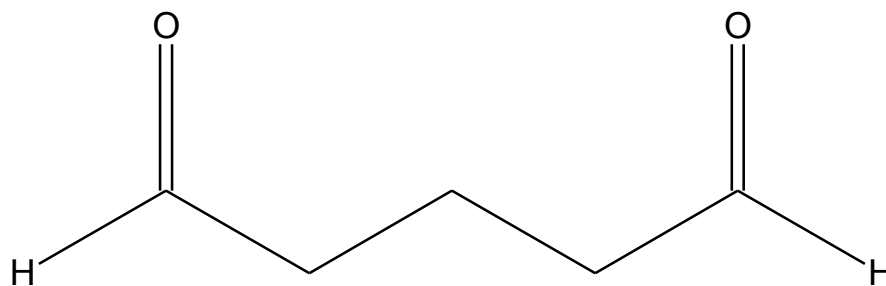


Figura 3.25 – Representação esquemática da estrutura do glutaraldeído (Adaptado de HERMANSON, 2008).

O uso do glutaraldeído para imobilização de enzimas em suportes contendo aminas é uma das mais frequentes técnicas de imobilização. Espera-se que a reação dos aldeídos com as aminas proceda através da formação de bases Schiff, também denominadas iminas, conforme pode ser visto na Figura 3.26 (SASSOLAS et al., 2012).

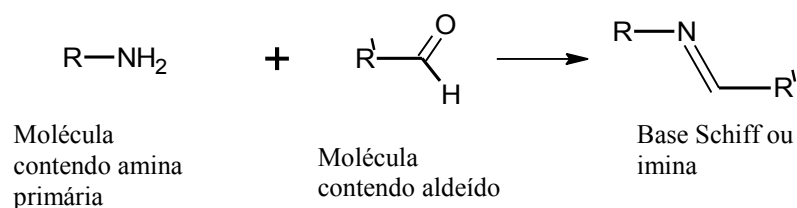


Figura 3.26 – Esquema de reação do aldeído com amina primária (Adaptado de HERMANSON, 2008).

O uso de glutaraldeído para imobilização de moléculas com grande quantidade de aminoácidos lisina em sua superfície se torna bastante atrativo, um bom exemplo é a enzima GOx que possui 30 aminoácidos lisina na sua superfície (MOSSAVARALI et al., 2006).

Na interação do glutaraldeído com grupos tióis espera-se que a reação dos aldeídos com as tióis proceda através da formação de hemitioacetal e posteriormente tioacetal, como pode ser visto na Figura 3.27 (DEWICK, 2006).

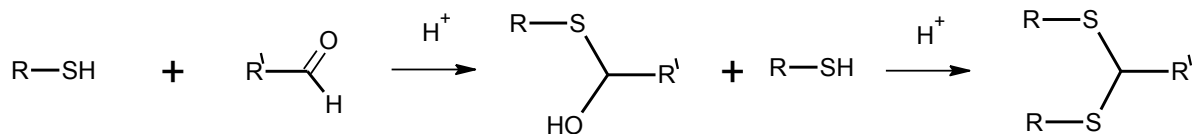


Figura 3.27 – Esquema de reação do aldeído com tiol (Adaptado de DEWICK, 2006).

Na interação do glutaraldeído com grupos hidroxilas espera-se que a reação dos aldeídos com as hidroxilas proceda através da formação de hemiacetal e posteriormente acetal, como pode ser visto na Figura 3.28 (SOLOMONS e FRYHLE, 2002).

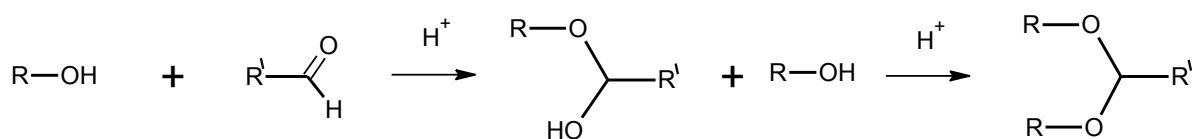


Figura 3.28 – Esquema de reação do aldeído com hidroxila (Adaptado de SOLOMONS e FRYHLE, 2002).

3.2.3.3. Ligação Biotina - Avidina

A avidina é uma proteína tetramérica, composta de 512 aminoácidos. Ela possui quatro subunidades idênticas de 16kDa, cada subunidade tem a capacidade de se ligar a uma molécula de biotina (TEULON et al., 2011; IZRAILEV et al., 1997). A biotina é uma vitamina presente em pequenas quantidades em células vivas e crítica para alguns processos biológicos. Seu pequeno tamanho (244.3Da) faz com que ela possa ser conjugada com várias proteínas e outras moléculas sem alterar significativamente sua atividade. O processo de introdução da biotina em outras moléculas é denominado: biotinação (HERMANSON, 2008; CASS e LIGLER, 2005; IZRAILEV et al., 1997).

A Figura 3.29 apresenta a estrutura da biotina enquanto a Figura 3.30 apresenta a estrutura da avidina através do modelo de fitas.

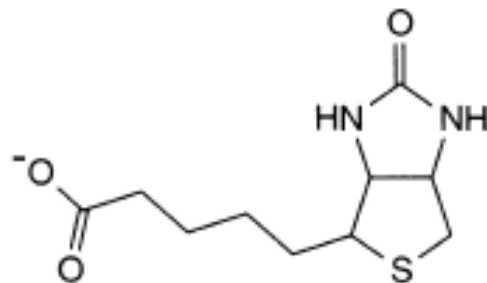


Figura 3.29 – Representação da estrutura da biotina (Fonte: HERMANSON, 2008).

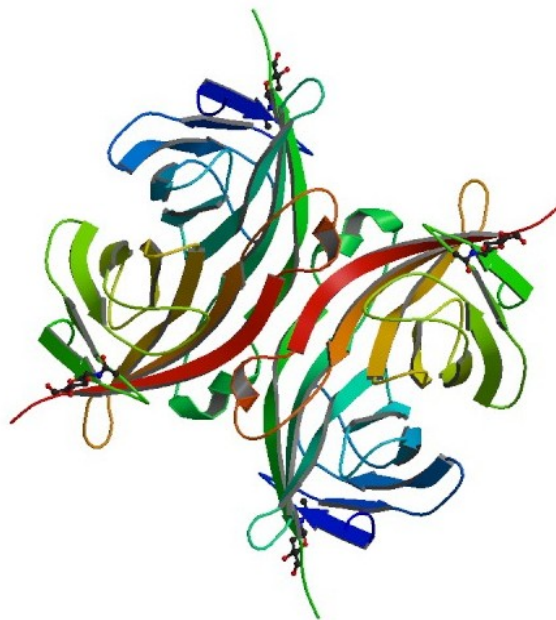


Figura 3.30– Representação da avidina e do complexo avidina/biotina através do modelo de fitas (Fonte: “Protein Data Bank” - 2AVI).

Há uma grande afinidade entre as moléculas da biotina e da avidina. Esta afinidade, com uma constante de dissociação de aproximadamente 10^{-15}M , pode ser usada para a imobilização dos elementos de biorreconhecimento (CASS e LIGLER, 2005).

3.2.3.4. Multi-imobilização

Estruturas tridimensionais (3D) formadas pela imobilização de diferentes biorreceptores criam uma nova perspectiva para a detecção. Podemos salientar as seguintes vantagens da coimobilização:

- a detecção concomitante de uma gama de analitos que dão a quantificação do resultado esperado de uma medição. O uso desta aplicação é especialmente importante na detecção

de íons de metais pesados através da utilização de diferentes enzimas, com diferentes sensibilidades a íons específicos, resultando na medição da toxicidade total de uma amostra. (SOLDATKIN et al., 2012)

- simplificação de etapas em processos que exijam múltiplas etapas com consequente redução de tempo e custos (TABOADA-PUIG, 2011);
- para o caso de coimobilização de enzimas pode haver um aumento de sensibilidade do biossensor (CHEN et al., 2011);
- a possibilidade de uso de biossensores com transdução eletroquímica com o uso de mediadores em implantes. Neste caso a possibilidade de uso de transdução eletroquímica para implantes se torna possível, com a coimobilização do mediador concomitantemente com a do biorreceptor (CHAUBEY e MALHOTRA, 2002);
- minimização de distâncias entre sítios catalíticos de reações em cascata, minimizando efeitos de difusão e diminuindo efeitos sobre compostos intermediários instáveis mimetizando os canais metabólicos existentes nas células (SCHOFFELEN e HEST, 2012)

A multi-imobilização de biorreceptores em suportes sólidos pode ocorrer:

- pela immobilização de diferentes biorreceptores em áreas específicas do suporte, através de qualquer estratégia de immobilização: covalente, adsorção, armadilhamento ou afinidade (LOGAN e CLARK, 2007);
- pelo armadilhamento concomitante de diferentes biorreceptores no suporte (SCHOFFELEN e HEST, 2012);
- através da criação de camadas de diferentes biorreceptores, criando estruturas tridimensionais controladas, normalmente através da utilização da técnica L-b-L (SOLDATKIN et al., 2012; MANSUR et al., 2011).

A utilização da deposição L-b-L pode oferecer vantagens adicionais na mimetização dos canais metabólicos, já que pode permitir um maior controle da orientação da immobilização e “consumo” de sítios do biorreceptor através das reações envolvidas na immobilização (ARIGA e HILL, 2008).

3.2.3.5. Alguns Materiais Usados para a Imobilização

A - Polímeros Condutores

ARYA e colaboradores (2008) relatam que polímeros condutores têm sido amplamente utilizados na fabricação de biossensores devido à sua natureza condutora, fácil manuseio e biocompatibilidade. Alguns exemplos destes polímeros são o Polipirrol (PPy) e a Polianilina (PANI).

LISDAT e SCHÄFER (2008) relatam a vantagem do uso de polímeros condutores devido à grande dependência da condutividade por mudanças conformacionais, induzidas por eventos de reconhecimento e fixação (“binding events”).

Como possíveis dificuldades, MORRIN e colaboradores (2008) relatam que condições ácidas, necessárias para a condução destes polímeros, podem inviabilizar/dificultar o aprisionamento de alguns elementos de biorreconhecimento, tais como proteínas.

GUIMARD e colaboradores (2007) apresentam algumas estratégias para a imobilização de biomoléculas em polímeros condutores.

B - Nanomateriais

As propriedades elétricas destes materiais têm chamado a atenção dos pesquisadores como alternativa de agentes imobilizadores que podem melhorar o desempenho de biossensores (JIANRONG et al., 2004).

Duas interessantes fontes para leitura são SAHOO e colaboradores (2007) e ARYA e colaboradores (2008). Ambas relatam várias aplicações de nanopartículas. Nestes trabalhos é possível observar a aplicação de nanotubos de carbono em biossensores de colesterol, onde vários resultados positivos foram listados tais como melhora no tempo de resposta, especificidade e estabilidade.

3.2.4. Métodos de Caracterização

3.2.4.1. Ângulo de Contato

Considerando-se uma gota de um líquido em uma superfície sólida, o ângulo formado entre o plano tangente a esta gota e o plano contendo a superfície é denominado ângulo de contato, conforme Figura 3.31. A medida deste ângulo nos proporciona uma forma de caracterizar as propriedades da superfície de suportes sólidos. A equação de Young, mostrada na equação 3.10, é usada para descrever o ângulo de contato entre um líquido, seu vapor e superfícies homogêneas e isotrópicas. (ALLAIN et al. 1984)

$$\gamma_{SV} - \gamma_{SL} = \gamma_{LV} \cos \theta \quad (\text{Equação } 3.10)$$

Sendo: γ_{SV} Energia livre de interface sólido vapor;

γ_{SL} Energia livre de interface sólido líquido;

γ_{LV} Energia livre de interface líquido vapor;

θ Ângulo de contato.

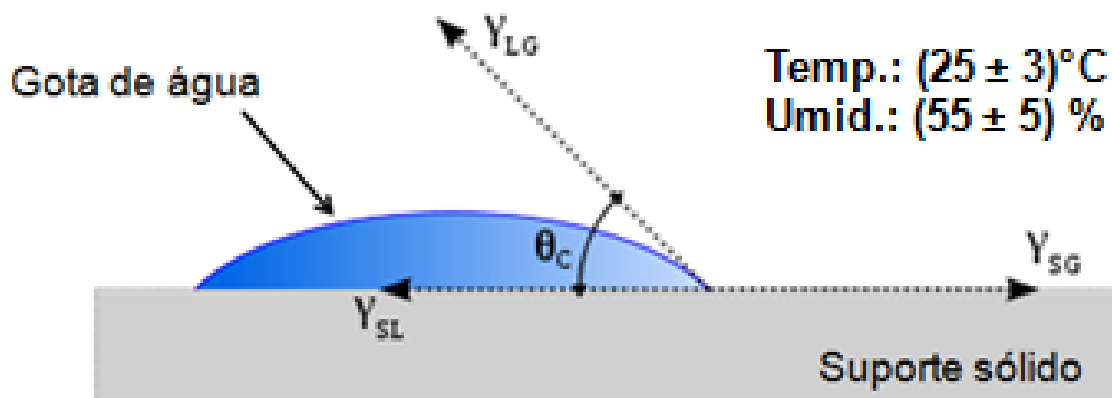


Figura 3.31 – Medida do ângulo de contato indicando diagrama de equilíbrio (Adaptado de BRUTIN et al., 2009).

O ângulo de contato nos proporciona uma medida da energia de superfície do sólido, elevados valores de ângulo de contato indicam um sólido com baixos valores de energia de superfície indicando uma superfície hidrofóbica. Valores extremamente altos de ângulo de contato são características de superfícies extremamente hidrofóbicas, denominadas “Superfície de Efeito Lotus” (LI et al., 2004).

3.2.4.2. Espectroscopia de Energia Dispersiva (EDS)

A espectroscopia de energia dispersiva fornece informações químicas em áreas da ordem de grandeza de micrômetros. Em síntese, a amostra é bombardeada com um feixe de elétrons que remove elétrons de uma camada interna dos átomos de sua superfície (K, L, M e N). Estes átomos ficam numa condição excitada, permitindo que elétrons de camadas mais energéticas decaiam e ocorra a emissão de raios X, com energias definidas e específicas para os elementos (GOLDSTEIN et al. 2002).

Os raios X emitidos pela amostra são detectados através de um sensor semicondutor e um analisador multicanal que converte a energia dos raios X em uma contagem eletrônica. O valor acumulado desta contagem resulta num espectro que representa a análise química da amostra (ORÉFICE et al. 2006).

3.2.4.3. Espectroscopia de Ultravioleta-Visível (UV-Vis)

A espectroscopia de ultravioleta-visível envolve a absorção de radiação eletromagnética por átomos e moléculas na faixa de comprimento de onda (λ) de 190 a 800nm, causando a transição eletrônica do estado fundamental para os estados excitados, principalmente envolvendo os elétrons dos orbitais mais externos (ORÉFICE et al. 2006).

A Figura 3.32 apresenta o diagrama representativo das transições eletrônicas decorrentes da interação da radiação na faixa do UV-Vis com as moléculas. Estas transições promovem a absorção de energia do fóton incidente. Quando a amostra é exposta a uma luz com energia que coincide com uma possível transição eletrônica temos a absorção de energia, com

consequente promoção do elétron para um orbital mais energético. As transições $\sigma \rightarrow \sigma^*$ requerem uma elevada energia e normalmente mostram em máximo em absorbância em 125nm, já as transições $n \rightarrow \sigma^*$ requerem menos energia que as anteriores e seu pico de absorbância está usualmente entre 150-250nm. Ambas são pouco usuais na espectroscopia UV-Vis típica. A maioria das absorções na região do UV-Vis acontece por transições $n \rightarrow \pi^*$ e $\pi \rightarrow \pi^*$, porém como as transições $\pi \rightarrow \pi^*$ apresentam maiores absorvidades molares, estas são as mais importantes para esta técnica (SHEFFIELD HALLAM UNIVERSITY, 2012).

A medida da absorção da energia em função do comprimento de onda da luz incidente é o produto da espectroscopia UV-Vis, como pode ser visto esquematicamente através da Figura 3.33, sendo que a absorção pode ser medida pela sua transmitância ou absorbância (MILLER e TAMMER, 2008).

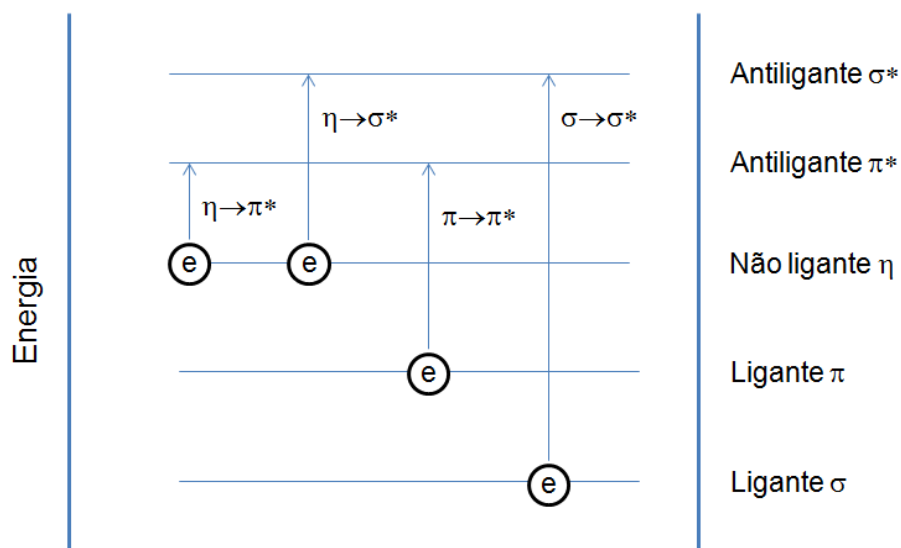


Figura 3.32 – Diagrama de energia de orbitais moleculares com as diversas transições eletrônicas (Fonte: ORÉFICE et al, 2006)

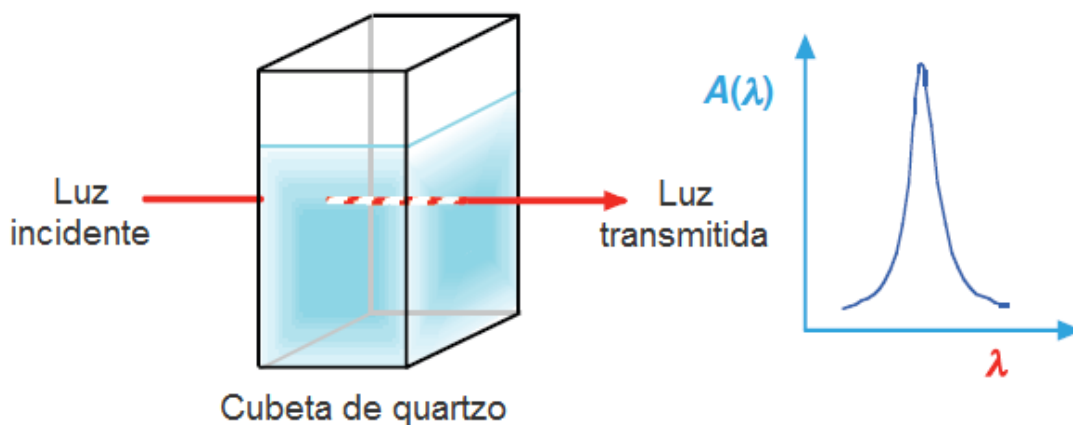


Figura 3.33 – Representação esquemática da espectroscopia UV-Vis (Fonte: MILLER e TANNER, 2008)

A espectroscopia de ultravioleta-visível permite a quantificação da concentração do analito através da equação da lei de Beer-Lambert descrita na Equação 3.11. A maior efetividade da técnica consiste em utilizar comprimentos de onda onde a absorvidade molar seja maximizada proporcionando, assim, uma maior sensibilidade da medição (ROCHA e TEIXEIRA, 2004).

$$A = \varepsilon \cdot c \cdot b \quad (\text{Equação 3.11})$$

Onde:

- A – absorbância em um comprimento de onda definido;
- ε – absorvidade molar, também chamado de coeficiente de extinção que depende da seção transversal de captura da espécie e da probabilidade de ocorrência da transição eletrônica relacionada à absorção da radiação;
- c – concentração do analito;
- b – caminho ótico.

Uma aplicação para esta técnica é a monitoração da oxidação da TMB, catalisada pela ação da HRP em presença de H_2O_2 . A TMB oxidada tem seu pico de absorbância no comprimento de onda de 650nm (BALLY e GRIBNAU, 1989).

3.2.4.4. Espectroscopia de Infravermelho

A espectroscopia de infravermelho envolve a absorção de radiação eletromagnética por átomos e moléculas na faixa de comprimento de onda (λ) de 0,78 a 1000 μm , sendo esta faixa dividida em infravermelho próximo, médio e distante sob o ponto de vista da aplicação e instrumentação, como pode ser visto na Tabela III.3, sendo a faixa de 2,5 até 15 μm a mais utilizada (ORÉFICE et al., 2006).

Tabela III.3 – Regiões do espectro de infravermelho (Fonte: ORÉFICE et al., 2006)

Região do infravermelho	Comprimento de onda (μm)	Número de onda (cm^{-1})
Próximo	0,78 – 2,5	12800- 4000
Médio	2,5 - 50	4000-200
Distante	50 - 1000	200-10

Na aplicação da espectroscopia de infravermelho a absorção da energia pelas moléculas devem causar modificações nos vibrações das moléculas, e estas devem proporcionar mudança no momento de dipolo da mesma. Há dois grupos de vibrações moleculares: os de estiramento e os de deformação, resultando em seis tipos de vibração, conforme Figura 3.34. Uma molécula formada por “n” átomos possui, no espaço tridimensional, um número de vibrações fundamentais dadas pelas equações 3.12 (para moléculas não lineares) e 3.13 para moléculas lineares (UNIVERSITY OF COLORADO, 2012).

$$VF = 3n - 6 \quad (\text{Equação 3.12})$$

$$VF = 3n - 5 \quad (\text{Equação 3.13})$$

Sendo:

VF = número de vibrações fundamentais;

n = número de átomos constituintes da molécula;

Caso a radiação incidente possua frequência coincidente com a frequência vibracional da molécula teremos a absorção desta energia, causando a alteração na amplitude da vibração molecular e conseqüente mudança no momento de dipolo da molécula. Sendo assim, é possível associar a faixas de comprimento de onda com grupos químicos ativos (MICHIGAN STATE UNIVERSITY, 2012).

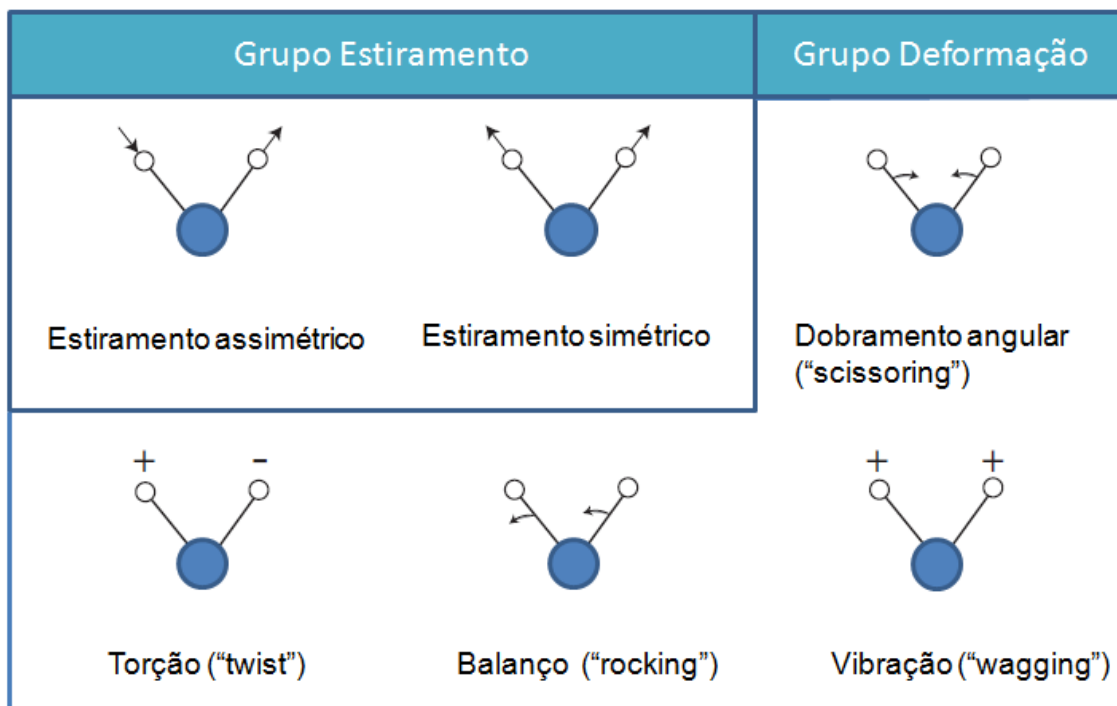


Figura 3.34 – Representação esquemática dos modos de vibração moleculares (Adaptado de: UNIVERSITY OF COLORADO, 2012)

Uma variação da técnica de infravermelho e a técnica de espectroscopia infravermelho por transformada de Fourier (FTIR), na qual os avanços em semicondutores e a evolução de poderosas ferramentas de análise de dados proporcionaram uma "design" mais simples para o equipamento, com respostas mais rápidas (ORÉFICE et al., 2006).

A Tabela III.4 apresenta exemplos das regiões de absorção de infravermelho para grupos vibracionais importantes para os sistemas construídos neste trabalho.

Tabela III.4 – Regiões de absorção de IR para diferentes grupos vibracionais

Grupo vibracional	Região de absorção (cm ⁻¹)	Referência
C=N	1634	COSTA-JR et al., 2009
NH ₂	1650-2550	COSTA-JR et al., 2009
C=O	1720	MANSUR et al, 2008
SH	2550	ANDRADE et al, 2006
CH	3000-2850	COSTA-JR et al., 2009
NH	3500-3200	COSTA-JR et al., 2009
OH	3700-3000	MICHIGAN STATE UNIVERSITY, 2012

4. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

O procedimento experimental pode ser visto de forma macro através do fluxograma da Figura 4.1, onde o trabalho foi dividido em 4 etapas.

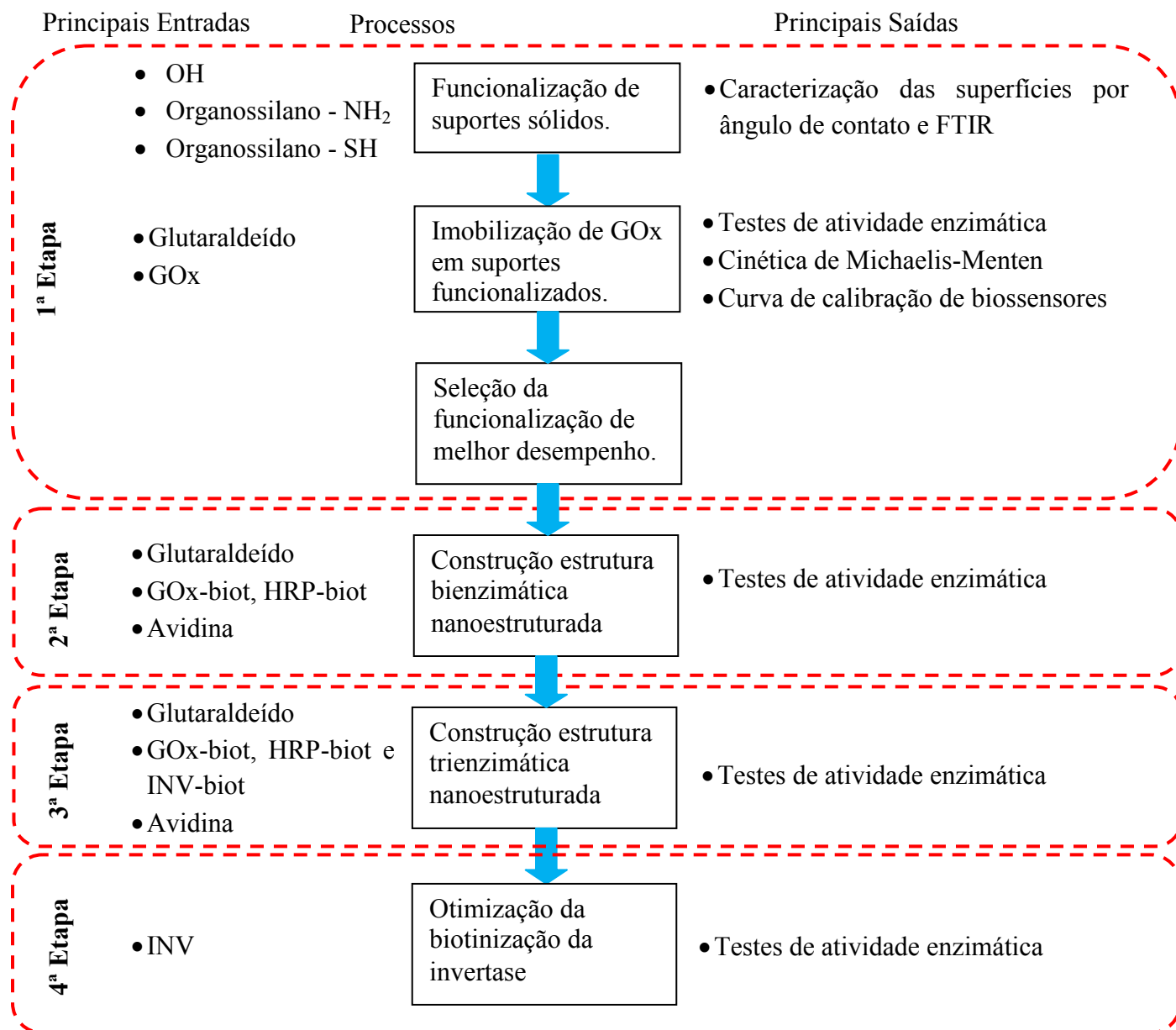


Figura 4.1 – Representação das etapas fundamentais abordadas neste trabalho.

4.1. Materiais

Ácido clorídrico – HCl (96%) e peróxido de hidrogênio – H₂O₂ (33%) foram adquiridos da VETEC Brasil. Hidróxido de amônio NH₄OH (30%), ácido nítrico HNO₃ (66%), metanol-CH₃OH (99,8%) e etanol - CH₃CH₂OH (95%) foram adquiridos da Synth Brasil. Mercaptopropiltrimetoxissilano - [SH(CH₂)₃]Si(OCH₃)₃ - MPTMS (95%), aminopropiltrimetoxissilano - [NH₂(CH₂)₃]Si(OCH₃)₃ APTMS (97%), glucose oxidase (GOx) extraída do *Aspergillus niger* (60%), glucose anidra (99,5%), avidina (≥98%), invertase proveniente de leveduras de pão (349,7 U.mg⁻¹), citrato de sódio tribásico desidratado- C₆H₅Na₃O₇.2H₂O, ácido cítrico - C₆H₈O₇ (≥99,5%), peroxidase (HRP, 250-330U/mg), 3,3', 5,5' tetrametilbenzidina (TMB), NHS-biotina (≥98% HPLC), dimetilsulfóxido (DMSO), fosfato de sódio dibásico - Na₂HPO₄ (≥99%), fosfato de potássio monobásico- KH₂PO₄ (≥99%), cloreto de sódio - NaCl (≥99,5%), cloreto de potássio - KCl (≥99%), molaurato de polioxitilenosorbitan (Tween 20), albumina bovina - BSA (≥96) e glutaraldeído (25%) foram adquiridos da Sigma-Aldrich USA. Frutose foi adquirida da Gold Nutrition, Brasil.

Suportes sólidos utilizados para imobilização foram: lâminas de vidro comum para microscopia adquiridas da Labtec, placas de titulação (microplacas) de poliestireno sem funcionalização e placas de titulação (microplacas) com funcionalização amina adquiridas da Corning Incorporated. Filtros de ultracentrífuga com membranas de celulose com ponto de corte de 30000 Mw foram adquiridos da Millipore (AMICON FILTER). As cubetas de quartzo utilizadas possuíam caminho ótico de 10mm e corte em 180nm.

4.2. Caracterização do Suporte Vítreo via EDS

Placas de vidro comum foram escolhidas como suporte sólido pela sua atratividade como modelo para experimentos. Elas são de fácil obtenção, baixo custo, termicamente e dimensionalmente estáveis e apresentam composição química homogênea. Adicionalmente, a modificação da sua superfície por agentes modificadores silanos é facilitada (GUO et al., 1994, GOODWIN et al., 1990).

Amostras representativas dos suportes sólidos foram submetidos à análise química elementar através de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), acoplada com microsonda para Espectroscopia de Energia de Raios-X Característicos (EDS – “Electrons Dispersive Spectrometry”), utilizando-se o equipamento JSM 6360LV- Jeol/ThermoNoran. Análises de EDS foram realizadas em três amostras de suportes vítreos para efeito de caracterização. As medidas foram realizadas em três pontos distintos em cada amostra.

4.3. Funcionalização da Superfície dos Suportes Vítreos

4.3.1. Método de Funcionalização da Superfície dos Suportes Vítreos

A Tabela IV.1 descreve as etapas realizadas para a funcionalização de superfícies de suportes vítreos utilizadas neste experimento.

Tabela IV.1 – Matriz de experimentos para funcionalização de superfícies de suporte vítreos

Etapas do experimento	Experimentos		
	Imob. GOx em lâminas de vidro (Func. hidroxila) GOx_imob_hidroxila	Imob. GOx em lâminas de vidro (Func. amina) GOx_imob_amina	Imob. GOx em lâminas de vidro (Func. tiol) GOx_imob_tiol
Limpeza HNO ₃	✓	✓	✓
Hidrofilização	✓	✓	✓
Funcionalização APTMS		✓	
Funcionalização MPTMS			✓

A - Limpeza:

As amostras foram limpas através da imersão em uma solução de 20% v/v de HNO_3 em água deionizada, na temperatura $(25 \pm 3)^\circ\text{C}$ por 24h. Após a limpeza, as amostras foram lavadas (10x) e imersas em água DI. Posteriormente estas amostras foram secas em estufa a $(55 \pm 5)^\circ\text{C}$ por 2 horas.

B- Hidrofilização

Após a secagem, as amostras foram mergulhadas em solução 30% v/v de peróxido de hidrogênio em água DI por 45 minutos a $(75 \pm 5)^\circ\text{C}$. Após o tempo determinado, foi adicionado 5mL de NH_4OH (30%) para cada 100 mL da solução $\text{H}_2\text{O}/\text{H}_2\text{O}_2$ através de gotejamento. Após 45 minutos, as amostras foram retiradas e aspergidas com água deionizada. Em seguida, as amostras foram mergulhadas em metanol.

C – Funcionalização com Agentes Silanos

A partir de solução de 25% água DI: 75% metanol, foram preparadas soluções de 2% v/v de MPTMS ou APTMS com pH ajustado para 4,5 usando-se ácido acético. As amostras foram mergulhadas na solução com o agente silano com agitação leve por 30 minutos, após 5 minutos de hidrólise da solução. O fluxograma do processo de modificação por agentes silanos pode ser visto na Figura 4.2.

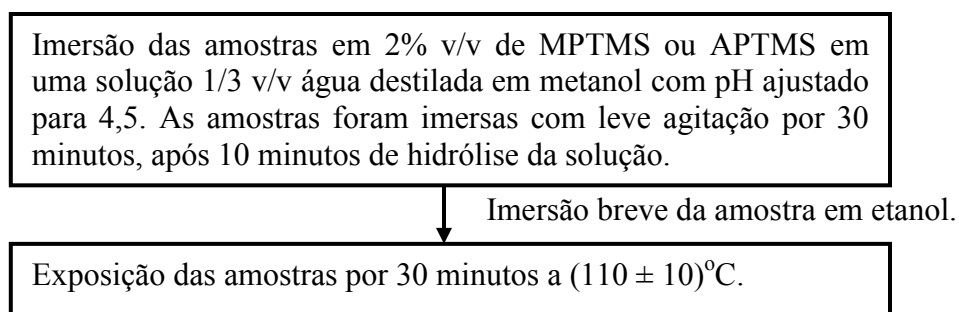


Figura 4.2 – Fluxograma simplificado do processo utilizado para a aplicação do agente silano, sem o detalhamento das etapas de limpeza e hidrofilização.

4.3.2. Caracterização das Superfícies - Medidas de Ângulo de Contato

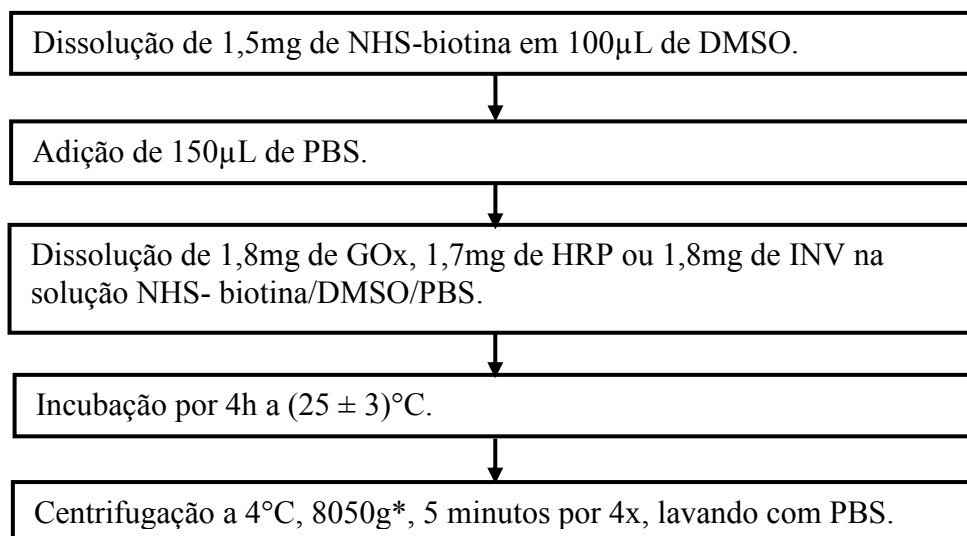
A avaliação da tensão superficial, de forma a caracterizar as superfícies, foi realizada através da medição do ângulo de contato entre a superfície das amostras e a gota de água deionizada. Para a medição do ângulo foi empregado o programa de tratamento de imagens SPOT™ (Ver. 3.2, Diagnostic Instruments Inc), a partir da foto digital da gota (volume = 50µL) depositada sobre a superfície da amostra com uma microseringa. Todas as imagens foram realizadas dentro do tempo máximo de 1 minuto após a aplicação da microgota, usando uma câmera digital SONY DSC-W70. As medições foram conduzidas em condições monitoradas de umidade relativa (55 ± 5)% e temperatura ambiente (25 ± 3)°C. Foram utilizados como resultados a média e o desvio padrão de seis tratamentos independentes (n=6).

4.3.3. Caracterização das Superfícies – Infravermelho

A técnica de infravermelho com transformada de Fourier foi empregada para caracterizar os grupos químicos orgânicos na superfície dos suportes funcionalizados. Foi utilizada a técnica por transmissão no equipamento Nicolet 6700 (Thermo Electron Corporation) na faixa entre 4000 e 2400 cm^{-1} . Esta faixa foi escolhida porque ela contém os picos mais importantes de estiramento -CH e grupos funcionais sem haver sobreposição com picos característicos do vidro. Cada espectro foi realizado com uma resolução de 2 cm^{-1} com um total de 32 varreduras.

4.4. Biotinização das Enzimas

A Figura 4.3 apresenta o fluxo do processo de biotinação aplicado. A solução de PBS foi preparada com 10 mmol.L^{-1} de Na_2HPO_4 , 2 mmol.L^{-1} de KH_2PO_4 , 138 mmol.L^{-1} de NaCl e 3 mmol.L^{-1} de KCl em água DI. As enzimas biotinizadas foram armazenadas a (-16 ± 2)°C.



*g – aceleração da gravidade

Figura 4.3 – Fluxograma do processo utilizado para a biotinylation das enzimas GOx, INV e HRP utilizando-se de tampão PBS.

4.5. Imobilização de Monocamadas de Enzimas

4.5.1. Imobilização da GOx em Suportes Sólidos Vítreos

4.5.1.1. Imobilização Covalente

A Figura 4.4 apresenta o fluxograma do procedimento de imobilização da enzima GOx.

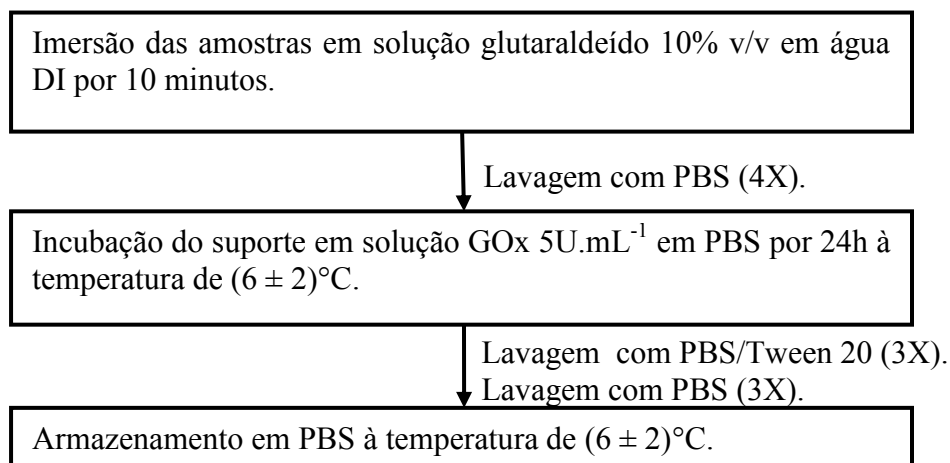


Figura 4.4 – Fluxograma do processo utilizado para a imobilização da GOx em suportes sólidos modificados por agentes silanos.

A solução de glutaraldeído foi preparada e agitada por 20 minutos antes da sua aplicação, sem a formação de vortex. As amostras foram mergulhadas na solução por 10 minutos à temperatura $(25 \pm 3)^\circ\text{C}$.

Para a aplicação de glutaraldeído nas amostras modificadas com APTMS nenhuma correção de pH foi realizada. Para a aplicação de glutaraldeído em suportes sólidos hidrofílicos ou modificados com MPTMS o pH foi ajustado para $(3,0 \pm 0,1)$ com o uso de solução $0,1 \text{ mol.L}^{-1}$ de HCl em água DI. Após imobilização da GOx as amostras foram armazenadas em PBS (pH = 7,4) por no mínimo 30 minutos.

A Figura 4.5 contém a representação esquemática das estratégias de imobilização covalente escolhidas.

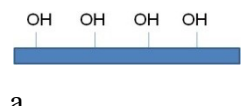
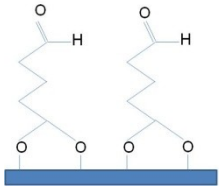
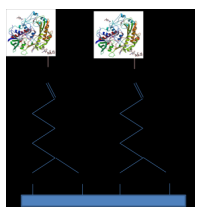
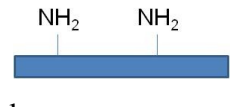
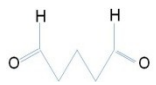
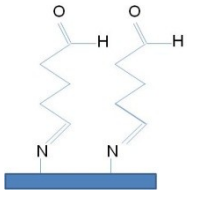

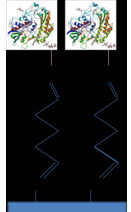
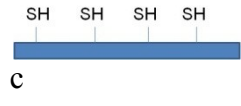
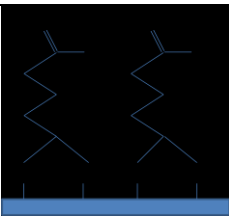
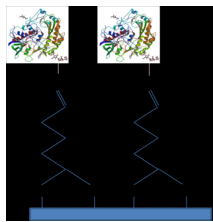
Suporte funcionalizado	Glutaraldeído	Ligação do glutaraldeído no suporte funcionalizado	Glucose oxidase (GOx)	Estrutura final proposta da GOx imobilizada
 <p>a</p>				
 <p>b</p>				
 <p>c</p>				

Figura 4.5 – Representação esquemática da imobilização da enzima glucose oxidase através do uso de agente de imobilização covalente (glutaraldeído) em suportes com funcionalização: hidroxila (a), funcionalização amina (b) e funcionalização tiol (c) (Modelo da GOx por fitas - fonte: “Protein Data Bank – 1GAL”).

4.5.1.2. Imobilização por Adsorção

Amostras provenientes da etapa de limpeza por HNO_3 foram imersas numa solução de 5U.mL^{-1} de GOx em PBS e submetidas por 24h à temperatura de $(6 \pm 2)^\circ\text{C}$. Após o término deste período as amostras foram lavadas e armazenadas em PBS ($\text{pH} = 7,4$) por no mínimo 30 minutos.

4.5.2. Procedimento de Imobilização de Monocamadas de Enzimas em Microplacas

4.5.2.1. Imobilização de Monocamadas em Microplacas com Funcionalização Amina

O fluxograma do procedimento de imobilização de uma monocamada de enzima em microplacas com funcionalização amina pode ser visto na Figura 4.6.

Uma solução 10% de glutaraldeído em água DI foi preparada tal como descrito no item 4.5.1.1. Em cada cavidade da microplaca a ser empregada, $100\mu\text{L}$ da solução foram aplicados por 10 minutos. Após o término deste período a solução de glutaraldeído foi removida e as amostras foram lavadas em duas etapas: uma utilizando uma solução de 0,05% de Tween 20 em PBS e outra utilizando apenas PBS.

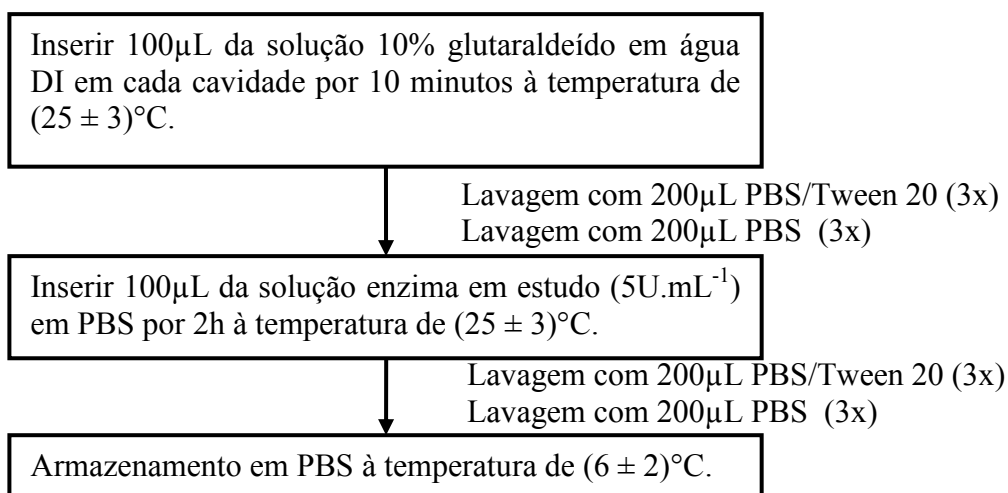


Figura 4.6 – Fluxograma do processo utilizado para a imobilização de monocamadas de enzimas em microplacas funcionalizadas.

Às amostras provenientes da aplicação do glutaraldeído foram aplicados 100 μ L da solução de 5U.mL⁻¹ em PBS da enzima em estudo em cada cavidade da placa por 2h à temperatura de (25 \pm 3) $^{\circ}$ C. Após o término deste período as amostras foram lavadas em duas etapas: uma utilizando uma solução de 0,05% v/v de Tween 20 em PBS e outra utilizando apenas PBS.

4.5.2.2. Imobilização de Monocamadas em Microplacas Não Funcionalizadas (Adsorção)

Para os ensaios de imobilização por adsorção, microplacas sem funcionalização foram empregadas. Nelas foram aplicados 100 μ L da solução de 5U.mL⁻¹ em PBS da enzima em estudo, em cada cavidade da placa, por 24h à temperatura de (6 \pm 2) $^{\circ}$ C. Após o término deste período as amostras foram lavadas em duas etapas consecutivas: uma utilizando uma solução de 0,05% v/v de Tween 20 em PBS e outra utilizando apenas PBS.

4.6. Procedimento de Imobilização de Estruturas Multienzimáticas em Microplacas

Nesta etapa foram estudadas duas estruturas bienzimáticas nanoestruturadas, mostradas na Figura 4.7, e duas estruturas trienzimáticas nanoestruturadas, mostradas na Figura 4.8.

O fluxograma do procedimento de imobilização adotado nas estruturas multienzimáticas pode ser visto na Figura 4.9. O número de enzimas imobilizadas limita o número de camadas, sendo neste estudo limitadas a estruturas bienzimáticas ou trienzimáticas. Todas as enzimas empregadas foram anteriormente submetidas ao processo de biotinação.

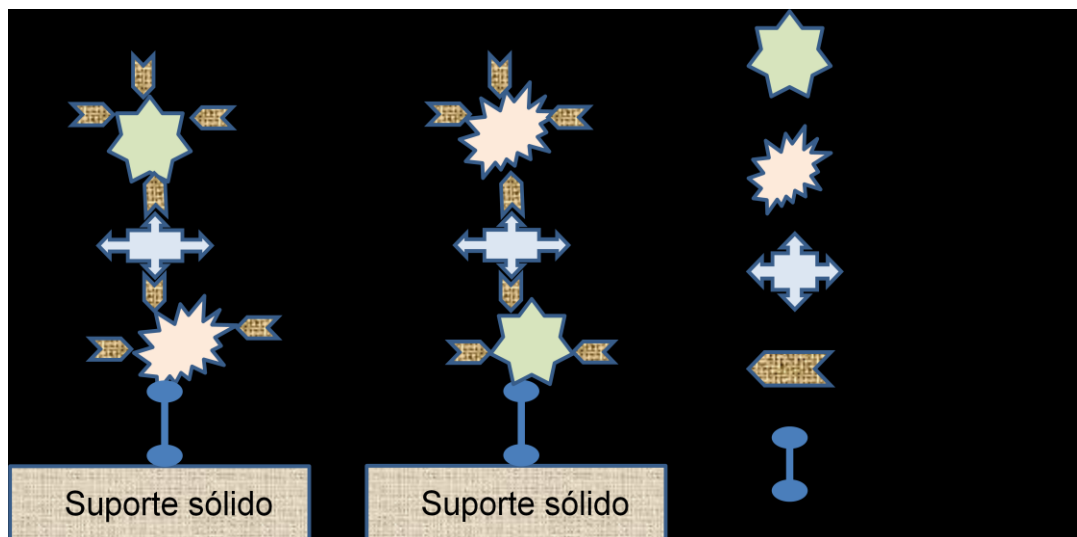


Figura 4.7 – Representação esquemática das estruturas bienzimáticas nanoestruturadas denominadas estruturas GOx-biot/HRP-biot e estrutura HRP-biot/GOx-biot.

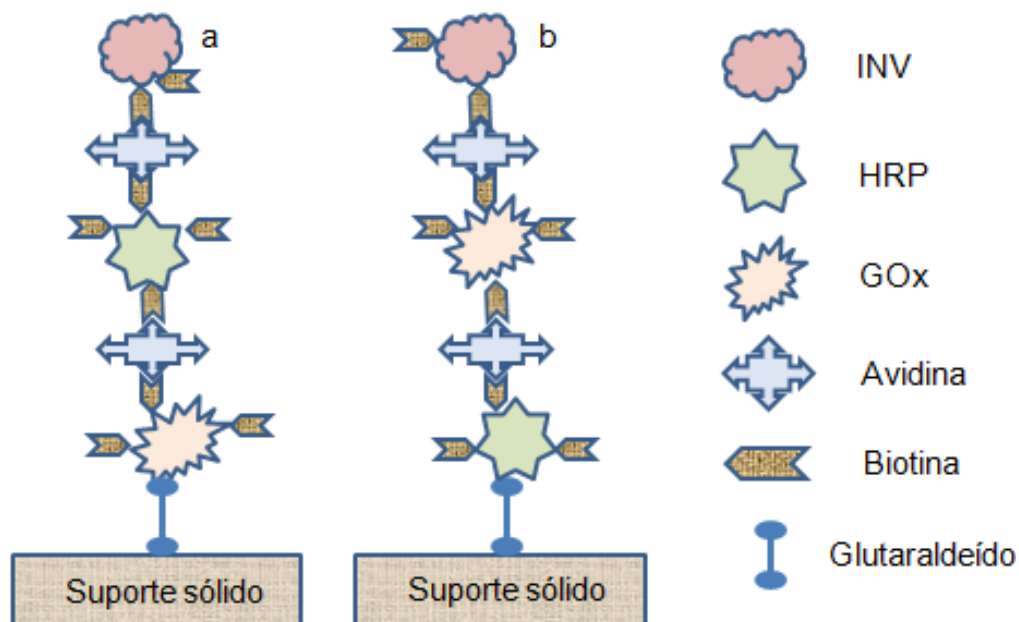


Figura 4.8 – Representação esquemática das estruturas trienzimáticas nanoestruturadas denominadas estruturas GOx-biot/HRP-biot/INV-biot e estrutura HRP-biot/GOx-biot/INV-biot.

O fluxograma do procedimento de imobilização adotado nas estruturas multienzimáticas pode ser visto na Figura 4.9. O número de enzimas imobilizadas limita o número de camadas, sendo neste estudo limitadas a estruturas bienzimáticas ou trienzimáticas. Todas as enzimas empregadas foram anteriormente submetidas ao processo de biotinizacão.

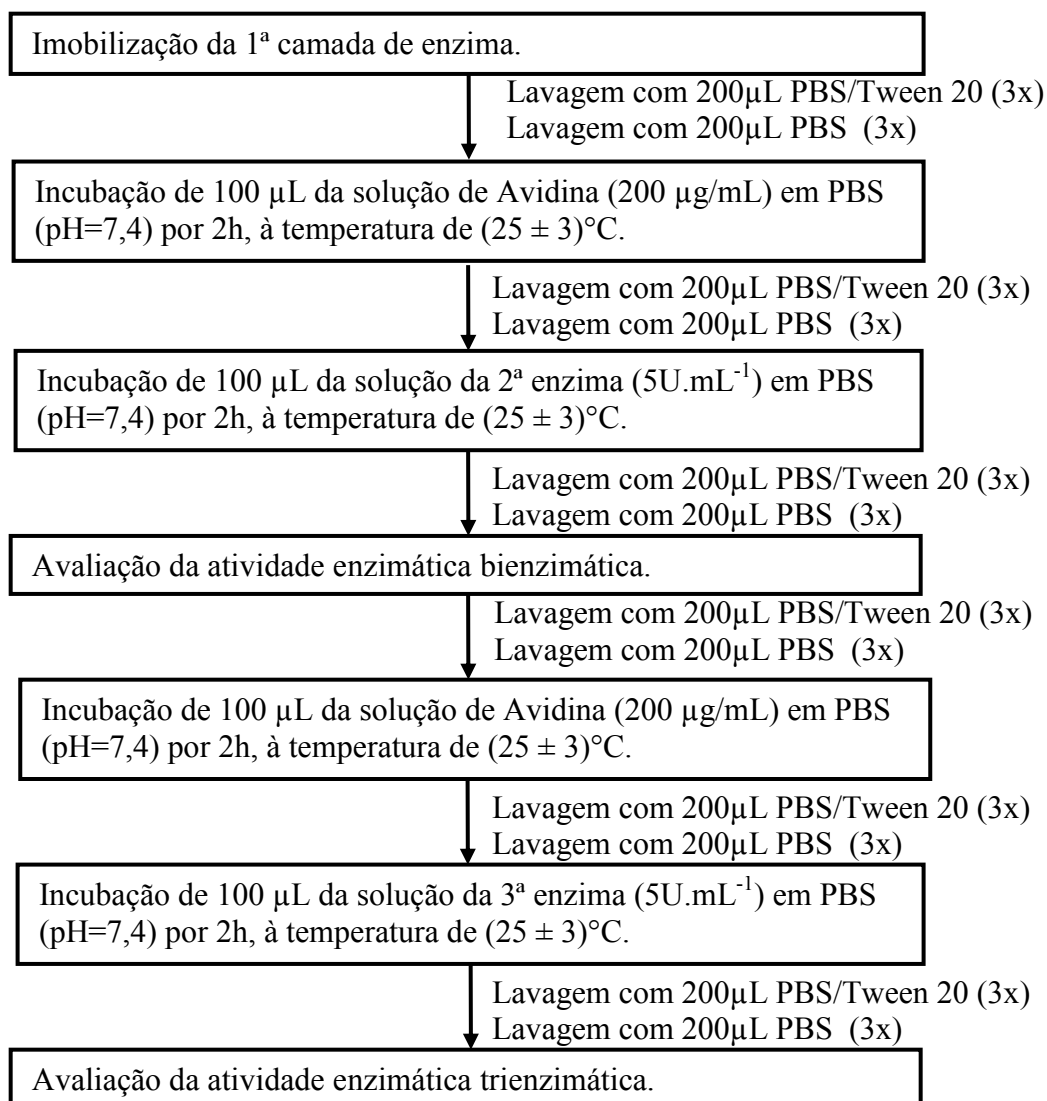


Figura 4.9 – Fluxograma da construção das estruturas multienzimáticas.

A – Imobilização da Primeira Camada de Enzimas

O mesmo procedimento adotado em 4.5.2.1 foi empregado.

B – Aplicação da Avidina

Após a aplicação da primeira e segunda camada de enzimas (neste último caso, apenas para estruturas trienzimáticas) 100µL de uma solução de 200µg.mL⁻¹ de avidina em PBS foi aplicada a cada cavidade. O tempo de reação foi de 2 horas para uma temperatura de (25 ±

3)°C. Após o término deste período as amostras foram lavadas em duas etapas, uma utilizando uma solução de 0,05% v/v de Tween 20 em PBS e outra utilizando apenas PBS.

C – Imobilização da Segunda e Terceira Camadas de Enzimas

Nas amostras provenientes da aplicação da avidina, 100µL de uma solução de 5U.mL⁻¹ em PBS da enzima em estudo (previamente submetida ao processo de biotinação), de acordo com a estrutura desejada, foi aplicada a cada cavidade da placa por 2 horas a temperatura de (25 ± 3)°C. Após o término deste período as amostras foram lavadas em duas etapas consecutivas, uma utilizando uma solução de 0,05% v/v de Tween 20 em PBS e outra utilizando apenas PBS.

4.7. Medidas de Atividade Enzimática

4.7.1. Medidas de Atividade Enzimática da GOx em Solução e Imobilizada em Suportes Vítreos utilizando Cubeta de Quartzo

A atividade enzimática foi monitorada através da espectroscopia na região do visível. Foi utilizado o espectrômetro Lambda EZ210, Perkim-Elmer, na faixa de comprimentos de onda de 500nm a 800nm e velocidade de 10nm.min⁻¹. Cubetas de quartzo de 10mm, com corte em 180nm, foram adotadas. Foi aplicada a correção do **“branco” em todas as situações**, ou seja, todos os valores obtidos de absorvância, não só nesta etapa, mas **em todas as etapas do trabalho**, seguem a equação geral:

$$\text{Abs} = \text{Abs}_{\text{amostra}} - \text{Abs}_{\text{branco}} \quad (\text{Equação 4.1})$$

Sendo:

- Abs Absorbância utilizada para análise;
- Abs_{amostra} Absorbância obtida quando do ensaio da enzima utilizando-se os reagentes necessários e o substrato;
- Abs_{branco} Absorbância obtida quando do ensaio da enzima utilizando-se apenas os reagentes necessários **sem** o substrato.

A absorvância no comprimento de onda de 650nm foi utilizada para os cálculos de medida da atividade enzimática, similar ao proposto por SONG e colaboradores (2010). O coeficiente de extinção utilizado foi de $3,9 \times 10^4$ (mmol.cm.L⁻¹)⁻¹ conforme RHEE e colaboradores (2010) e JOSEPHY e colaboradores (1982).

4.7.1.1. Medidas de Atividade Enzimática da GOx em Solução na Cubeta de Quartzo

As soluções iniciais: 50mmol.L⁻¹ de glucose , 250U.mL⁻¹ de HRP e 0,25 U.mL⁻¹ foram preparadas em PBS e a solução de 1mg.mL⁻¹ de TMB foi preparada em água DI. Junto a estas soluções foram adicionados água DI e PBS na cubeta. Os valores dos volumes das soluções foram calculados para que as concentrações finais de glucose atingissem os valores de 1mmol.L⁻¹, 2,5mmol.L⁻¹, 5mmol.L⁻¹, 10mmol.L⁻¹, 15mmol.L⁻¹ e 20mmol.L⁻¹ na cubeta.

As concentrações finais na cubeta para os demais reagentes foram: GOx: 0,01U.mL⁻¹, HRP:5U.mL⁻¹ e TMB: 0.1mg.mL⁻¹. O volume final na cubeta foi de 3mL.

4.7.1.2. Medidas de Atividade Enzimática em Suportes Sólidos Vítreos na Cubeta de Quartzo

A mesma estratégia utilizada em 4.7.1.1 foi empregada, apenas havendo a substituição da enzima em solução pelas amostras do suporte sólido preparadas com GOx (lâminas de vidro nas dimensões aproximadas de 9 x 22mm). Todas as leituras **foram corrigidas** de forma a compensar eventuais diferenças das áreas das lâminas.

Entre as varreduras realizadas, a cubeta foi retirada do aparelho e gentilmente agitada para que houvesse a homogeneização da solução com os produtos da reação. Curvas de absorvância foram monitoradas para cada concentração em duas amostras independentes.

As denominações dadas aos resultados dos experimentos podem ser vistas na Tabela IV.2

Tabela IV.2 – Denominações dadas aos experimentos realizados

Estudo realizado	Denominação empregada
Imob. GOx em lâminas de vidro - funcionalização hidroxila	GOx_imob_hidroxila
Imob. GOx em lâminas de vidro - funcionalização amina	GOx_imob_amina
Imob. GOx em lâminas de vidro - funcionalização tiol	GOx_imob_tiol
Imob. GOx em lâminas de vidro – não funcionalizada	GOx_imob_adsorção

4.7.2. Medidas de Atividade Enzimática em Microplacas

A atividade enzimática em microplacas foi também monitorada através da espectroscopia na região do visível. Foi utilizado o leitor de absorbância BIORAD iMark 168, selecionando-se o filtro de 655nm. O equipamento foi configurado para que antes de cada leitura fosse executada uma vibração por 10 segundos para que houvesse homogeneização das soluções.

4.7.2.1. Medidas de Atividade Enzimática de Enzimas em Solução

A – GOx e GOx-biot

Na monitoração da atividade de GOx/GOx-biot em solução, microplacas sem funcionalização foram empregadas. Primeiramente 150 μ L de uma solução de 1mg.mL⁻¹ de albumina de soro bovina (BSA) foi aplicada a cada cavidade por duas horas a uma temperatura de (25 \pm 3) $^{\circ}$ C. Após o término deste período as cavidades foram lavadas em duas etapas: uma utilizando uma solução de 0,05% v/v de tween20 em PBS e outra utilizando apenas PBS (3x para cada solução). Tal procedimento foi necessário para evitar que houvesse a adsorção da GOx na microplaca, levando a resultados não esperados.

Somente após a lavagem os experimentos contendo a enzima em estudo foram realizados. A concentração final das enzimas GOx e da GOx-biot nas cavidades foi de $0,01\text{U.mL}^{-1}$, Para isso, soluções iniciais de $0,25\text{U.mL}^{-1}$ da GOx e da GOx-biot em PBS e de 1mg.mL^{-1} de TMB em água DI foram preparadas .

As concentrações finais de glucose nas cavidades, usadas para os experimentos, foram de 1mmol.L^{-1} , $2,5\text{mmol.L}^{-1}$, 5mmol.L^{-1} , 10mmol.L^{-1} , 15mmol.L^{-1} e 20mmol.L^{-1} . Para os demais reagentes: HRP: 5U.mL^{-1} e TMB: 0.1mg.mL^{-1} . Também foram adicionados água DI e PBS. O Volume final em cada cavidade foi de $100\mu\text{L}$.

Os resultados foram relatados respectivamente como **GOx_solução_placa** e **GOx_biot_solução_placa**. Cada concentração foi testada empregando-se **8 diferentes** cavidades, conforme Figura 4.10. A correção do “branco” e medidas da atividade enzimática utilizando-se o comprimento de onda de 655nm foram realizadas conforme relatado no item 4.7.1.

B – INV

A atividade enzimática da invertase em solução com dois diferentes tampões: citrato ($\text{pH}=5,3$) e PBS ($\text{pH}=7,4$) foi avaliada antecedendo os ensaios da estrutura trienzimática. Esta avaliação foi realizada em função do uso do tampão PBS em todos os experimentos anteriores. Ambos os tampões estão próximos da faixa ótima de trabalho da HRP (pH de $6,0 - 6,5$ com 85% de atividade em $\text{pH} = 7,5$ – SIGMA ALDRICH) e da GOx (pH de $4,0 - 7,0$ – SIGMA ALDRICH e BANKAR et al., 2007), mas o tampão PBS, está fora da faixa ótima da invertase (pH de $3,5 - 4,0$, REED e NAGODAWITHAMA, 1995).

O tampão citrato foi preparado com 9g.L^{-1} de ácido cítrico e $35,3\text{g.L}^{-1}$ de citrato de sódio em água DI)

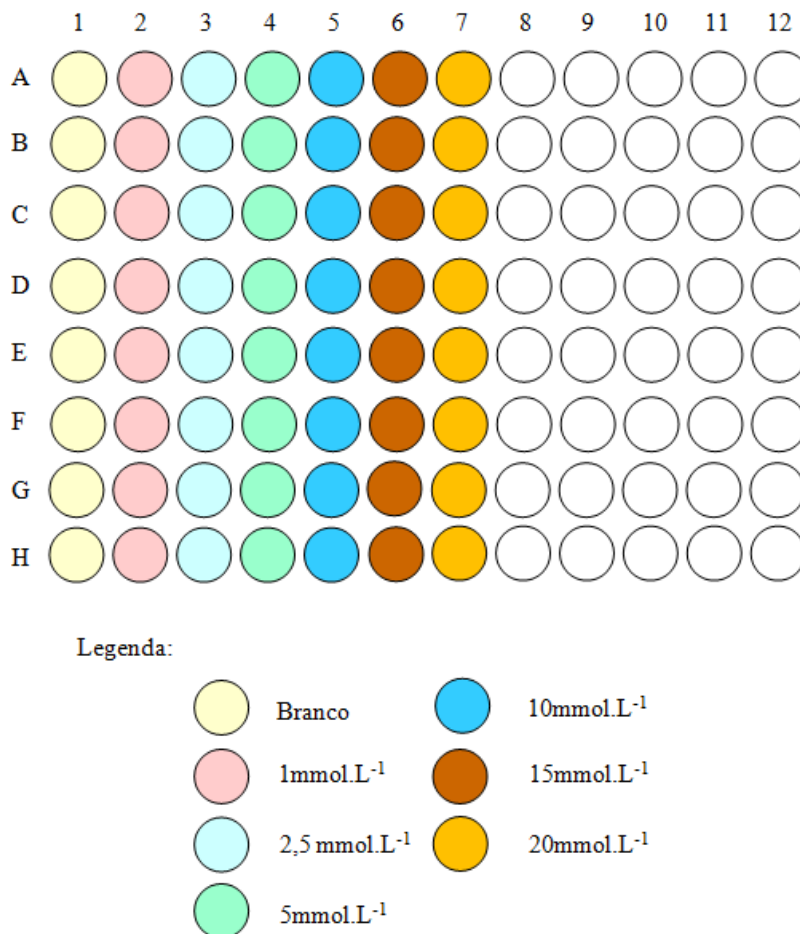


Figura 4.10 – Esquema do uso de microplacas para monitoração da atividade enzimática da GOx e GOx-biot.

Soluções de INV ($0,5\text{U.mL}^{-1}$), GOx (125U.mL^{-1}) e HRP (250U.mL^{-1}) em ambos os tampões foram preparadas e usadas como soluções iniciais. Também foram preparadas soluções iniciais de sacarose (500mM) em ambos os tampões. A solução de TMB (1mg.mL^{-1}) foi preparada com água DI.

A quantidade de substrato foi limitada a concentração de sacarose final na cavidade de 100mmol.L^{-1} . A condição de avaliação foi que em cada cavidade em estudo da microplaca fosse adicionada $0,02\text{U.mL}^{-1}$ de INV, 5U.mL^{-1} de GOx e 5U.mL^{-1} de HRP e $0,1\text{mg.mL}^{-1}$ de TMB. Também foram adicionados água DI e o tampão em estudo, resultando em um volume final em cada cavidade de $100\mu\text{L}$. A correção do “branco” conforme relatado no

item 4.7.1 foi realizada, seis diferentes cavidades foram usadas para relatar os resultados de absorvância, conforme Figura 4.11.

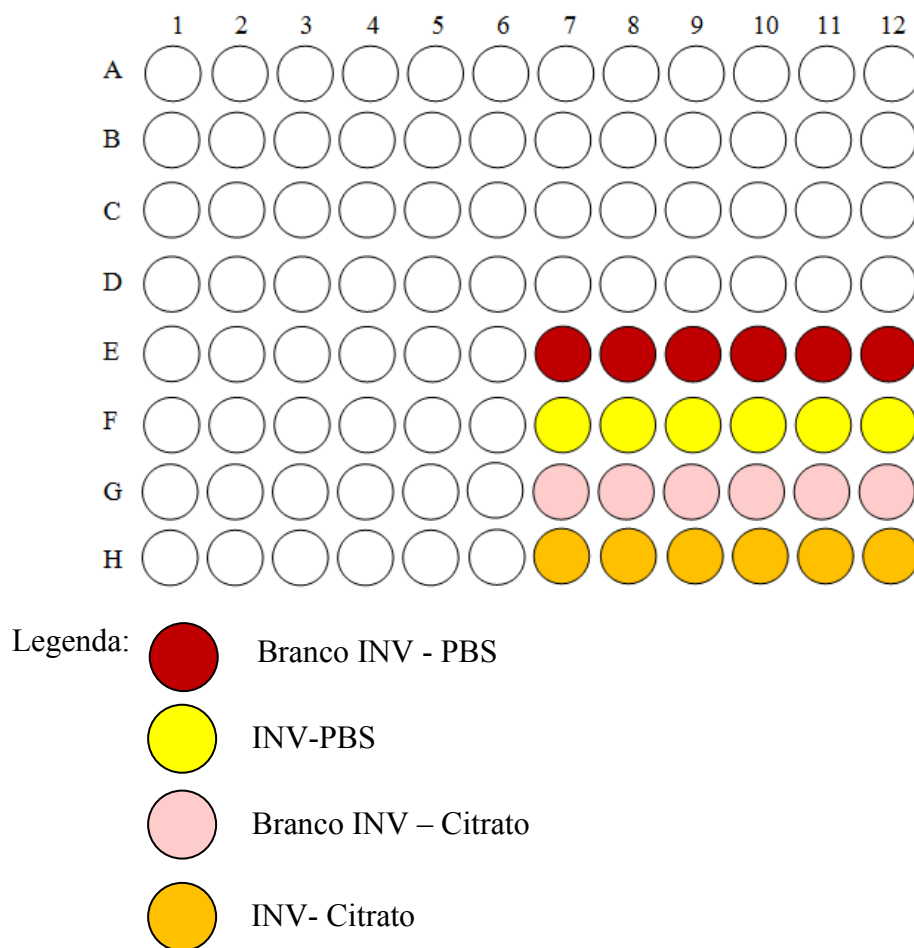


Figura 4.11 – Esquema do uso de microplacas para monitoração da atividade enzimática da INV em solução utilizando tampões PBS e citrato.

4.7.2.2. Medidas de Atividade Enzimática para Monocamadas

A - Monocamadas de GOx/GOx-biot

A estratégia adotada foi a mesma empregada para as cubetas, ou seja, a de preparar uma solução inicial de glucose em PBS de 50mmol.L^{-1} e adicionar as soluções de HRP, TMB, água DI e PBS. Soluções com concentrações de glucose de 1mmol.L^{-1} até 20mmol.L^{-1} foram obtidas nas cavidades. As concentrações finais na cavidade para os demais reagentes

também foram as mesmas: HRP:5U.mL⁻¹ e TMB: 0.1mg.mL⁻¹. O volume final (somatório dos volumes das soluções empregadas) de cada cavidade foi de 100µl.

Leituras de absorbância no comprimento de 655nm foram coletadas a cada 3 minutos até atingir 9 minutos, após a inserção da glucose, para a estimativa dos parâmetros de Michaelis-Menten. Cada concentração foi testada empregando-se **8 cavidades**, em disposição idêntica ao da Figura 4.10. Também foram realizados estudos de monocamadas de GOx-biot montadas na estrutura trienzimática, conforme será relatado no item 4.7.4.

B - Monocamada de HRP-biot

Para esta avaliação uma solução inicial de 3mmol.L⁻¹ de H₂O₂ foi preparada em água DI e foram adicionadas soluções de TMB, água DI e PBS. Os volumes das soluções foram calculados para que a concentração final da solução de peróxido de hidrogênio em cada cavidade fosse de 0,15mmol.L⁻¹ e a de TMB de 0,01mg.mL⁻¹. O volume final (somatório dos volumes das soluções empregadas) de cada cavidade foi de 100µl.

O posicionamento das cavidades está mostrado no item 4.7.4, pois os experimentos foram realizados conjuntamente com os ensaios da estrutura trienzimática.

4.7.3. Medidas de Atividade Enzimática com Estruturas Bienzimáticas

4.7.3.1. Medidas de Atividade Enzimática em Tampão PBS

A medida da atividade enzimática foi feita de maneira similar a descrita no item 4.7.2.2 – A, sendo que para a medida da atividade em cascatas bienzimáticas não é necessária o uso de HRP em solução, por estar esta já imobilizada na estrutura. Os volumes das soluções foram calculados para que as concentrações de glucose (substrato), finais nas cavidades, utilizadas para o experimento fossem de 1 mmol.L⁻¹ e 15 mmol.L⁻¹. e a concentração final de TMB fosse de 0,01mg.mL⁻¹, com um volume final de 100µL em cada cavidade. O número de replicatas foi igual a 6 e foram realizadas avaliações para controle das camadas

executadas, além dos brancos para correção das leituras. Estes controles incluem a avaliação da GOx immobilizada na primeira camada (com concentração final de glucose de 15mmol.L^{-1}) e também da imobilização da HRP na primeira camada (com concentração de H_2O_2 de $0,15\text{mmol.L}^{-1}$). A Figura 4.12 resume os ensaios realizados para o estudo da atividade da estrutura bienzimática. O tempo de reação foi de 50 minutos.



Figura 4.12 – Esquema do uso de microplacas para monitoração da atividade das estruturas bienzimáticas em PBS.

Também foram realizados estudos da estrutura bienzimática GOx-Biot/HRP-Biot montada na estrutura trienzimática para uma concentração final de glucose na cavidade de 15mM , conforme será relatado no item 4.7.4

4.7.3.2. Ciclos de Biocatálise Enzimática

Para avaliar a reutilização do biossensor formado pelas estruturas nanoestruturadas bienzimáticas, as cascatas foram submetidas a três ciclos de reações em cascata (conforme item 4.7.3.1) na concentração de glucose de 15 mmol.L^{-1} . Os testes foram realizados em intervalos de 24h, sendo que no intervalo entre os testes as microplacas foram armazenadas em PBS a temperatura de $(6 \pm 2)^\circ\text{C}$. O tempo de reação foi de 30 minutos.

4.7.3.3. Avaliação da Especificidade da Cascata Bienzimática

O procedimento descrito em 4.7.3.1 foi modificado com o uso de frutose como substrato. A estrutura que apresentou a melhor resposta foi submetida a concentrações de frutose de 1 mmol.L^{-1} e 15 mmol.L^{-1} na cavidade, conforme Figura 4.13. Foram adicionados $\text{H}_2\text{O DI}$ e TMB ($0,01 \text{ mg.mL}^{-1}$ final na cavidade) e PBS. O volume final em cada cavidade foi de $100 \mu\text{L}$.

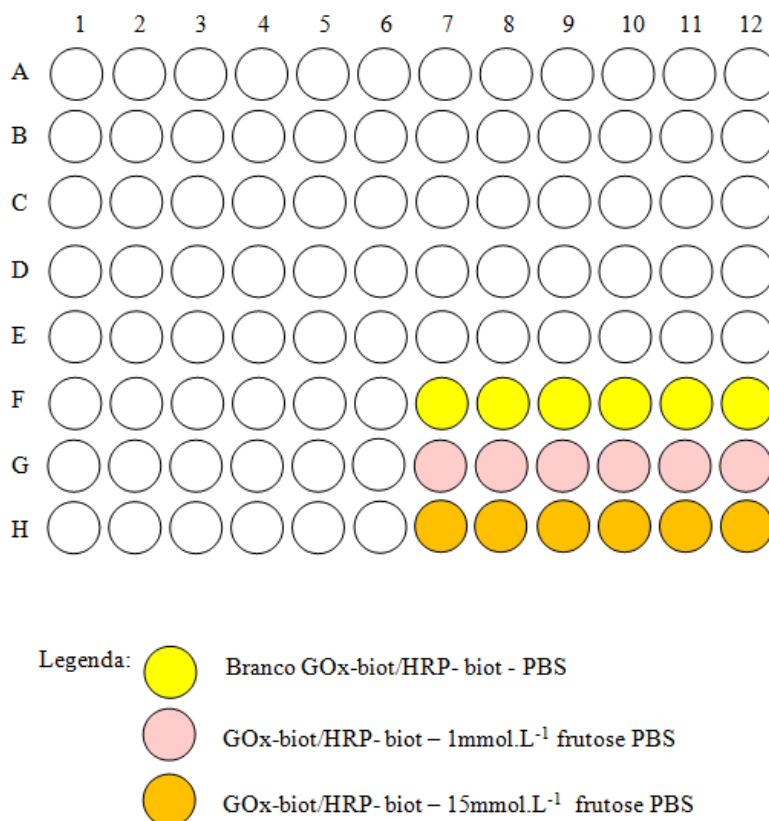


Figura 4.13 – Esquema do uso de microplacas para avaliação de especificidade da estrutura bienzimática GOx-biot/HRP-biot.

4.7.3.4. Detecção de Glucose Originada da Hidrólise da Sacarose em Refrigerantes com o Uso de Estruturas Bienzimáticas

Como prova de conceito, as estruturas bienzimáticas construídas neste trabalho foram testadas utilizando amostras reais de refrigerante regular (com adição de glucose) e dietético (zero açúcar). Para isto, o procedimento descrito em 4.7.3.1 foi modificado pela substituição da glucose pelos refrigerantes (Figura 4.14).

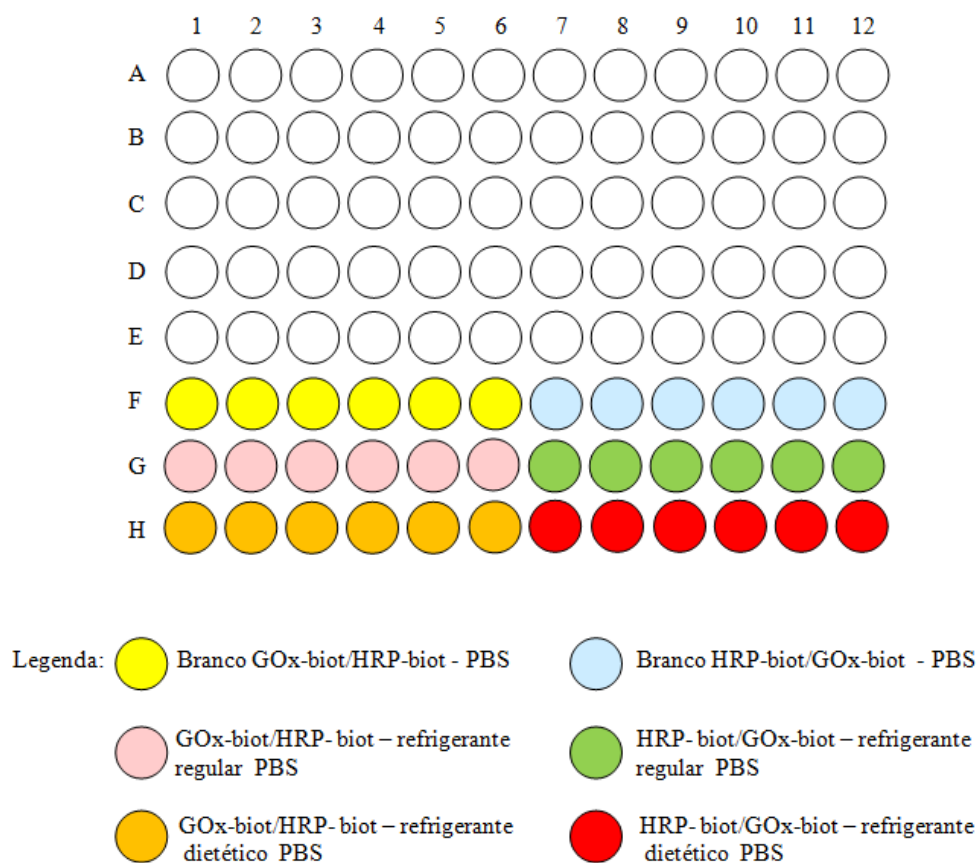


Figura 4.14 – Esquema do uso de microplacas para detecção de glucose originada da hidrólise da sacarose de refrigerantes com uso das estruturas bienzimáticas GOx-biot/HRP-biot.

4.7.3.5. Medidas de Atividade Enzimática em Tampão Citrato

A medida da atividade enzimática utilizando-se de tampão citrato foi feita de maneira similar à descrita no item 4.7.3.1, substituindo-se o tampão empregado. Foram utilizados substrato glucose (preparada com tampão citrato), TMB (preparada com água DI) além de

água DI e tampão citrato. A concentração final dos reagentes na cavidade foi de 15mmol.L^{-1} de glucose e $0,01\text{mg.mL}^{-1}$ para a TMB. O volume final na cubeta foi de $100\mu\text{L}$.

Os controles da cascata bienzimática foram os mesmos descritos em 4.7.3.2 e o número de replicatas foi de seis ($n=6$), sendo a disposição das cavidades detalhada na Figura 4.15.

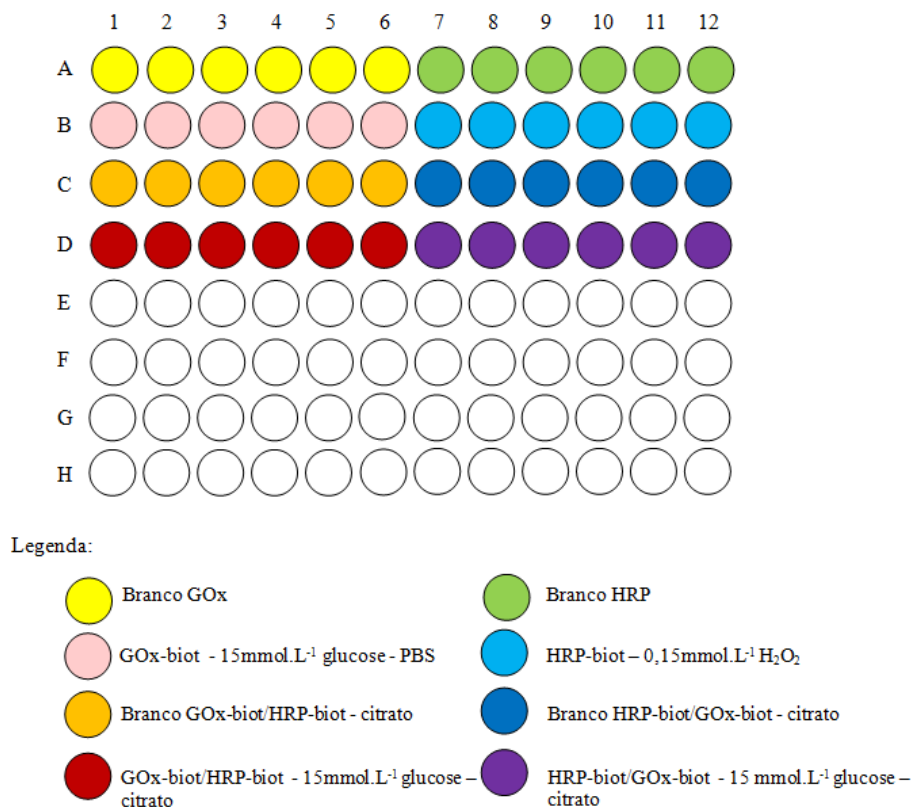


Figura 4.15 – Esquema do uso de microplacas para monitoração da atividade das estruturas bienzimáticas utilizando tampão citrato.

4.7.4. Medidas de Atividade Enzimática com Estruturas Trienzimáticas

Basicamente a avaliação da atividade enzimática da trienzima envolve as reações em cascata:

- A INV interage com o substrato sacarose, tendo glucose como um de seus produtos;

- A GOx utiliza a glucose produzida pela INV como substrato, tendo H₂O₂ como um de seus produtos, e;
- A HRP utiliza o H₂O₂ é produzido pela GOx como substrato, juntamente com o TMB que é adicionado em solução durante o ensaio, resultando em TMBox como um de seus produtos, cuja detecção por UV é realizada.

A nítida dependência dos resultados pelo correto funcionamento das três enzimas nos levou a realização de ensaios de avaliação da invertase em solução buscando o melhor meio de teste, conforme item 4.7.2.1.

4.7.4.1. Medidas de Atividade Enzimática em Tampão Citrato

A avaliação da cascata trienzimática foi realizada utilizando-se de tampão citrato. Para a realização dos experimentos uma solução de sacarose de 500mmol.L⁻¹ em citrato foi preparada, para que se fosse obtida uma concentração de 100mmol.L⁻¹ na cavidade da microplaca Foram adicionados também H₂O DI, TMB (0,01mg.mL⁻¹ final na cavidade) e tampão citrato. O volume final em cada cavidade foi de 100µL.

Adicionalmente foram avaliadas as atividades das enzimas da primeira e segunda camadas montadas na trienzima, **porém avaliadas de forma individualizada**, seguindo os procedimentos relatados no item 4.7.2.2, e também as atividades enzimáticas das estruturas bienzimáticas (montadas na trienzima) seguindo os procedimentos relatados no item 4.7.3.1.

A Figura 4.16 apresenta o esquema do uso de microplacas para o uso na monitoração da atividade enzimática neste experimento.

Em todos os casos a correção do “branco” foi realizada, conforme item 4.7.1. **Seis** diferentes cavidades foram usadas para relatar os resultados de absorbância.



Legenda:

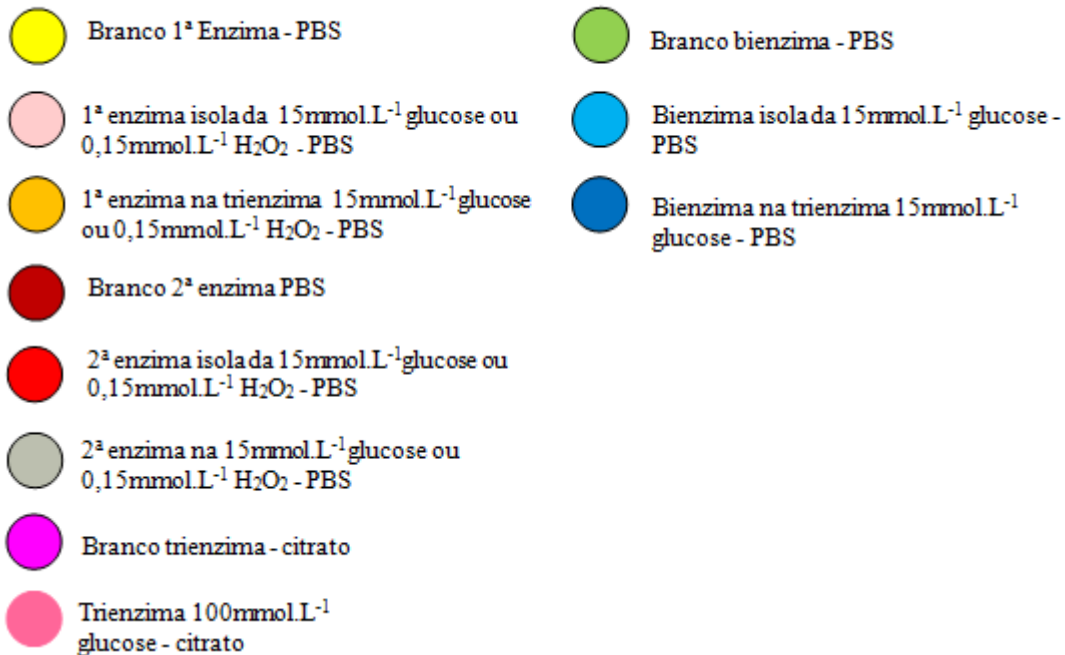


Figura 4.16 – Esquema do uso de microplacas para monitoração da atividade enzimática nas estruturas avaliadas durante o experimento das estruturas trienzimáticas.

4.7.4.2. Ciclos de Biocatálise Enzimática

Para avaliar a reutilização do biossensor formado pela estrutura nanoestruturada trienzimática, a estrutura HRP-biot/GOx-biot/INV-biot foi submetida a dois ciclos de reações em cascata (conforme item 4.7.4.1) nas concentrações de sacarose 100mmol.L^{-1} . Os testes foram realizados em intervalos de 24h, sendo que no intervalo entre os testes a microplaca foi armazenada em PBS a temperatura de $(6 \pm 2)^\circ\text{C}$.

4.7.4.3. Avaliação da Especificidade da Cascata Trienzimática

Semelhante ao procedimento descrito no item 4.7.5.1 foi realizada a verificação de especificidade através do uso do substrato frutose. Novamente, a estrutura que apresentou a melhor resposta foi submetida à exposição de frutose e sacarose (concentração final na cavidade de 100mmol.L^{-1}) conforme Figura 4.17. Foram também adicionados H_2O DI, TMB (concentração final na cavidade de $0,01\text{mg.mL}^{-1}$) e tampão citrato, resultando em um volume final de $100\mu\text{L}$ em cada cavidade.

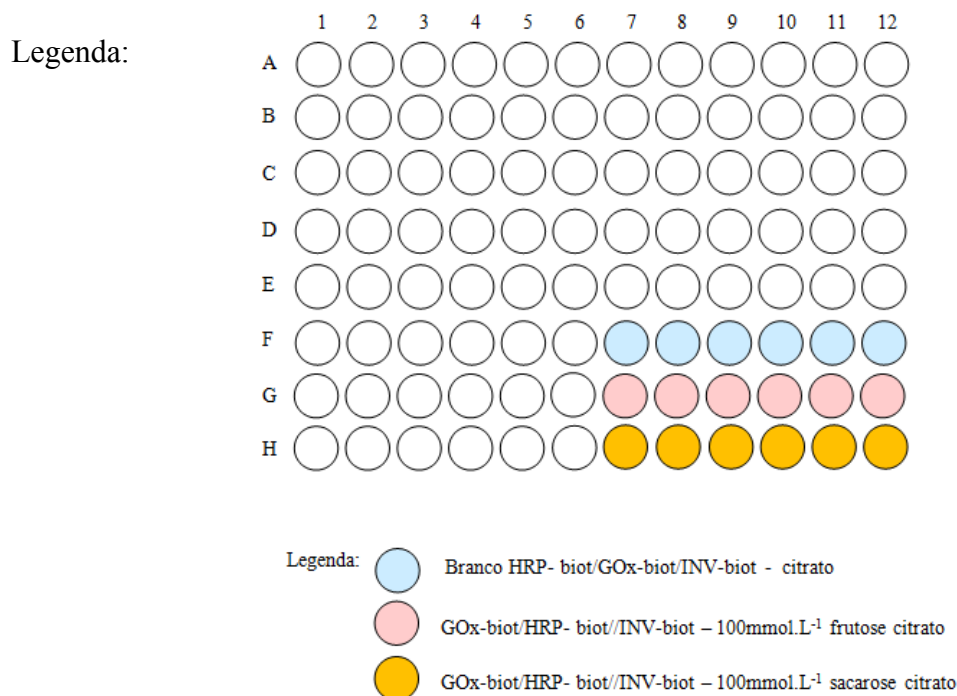


Figura 4.17 – Esquema do uso de microplacas na avaliação da especificidade da estrutura trienzimática HRP-biot/GOx-biot/INV-biot.

4.8. Otimização da Biotinização da Invertase

Nesta etapa foi estudado o efeito da biotinação da invertase em diferentes condições de pH, utilizando-se de tampões PBS (pH=7,4) e citrato (pH=5,3), seguindo o procedimento descrito no item 4.4, fazendo a adaptação da modificação do tampão quando a enzima era biotinizada em tampão citrato.

Inicialmente, as atividades da INV biotinizada nas diferentes condições foram comparadas seguindo os procedimentos descritos no item 4.7.2.1.

A enzima biotinizada com tampão citrato foi então testada em estruturas bienzimáticas contendo GOx-biot (em PBS), conforme Figura 4.18, de forma a verificar se a invertase biotinizada com o novo processo mantinha sua atividade enzimática após a imobilização.

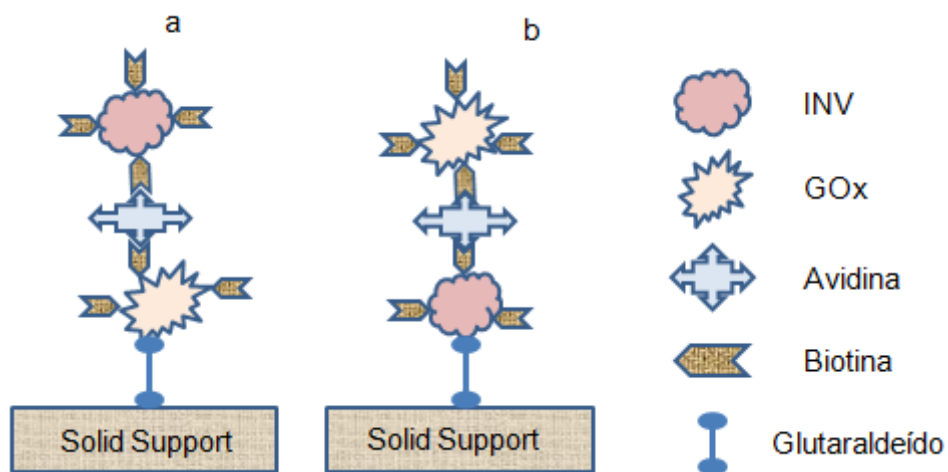


Figura 4.18 – Representações esquemáticas das estruturas bienzimáticas estudadas, utilizando-se das enzimas GOx-biot e INV-biot: GOx-biot/INV-biot (a) e INV-biot/GOx-biot.

Para tal, foram utilizados os procedimentos de teste da estrutura trienzimática (item 4.7.4), usando tampão citrato e concentração de sacarose final de 100 mmol.L^{-1} . HPR em excesso foi utilizada em solução, $0,5 \text{ U.mL}^{-1}$, pois esta enzima não foi imobilizada.

Como controles foram realizados testes nas enzimas GOx-biot (idêntico ao relatado em 4.7.2.1, porém utilizando tampão citrato) e INV-biot isoladamente, após a imobilização na 1ª camada e com as duas camadas imobilizadas, além dos brancos. Para a avaliação da atividade enzimática da invertase foi utilizado substrato sacarose e soluções de GOx e HRP (todas preparadas com tampão citrato), TMB (preparada com água DI) além de água DI e tampão citrato. A concentração final dos reagentes na cavidade foi de 100mmol.L^{-1} de sacarose, 5U.mL^{-1} para a GOx e HRP e $0,01\text{mg.mL}^{-1}$ para a TMB. O volume final na cavidade foi de $100\mu\text{L}$.

A Figura 4.19 resume os ensaios realizados.

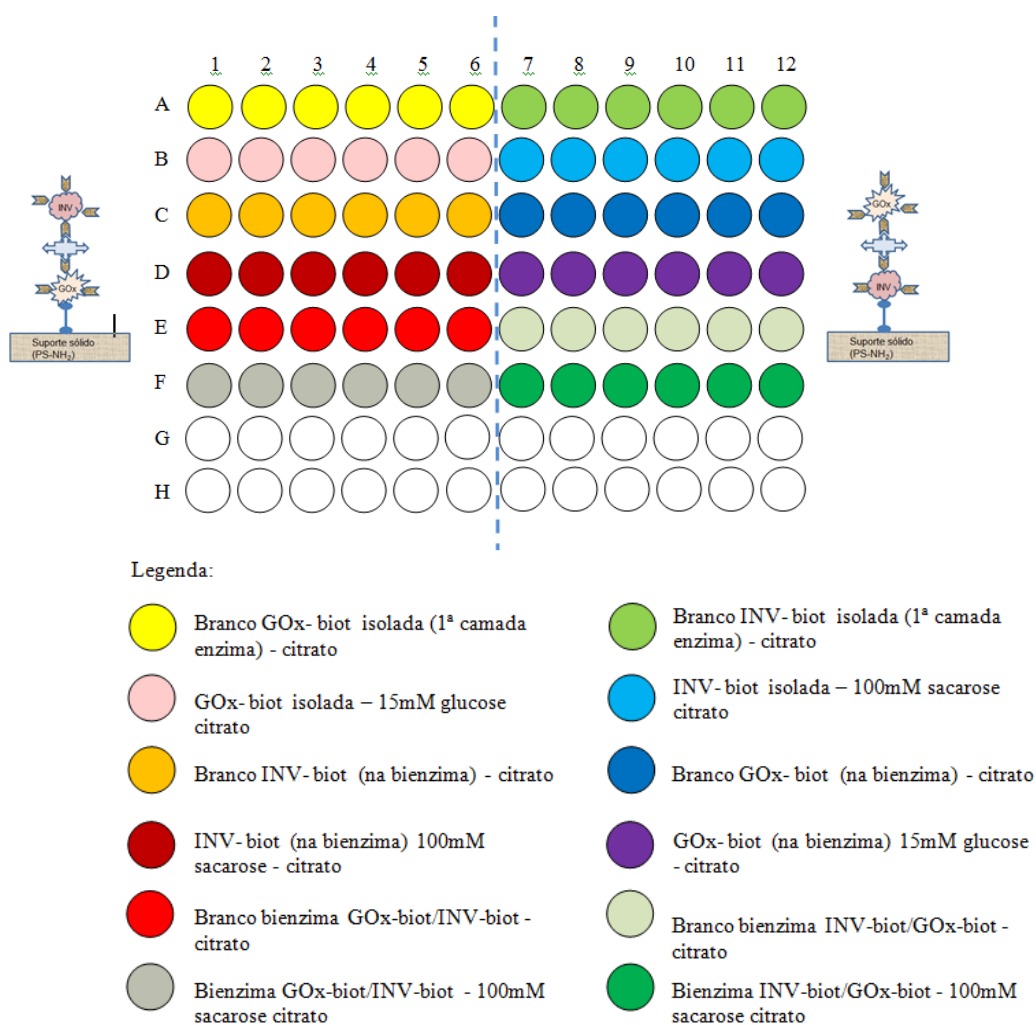


Figura 4.19 – Esquema do uso de microplacas para uso na monitoração da atividade enzimática nas estruturas GOx-biot/INV-biot e INV-biot/GOx-biot.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Caracterização do Suporte Vítreo

A Figura 5.1 mostra o espectro de EDS a partir do suporte sólido vítreo estudado.

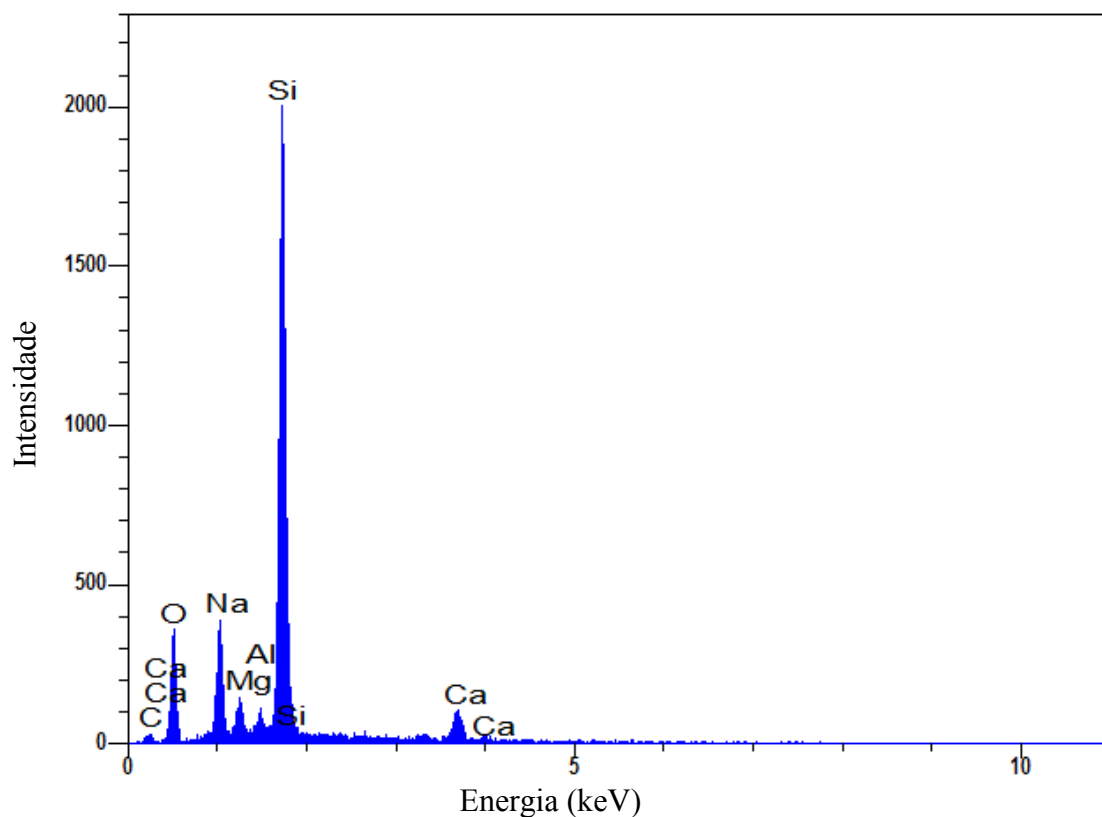


Figura 5.1 – Resultado de caracterização EDS para lâminas de vidro (lâminas padrão de microscópio).

Através da análise do resultado podemos classificar as lâminas de vidro como vidro calcosódico. É esperada a predominância dos elementos Si, Na, Ca, e O (BOURHIS, 2008). Como os elementos detectados correspondem aos elementos esperados, foi feita a estimativa do percentual de óxidos constituintes do material, utilizando-se o software do EDS. Os resultados são mostrados na Tabela V.1.

Tabela V.1 – Resultado da análise química semi-quantitativa através de EDS, para as lâminas de vidro

Suporte Vítreo	
Óxidos	% composição do material
SiO ₂	76
Na ₂ O	12
CaO	5
MgO	4
Al ₂ O ₃	2

5.2. Caracterização da Funcionalização da Superfície de Suportes Sólidos

5.2.1. Caracterização por Ângulo de Contato

Após os procedimentos de hidrofilização, funcionalização com agente silano mercaptopropiltrimetoxissilano (MPTMS) e funcionalização com agente silano aminopropiltrimetoxissilano (APTMS), amostras foram submetidas à medição de ângulo de contato. Os resultados obtidos podem ser vistos na Tabela V.2, representados como média ± 1 desvio padrão. O número de amostras foi de 6 (n=6) para cada condição.

Tabela V.2 – Medidas de ângulo de contato para diferentes funcionalizações

Grupo funcional	Tiol	Amina	Sem Funcionalização	Hidroxila
Ângulo de contato (°)	67,2 \pm 2,8	62,9 \pm 2,4	30,8 \pm 2,3	11,1 \pm 1,8

Imagens típicas das gotas de água, capturadas para cada uma das modificações de superfície estudadas, juntamente com o gráfico que mostra o comportamento do ângulo de contato em função da funcionalização de superfície, estão mostradas na Figura 5.2.

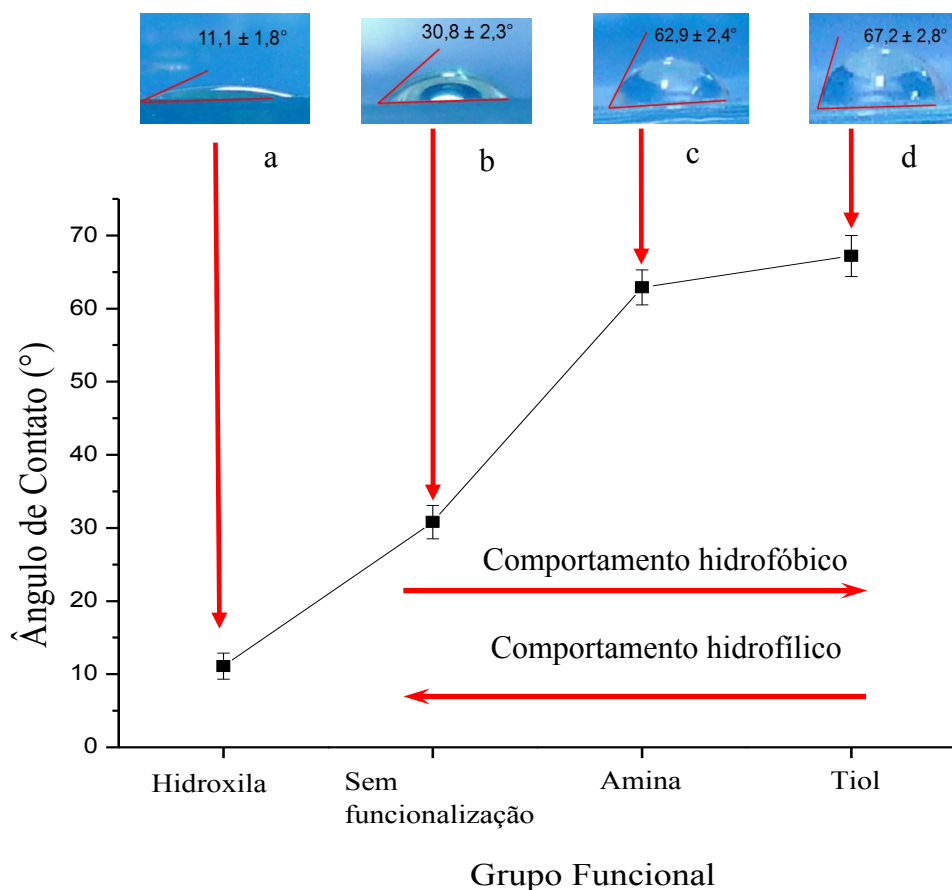


Figura 5.2 – Gráfico demonstrando a dependência do ângulo de contato em função da funcionalização de superfície e imagens típicas obtidas para avaliação da superfície dos suportes vítreos contendo valores médios para as condições estudadas ± 1 desvio padrão.

Como tendência geral o ângulo de contato foi significativamente alterado pela introdução de espécies hidrofílicas/ hidrofóbicas. A Figura 5.3 contém a representação esquemática dos suportes vítreos submetidos a diferentes funcionalizações estudadas. Nesta figura é possível observar que diferentes grupos químicos estão disponíveis na superfície modificada, referentes aos grupos funcionais do respectivo organossilano. No caso do suporte submetido à hidrofilação, temos os grupos hidroxila disponíveis na superfície, resultantes da ação de íons OH^- do hidróxido de amônio sobre o óxido de silício na interface do vidro (VERHAVERBEKE e PARKER, 1997).

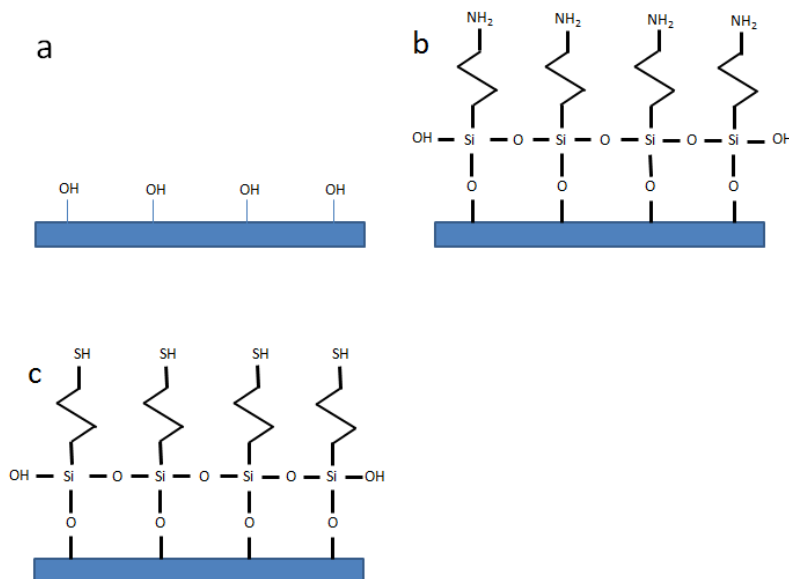


Figura 5.3 – Representação esquemática de suportes sólidos funcionalizados: funcionalização hidroxila (a), funcionalização amina (b) e funcionalização tiol (c).

Através da análise dos dados pode ser concluído que o processo de funcionalização das lâminas obteve sucesso. Isto pode ser atribuído ao comportamento efetivo dos agentes silanos em reagir com os grupos silanóis da superfície sob condições apropriadas (pH, tempo de incubação, tempo, etc.). Essencialmente os agentes modificadores silanos são submetidos a um processo de duas etapas: hidrólise e condensação permitindo a formação de um filme na superfície do suporte sólido, conforme já descrito no item 3.2.3.1. As reações de hidrólise e condensação são dependentes do pH e o objetivo da preparação da solução usada para a funcionalização com o agente silano é a de maximizar as reações de hidrólise em comparação com as reações de condensação. Também o uso de álcool em solução favorece a formação de filmes monocamadas (GELEST, 2006).

Houve um incremento no ângulo de contato, caracterizando superfícies mais hidrofóbicas, nas lâminas submetidas à funcionalização via agentes silanos, se compararmos com os suportes sólidos sem tratamento e também com aqueles submetidos à funcionalização dos grupos hidroxila. Existem várias publicações (CHAUHAN et al. 2008, HOWARTER 2006, HALLIWELL 2001 e YOSHIDA et al., 2001) que postulam a possibilidade de crescimento do filme silano de forma a expor diferentes grupos químicos na superfície da camada

depositada, seja pela formação de filmes multicamada, como pode ser visto na Figura 5.4, ou pela rotação dos carbonos da cadeia alifática. Na Figura 5.4 a letra R_1 representa o grupo funcional do agente modificador silano em estudo. A exposição de grupos propil na superfície é o principal responsável pelo aumento da característica hidrofóbica das superfícies modificadas por agentes silanos (MANSUR et al., 2008).

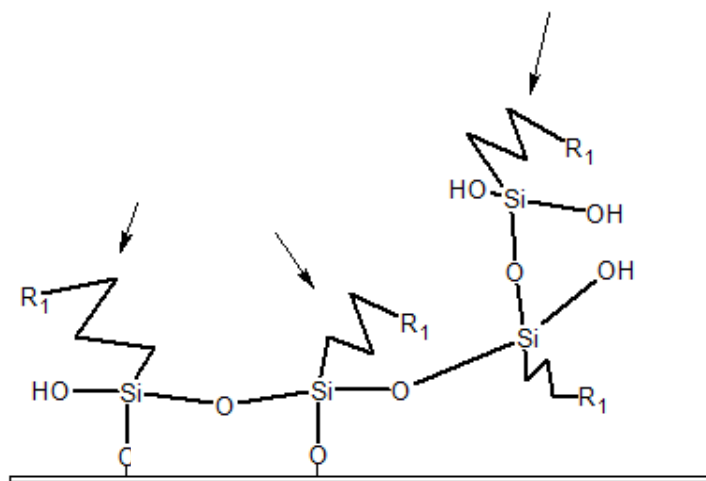


Figura 5.4 – Representação esquemática da camada formada após o processo de modificação de superfície utilizando-se de organossilanos, onde R_1 é o grupo funcional do silano em estudo e as setas mostram os espaçadores propil expostos na superfície (Adaptado de CHAUHAN et al., 2008).

Os dados obtidos para os ângulos de contato das superfícies funcionalizadas com APTMS estão de acordo com os experimentos de HOWARTER et al. (2006), CHAUHAN et al. (2008) e também MANSUR et al. (2000). Em MANSUR et al. (2008) foi relatado ângulo médio de aproximadamente 70° para a funcionalização com MPTMS.

5.2.2. Caracterização por Espectroscopia na Região do Infravermelho - FTIR

A Figura 5.5 apresenta o espectro FTIR de vidros sem funcionalização (a), vidros submetidos à funcionalização aminossilano (b) e submetidos a funcionalização aminossilano + glutaraldeído (GA) (c) e a a Figura 5.6 apresenta o espectro FTIR de vidros

sem funcionalização (a), vidros submetidos à funcionalização mercaptossilano (b) e submetidos a funcionalização mercaptossilano + glutaraldeído (GA) (c).

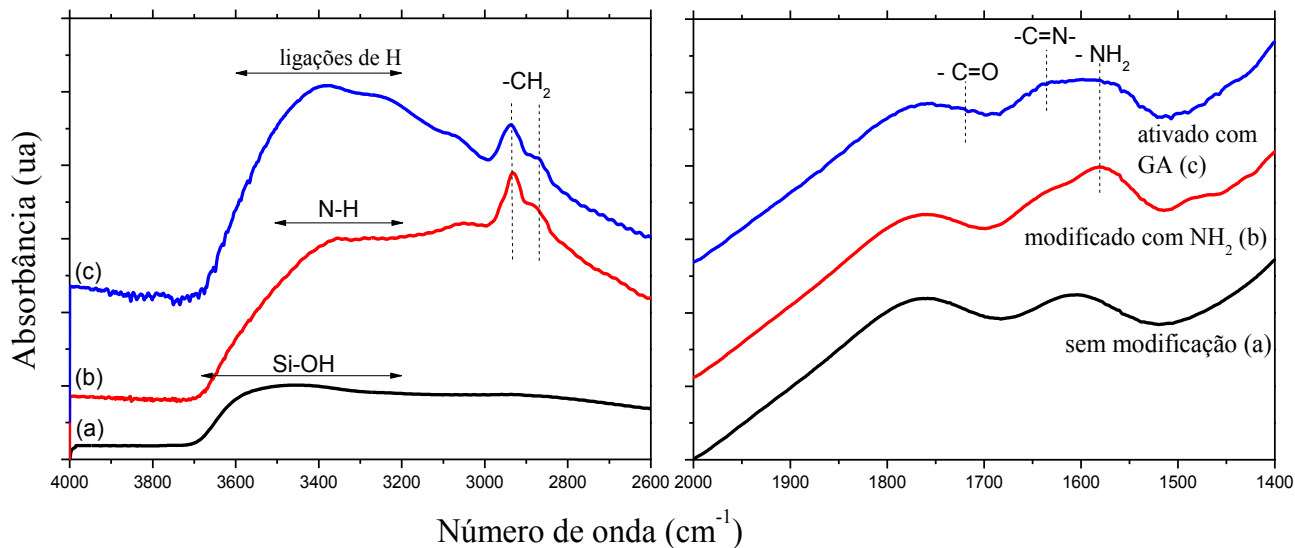


Figura 5.5 – Espectro FTIR de suporte sólido sem funcionalização (a), suporte sólido “amino-funcionalizado” (b) e suporte sólido “amino funcionalizado + glutaraldeído” (c).

Para os vidros sem modificação (Fig. 5.5 (a) e Fig. 5.6 (a)) a banda entre $3700\text{-}3200\text{cm}^{-1}$ corresponde a vibrações de estiramento fundamentais associadas com diferentes grupos silanóis. Os modos de estiramento aparecem em 3600cm^{-1} para silanóis vicinais e 3440cm^{-1} para silanóis internos (HERNÁNDEZ-PADRÓN et al., 2005). Para os vidros modificados com agentes silanos (Fig. 5.5 (b) e Fig. 5.6 (b)) é possível notar as bandas de estiramento simétrico ($2870\text{-}2860\text{cm}^{-1}$) e assimétrico ($2930\text{-}2920\text{cm}^{-1}$) dos grupos $-\text{CH}_2$ (XU et al., 1998), principalmente relacionados com os espaçadores propil introduzidos pela funcionalização orgânica das superfícies dos suportes. Além disso, algumas mudanças no intervalo de $3600\text{-}3200\text{cm}^{-1}$ podem ser creditadas a condensações incompletas do Si-OH do agente modificador silano, que foi formado durante a hidrólise e desenvolvimento de

pontes de hidrogênio entre o grupo organofuncional e os silanóis disponíveis na superfície do suporte ou de outra molécula do agente de modificação, conforme representação esquemática da Figura 5.7 (CHIANG et al., 1981).

O espectro FTIR do suporte sólido modificado com grupo tiol (Fig. 5.6 (b)) apresenta picos fracos relacionados com grupos $-CH_3$ em aproximadamente 2956cm^{-1} e 2886cm^{-1} (XU et al., 1998) provenientes das ligações Si-OCH_3 . Isto pode ser um indicativo que o agente mercaptossilano não foi completamente hidrolisado (HERNÁNDEZ-PADRÓN et al., 2005).

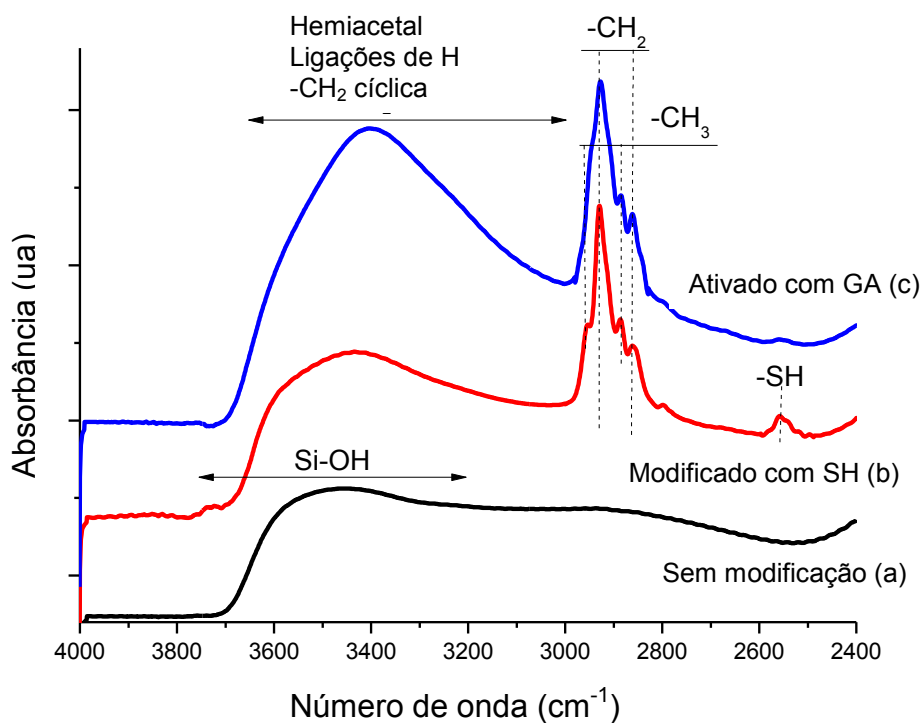


Figura 5.6 – Espectro FTIR de suporte sólido sem funcionalização (a), suporte sólido “tiol-funcionalizado” (b) e suporte sólido “tiol funcionalizado + glutaraldeído” (c).

Picos característicos dos grupos organofuncionais foram detectados para ambos os agentes silanos. Para os suportes modificados com agente aminosilano (Fig 5.6 (a)) um pico importante entre $3500\text{-}3200\text{cm}^{-1}$ é atribuído a vibrações estiramento de grupos N-H e a banda entre $1650\text{-}1550\text{cm}^{-1}$ é atribuída ao modo de vibração de dobramento angular das aminas primárias (-NH_2). Para os suportes modificados com agente mercaptossilano (Fig 5.6 (b)) foi detectado o pico de vibração do -SH em 2550cm^{-1} (ANDRADE et al., 2006, HERNÁNDEZ-PADRÓN et al., 2005).

Na Figura 5.5 é possível notar que os suportes submetidos ao glutaraldeído apresentaram um incremento na banda imina (-C=N-) em 1634cm^{-1} e decréscimo simultâneo na banda da amina (-NH_2) em 1580cm^{-1} (COSTA-JR et al., 2009). Também uma banda em 1729cm^{-1} foi detectada e é atribuída ao estiramento dos grupos C=O remanescentes do glutaraldeído, após sua reação com o suporte sólido, que são esperados já que o glutaraldeído é um dialdeído (MANSUR et al., 2008).

A comparação do espectro do suporte funcionalizado com mercaptossilano antes (Fig 5.6 (b)) e depois sua reação com o glutaraldeído (Fig 5.6 (c)) mostra o desaparecimento da banda do -SH (2550cm^{-1}) que é consumida durante as ligações tioacetais. Também são notadas significativas alterações nas bandas relacionadas com hidroxilas e pontes de hidrogênio ($3700\text{-}3000\text{cm}^{-1}$), que podem estar associadas com algumas possibilidades tais como a formação de produtos hemitioacetal contendo hidroxilas, moléculas de glutaraldeído associadas através de ligações de hidrogênio a espécies doadoras de prótons (tais como silanóis do suporte sólido) e vibrações de estiramento -CH de estruturas cíclicas

(deslocadas para maiores frequências em comparação com cadeias alifáticas). Algumas destas possibilidades são mostradas na Figura 5.7.

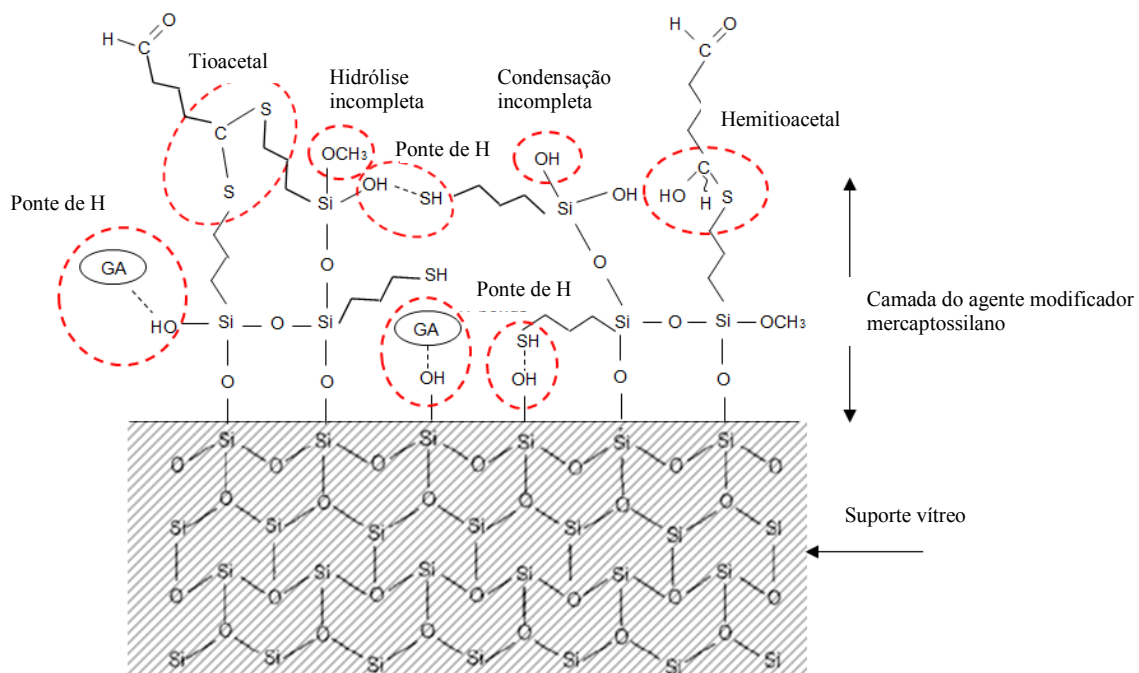


Figure 5.7 – Representação esquemática da estrutura tridimensional da funcionalização tiol em sólido vítreo e suas interações com glutaraldeído (Adaptado de MATINLINNA et al., 2007 e CHIANG et al., 1981).

5.3. Imobilização Monocamada

5.3.1. Atividades Enzimáticas da GOx Imobilizada em Suportes Vítreos com Diferentes Funcionalizações para Comparação de Diferentes Estratégias de Imobilização

Nas Figuras de 5.8 a 5.10 são apresentadas as curvas de atividade enzimática obtidas para a imobilização covalente da GOx em suporte sólido com funcionalização amina, tiol, e hidroxila. Na Figura 5.11 é apresentada a curva de atividade enzimática da imobilização da GOx em suporte sólido não funcionalizado (imobilização por adsorção). Em todas estes experimentos foi utilizada a concentração de glucose de 15mmol.L⁻¹. Os resultados foram colocados em ordem decrescente de absorbância.

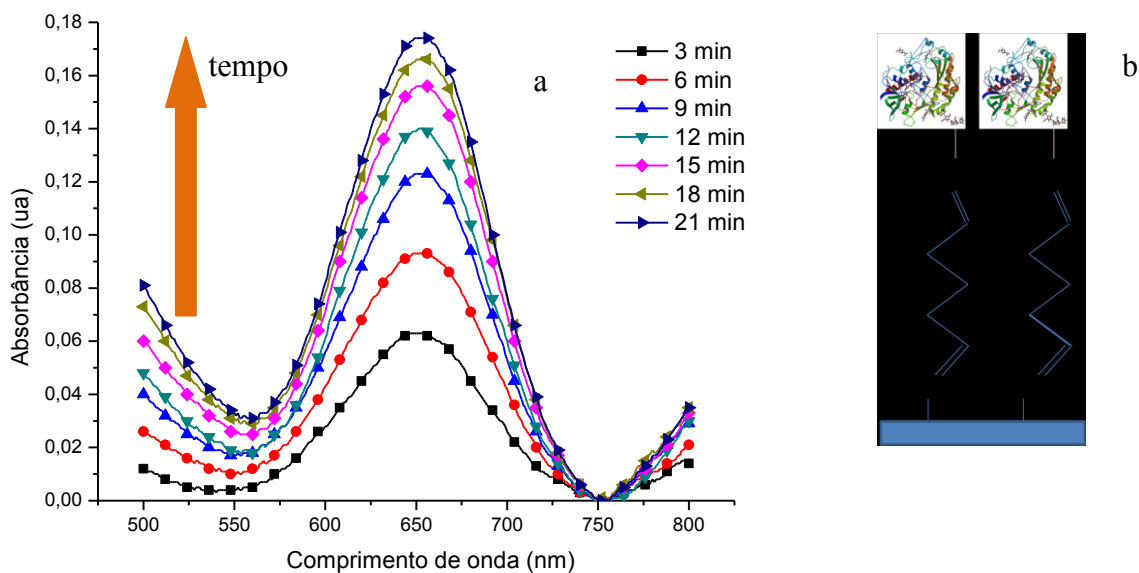


Figura 5.8 - Atividade enzimática da GOx após imobilização em suporte com funcionalização NH₂ (a) e representação esquemática da estrutura (b).

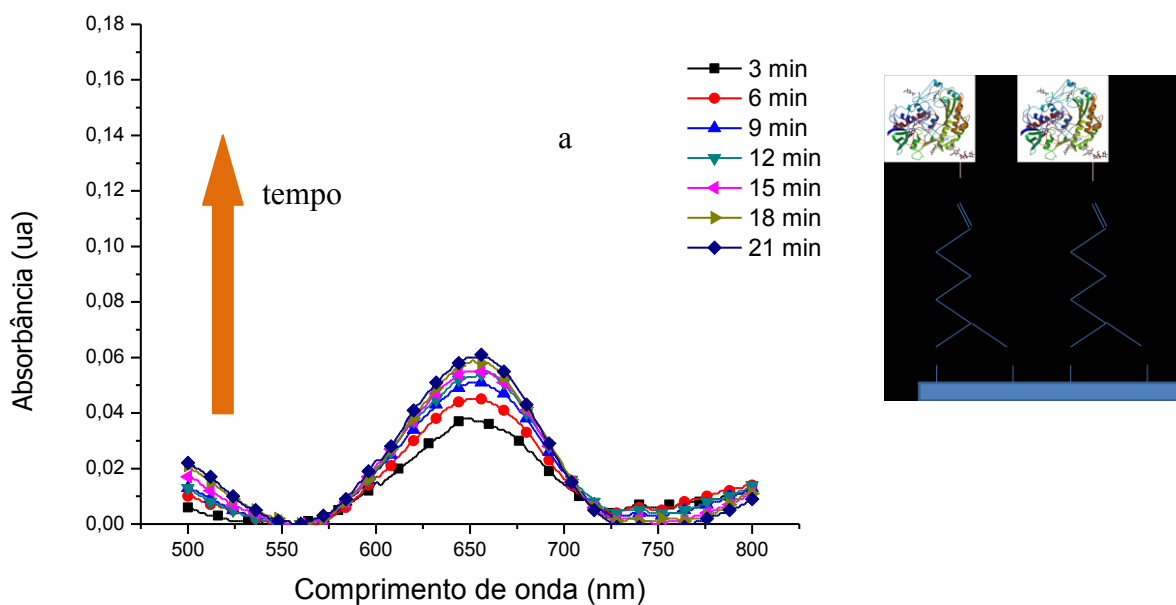


Figura 5.9 - Atividade enzimática da GOx após imobilização em suporte com funcionalização SH (a) e representação esquemática da estrutura (b).

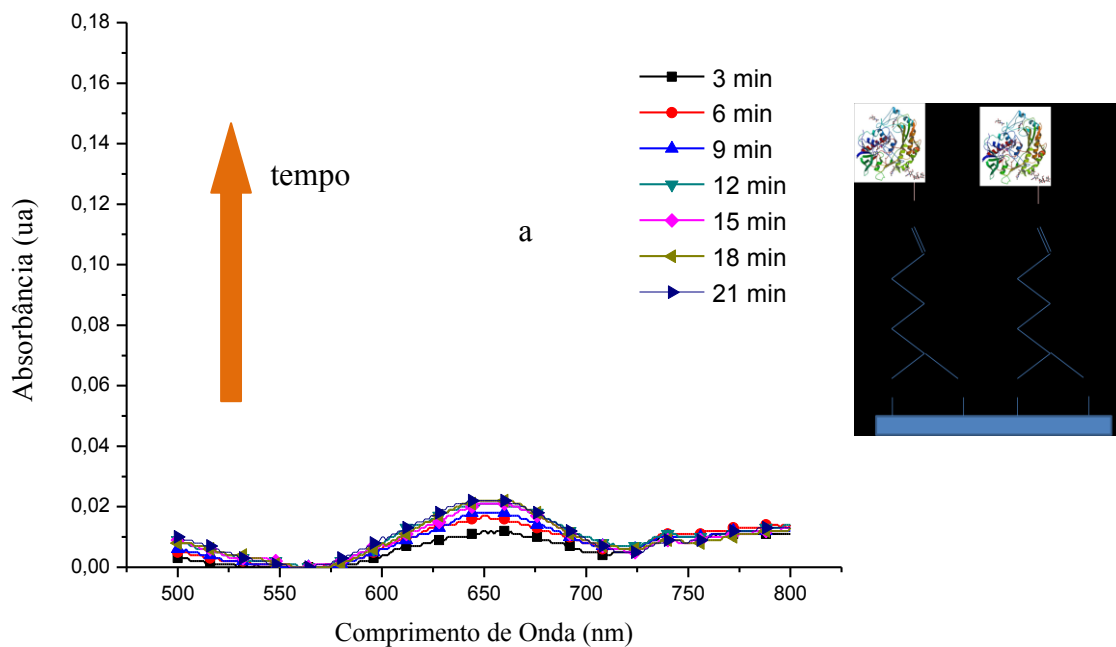


Figura 5.10 - Atividade enzimática da GOx após imobilização em suporte com funcionalização OH (a) e representação esquemática da estrutura (b).

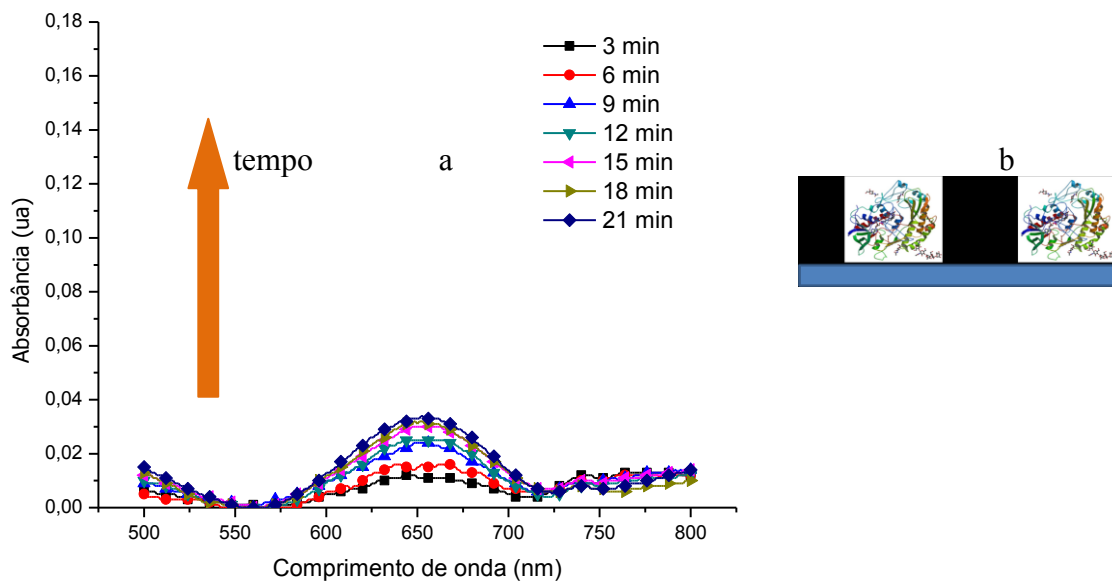


Figura 5.11 - Atividade enzimática da GOx após imobilização em suporte não funcionalizado (a) e representação esquemática da estrutura (b).

Basicamente o sistema se baseia na ação cascata envolvendo a GOx immobilizada, a HRP adicionada em solução e a TMB, ilustrada na Figura 5.12. As lâminas com GOx adsorvida não possuem a ligação com o glutaraldeído mostrada. O resultado da reação é a da oxidação da TMB que tem seu pico de absorbância de UV-Vis em aproximadamente 650nm.

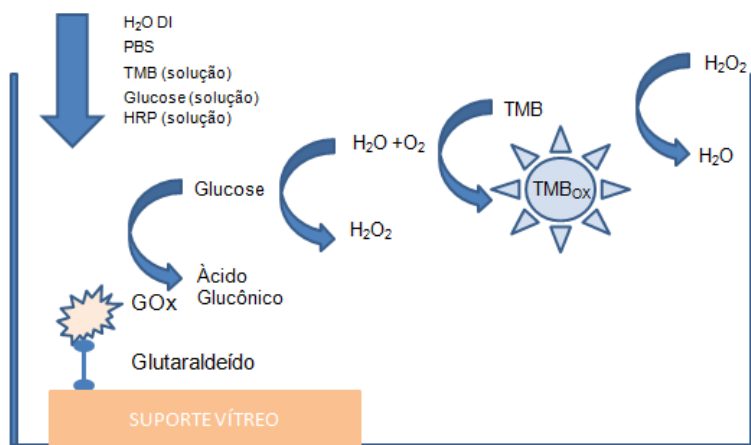


Figura 5.12 – Representação esquemática das reações em cascata utilizadas para monitorar as atividades enzimáticas da GOx immobilizada em sólidos vítreos.

Os resultados se mostram relevantes no que tange a atividade enzimática, isto porque a imobilização poderia ter causado a desnaturação da enzima ou ocultado o seu sítio ativo causando a inativação da mesma. Desta forma, os processos de imobilização propostos podem ter causado mudanças conformacionais nas enzimas, alterando sua estrutura 3D devido à ligação covalente com o suporte sólido, mas mantiveram sua atividade bioquímica.

A funcionalização de superfície do suporte sólido tem uma dramática influência nas respostas do biossensor. A imobilização em suporte sólido com funcionalização amina apresentou os maiores valores de atividade enzimática para a concentração de glucose estudada (15mmol.L^{-1}). Para melhor visualização dos resultados, a Figura 5.13 apresenta a comparação das atividades enzimáticas obtidas nos diferentes suportes sólidos estudados após 9 minutos de reação.

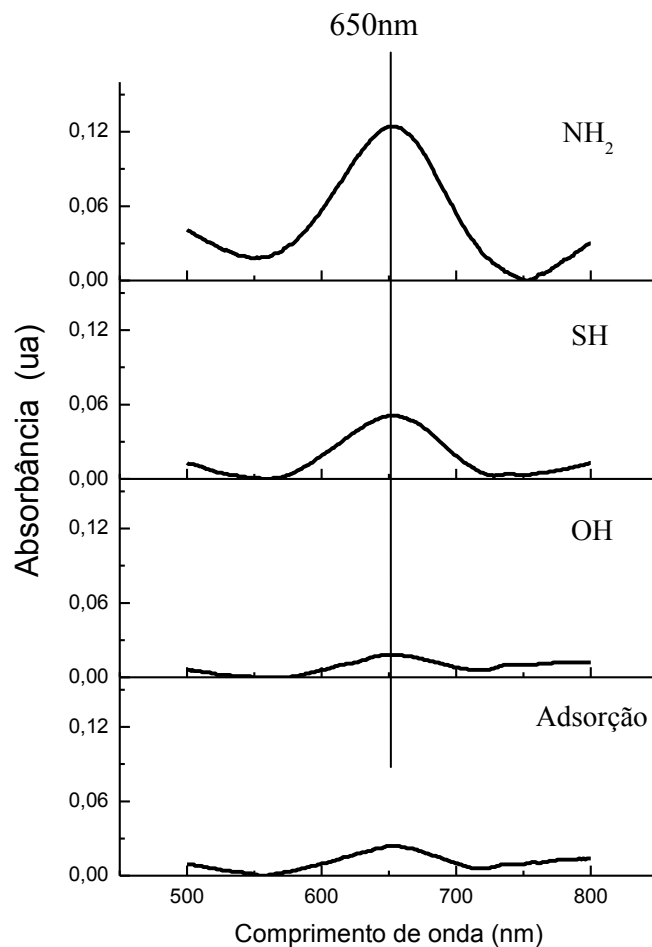


Figura 5.13 – Atividades enzimáticas da GOx imobilizada em suportes sólidos vítreos com funcionalizações NH₂, SH, OH e imobilização por adsorção ([glucose] = 15mmol.L⁻¹ e tempo = 9 minutos).

Os resultados da avaliação da atividade enzimática foram estendidos para a comparação entre absorbâncias obtidas, em um tempo fixo de 9 minutos, para as concentrações de substrato de 5mmol.L⁻¹ e 15mmol.L⁻¹. Além dos dados referentes aos suportes sólidos funcionalizados, foram também inseridos os dados obtidos com o suporte sem funcionalização e também da enzima em solução. Estes resultados podem ser vistos na Figura 5.14.

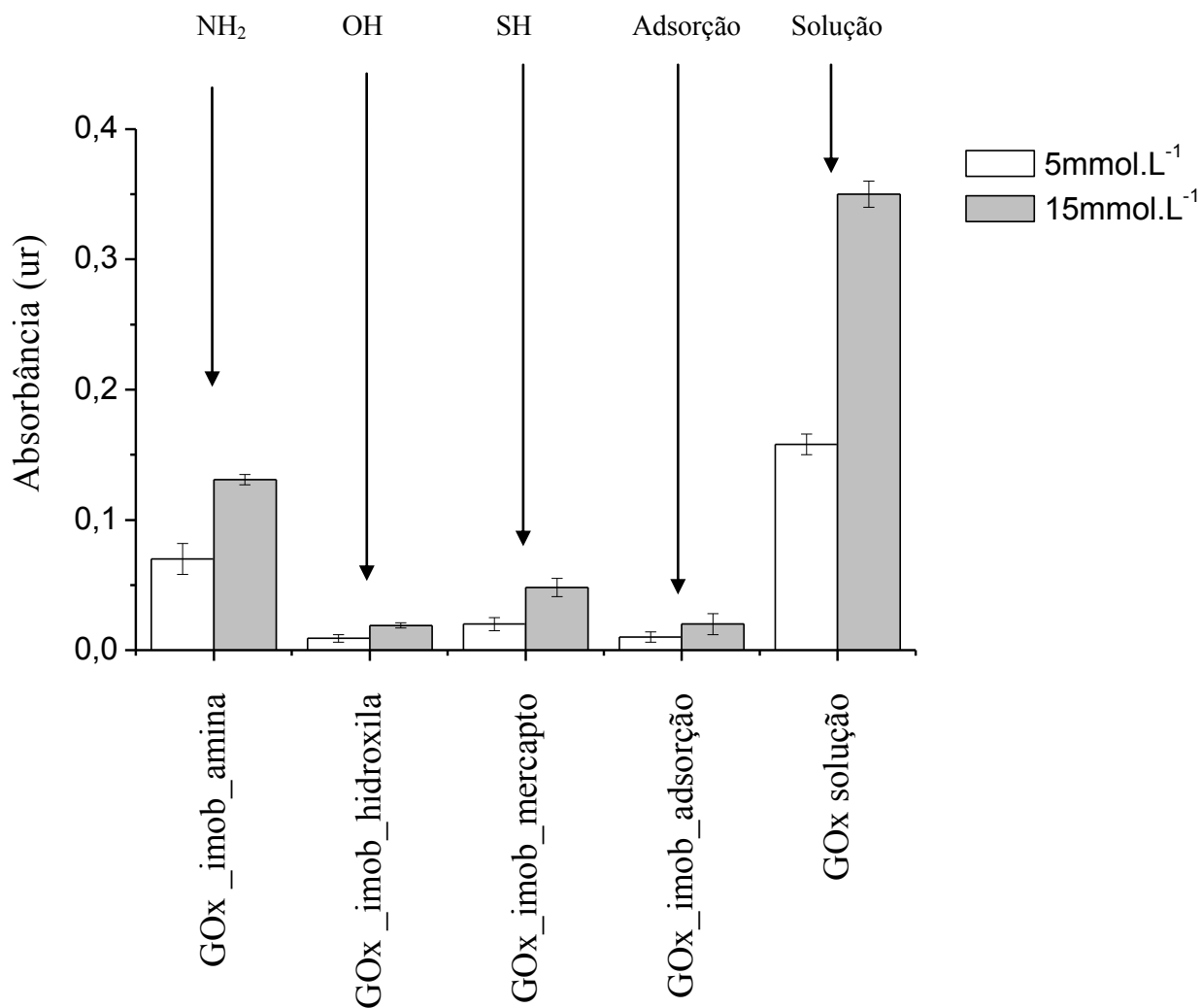


Figura 5.14 – Atividades enzimáticas, obtidas em 9 minutos para concentrações de glucose de 5mmol.L^{-1} e 15mmol.L^{-1} , para todas as estratégias de imobilização em suportes vítreos estudadas e monitoração das absorbâncias das enzimas em solução.

A partir dos resultados apresentados no gráfico 5.14 as seguintes considerações podem ser feitas:

- Há uma clara distinção entre as respostas obtidas nas concentrações de 5mmol.L^{-1} e 15mmol.L^{-1} , demonstrando a resposta dos biossensores construídos através das

imobilização covalente em diferentes grupos funcionais disponíveis na superfície do suporte sólido;

- Os valores da atividade enzimática para a enzima em solução foram superiores aos obtidos quando da enzima imobilizada. Dois fatores podem ser apontados para explicar este resultado:
 - uma quantidade de enzimas imobilizadas inferior àquela que foi utilizada em solução;
 - a enzima em solução possui a liberdade de se difundir dentro da solução, enquanto a enzima imobilizada tem óbvias restrições de movimento, o que provavelmente também reduz sua eficiência (LI et al., 2006).

- A adsorção da GOx manteve sua atividade enzimática, porém, em menor atividade se comparada com os dados obtidos quando da imobilização covalente. Uma possível explicação para o decréscimo da eficiência para este tipo de imobilização seria a remoção de enzimas no processo de limpeza a que são submetidas às amostras, após a etapa de incubação da enzima, ou mesmo durante o armazenamento da enzima adsorvida no suporte sólido em PBS (desorção). Esta remoção é possível já que as forças envolvidas neste tipo de imobilização são forças fracas, resultando numa relativa facilidade para que as enzimas imobilizadas possam se soltar do suporte sólido (LIU et al., 2006).

Comparando-se as estratégias de imobilização, a estratégia envolvendo a funcionalização com agente aminossilano (APTMS) foi a que produziu as maiores absorvâncias nas concentrações estudadas, indicando uma melhor eficiência da imobilização da enzima. Na verdade, o uso de suportes sólidos com funcionalização amino produziu resultados 5x maiores em relação a superfícies hidrofílicas ou àquelas sem funcionalização.

Baseando-se na hipótese que a etapa final de imobilização da enzima no suporte funcionalizado foi semelhante para todos os suportes funcionalizados com diferentes agentes silanos, ou seja, a interação da amina da GOx com o aldeído do glutaraldeído,

então, quando da comparação dos resultados obtidos das estratégias de imobilização da enzima em suportes funcionalizados, temos que a explicação para o sucesso, ou não, da imobilização deve estar relacionado com a interação do aldeído do glutaraldeído e o grupo funcional exposto na interface do suporte sólido. Diferente análise deve ser empregada para o suporte sem tratamento superficial, no qual a imobilização é promovida através de forças fracas, interações iônicas e interações hidrofóbicas, como já mencionado.

O glutaraldeído é altamente reativo à nucleófilos (HERMANSON, 2008). A reação esperada para o glutaraldeído com os grupos funcionais da superfície do suporte sólido está mostrada na Figura 5.15, onde a seta mostra o sentido de reação.

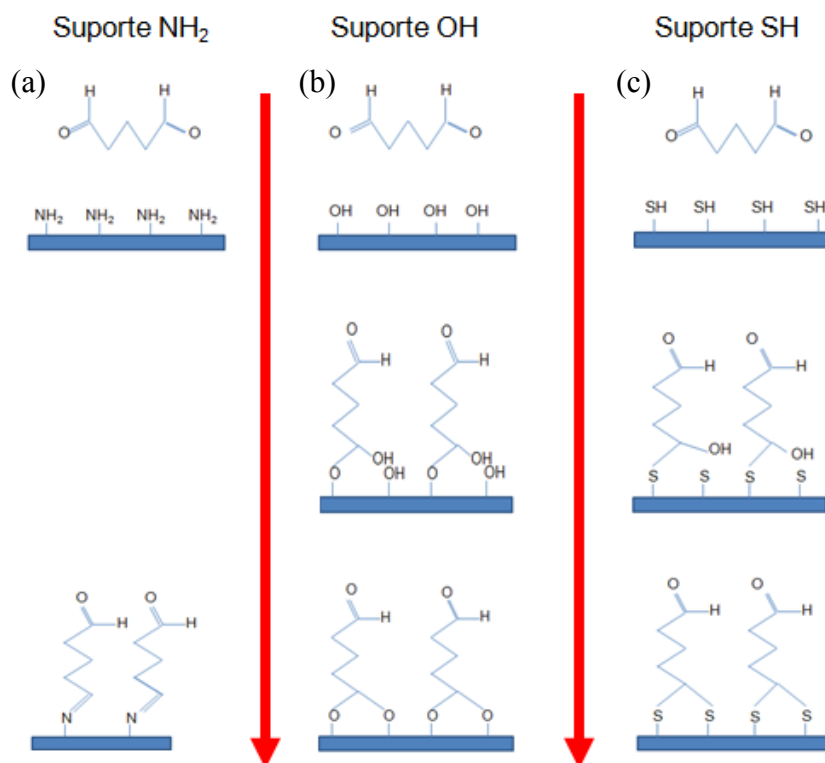


Figura 5.15 – Representação esquemática da reação esperada do glutaraldeído com os grupos funcionais das superfícies funcionalizadas amina (a), hidroxila (b) e tiol (c).

A nucleofilicidade está relacionada com a disponibilidade de pares de elétrons livres e com a eletronegatividade do elemento em questão. A disponibilidade de pares de elétrons não ligantes nos suportes sólidos em questão pode ser vista na Figura 5.16. Nas condições de

aplicação do glutaraldeído (pH) espera-se que os grupos funcionais amina, tiol e hidroxila estejam protonados.



Figura 5.16 – Representação esquemática das superfícies funcionalizadas quando da aplicação do glutaraldeído, funcionalização hidroxila (a), tiol (b) e amina (c).

Na imobilização na superfície com funcionalização tiol é possível que grupos tiol não reagidos possam interagir com os dois grupos tíois disponíveis na superfície da enzima ou induzir a quebra das pontes dissulfeto da glucose oxidase alterando sua estrutura tridimensional, com possível diminuição da afinidade (CONSTANTINO et al., 1998).

As menores absorvâncias obtidas para os suportes sólidos funcionalizados hidroxila podem estar relacionadas com a ausência de mobilidade da hidroxila. Enquanto a funcionalização APTMS e MPTMS provém um espaçador propil entre os grupos amina e tiol e o suporte sólido, proporcionando a possibilidade de rotação destes grupos, as hidroxilas estão ligadas ao suporte sólido sem a possibilidade de rotação, com isso as chances de ligação com o glutaraldeído são minimizadas.

5.3.1.1. Cinética Enzimática – Michaelis-Menten

A Figura 5.17 apresenta o gráfico obtido com os cálculos da formação de H₂O₂ em função do tempo, para a estratégia de imobilização da GOx em suporte sólido funcionalizado com agente modificador APTMS, através dos dados de absorvância. Há um incremento da concentração de H₂O₂ em função do tempo, devido à ação enzimática da GOx.

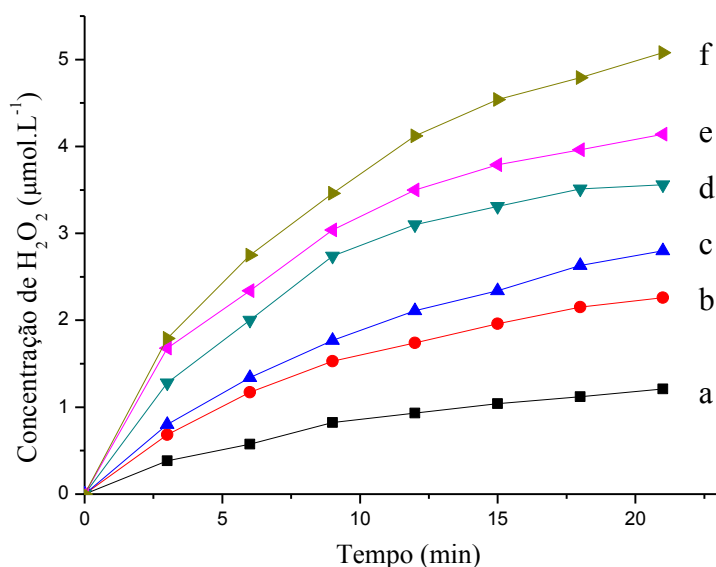


Figura 5.17– Formação de peróxido de hidrogênio x tempo para GOx imobilizada em suporte sólido NH_2 para as concentrações de glicose de 1mmol.L^{-1} (a), $2,5\text{mmol.L}^{-1}$ (b), 5mmol.L^{-1} (c), 10mmol.L^{-1} (d), 15mmol.L^{-1} (e) e 20mmol.L^{-1} (f).

Para a execução dos cálculos de formação de H_2O_2 foi utilizado o coeficiente de extinção de $3,9 \times 10^4$ ($\text{L}/[\text{mmol}^{-1}\text{cm}^{-1}]$) (RHEE et al., 2010; JOSEPHY et al., 1982), cada ponto da curva representa a média de duas leituras independentes, realizadas em menos de 48h de intervalo entre as mesmas. Procedimento similar foi empregado para cada tipo de suporte sólido com superfície modificada, bem como para o sólido não submetido à funcionalização de superfície.

Através de dados de formação do peróxido de hidrogênio foram realizadas os gráficos de velocidade de reação x tempo, necessários para os estudos de cinética enzimática, utilizando-se da parte linear de cada curva (tempo até 9 minutos). Os gráficos de velocidade de reação x tempo foram utilizados para a estimativa dos parâmetros do modelo Michaelis-Menten através do uso da ferramenta de análise de adesão à equação hiperbólica do software OriginPro 8. O uso da adesão à equação hiperbólica tem vantagens significativas sobre as aproximações lineares comumente usadas, já que as aproximações lineares se baseiam em premissas das incertezas que podem não ser atendidas pelos dados experimentais (MASON et al., 2000; CARVALHO et al., 2010).

As Figuras 5.18 a 5.22 apresentam os resultados da adequação dos dados obtidos ao modelo de Michaelis-Menten para GOx em solução e imobilizados em suportes com superfície modificada. O experimento de imobilização da GOx em suporte sólido com suporte funcionalizado amina foi duplicado para verificar a repetitividade do experimento.

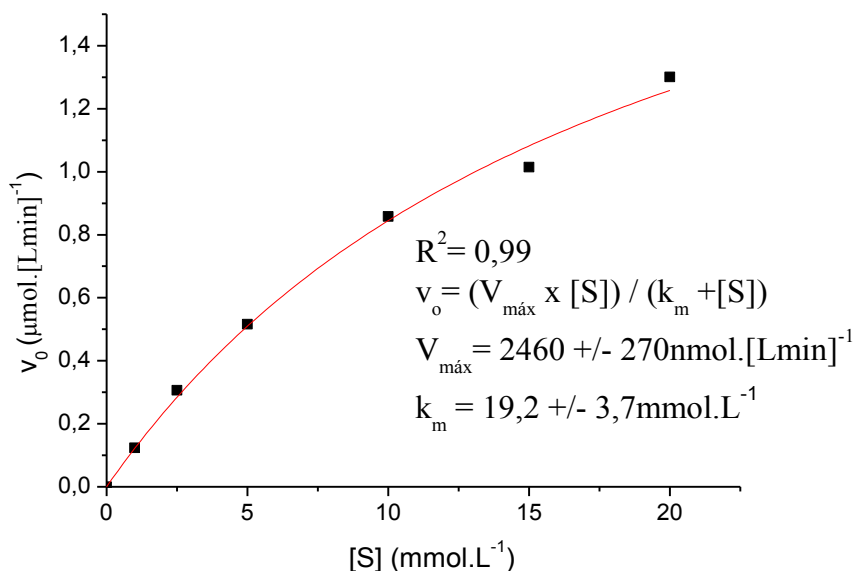


Figura 5.18 - Adequação dos resultados obtidos ao modelo de Michaelis-Menten para GOx em solução.

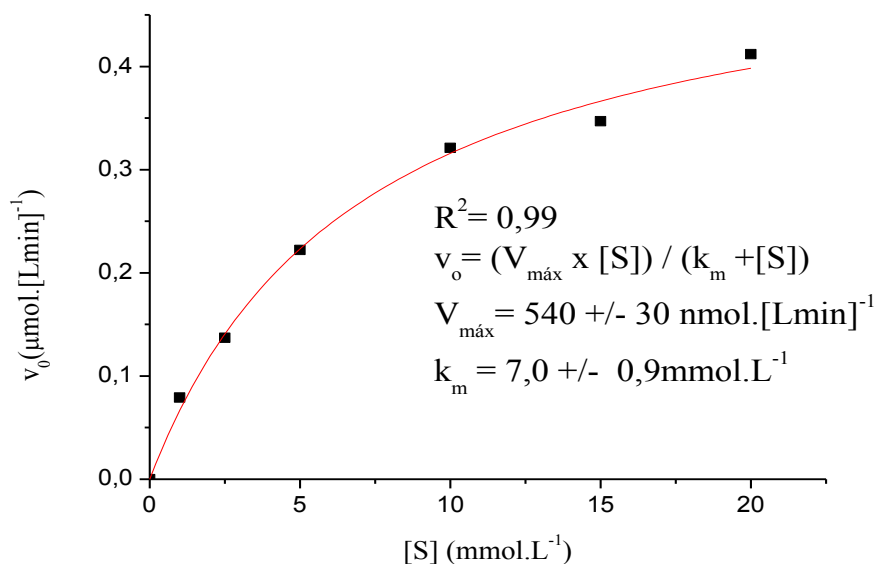


Figura 5.19 – Adequação dos resultados obtidos ao modelo de Michaelis-Menten da GOx imobilizada em suporte com funcionalização NH_2 – 1ª amostra.

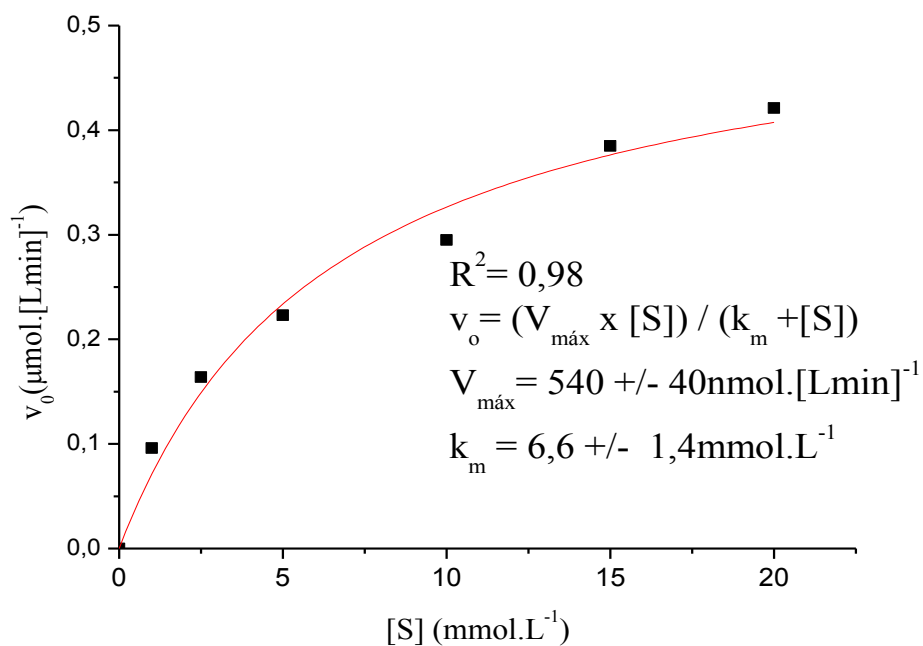


Figura 5.20 – Adequação dos resultados obtidos ao modelo de Michaelis-Menten da GOx immobilizada em suporte com funcionalização NH₂ – 2^a amostra.

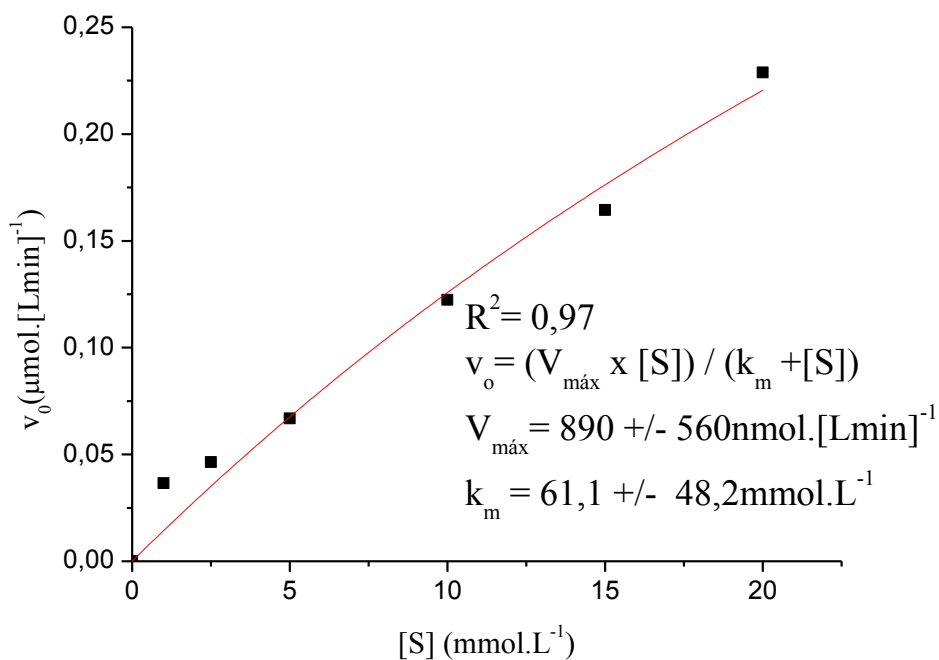


Figura 5.21 – Adequação dos resultados obtidos ao modelo de Michaelis-Menten da GOx immobilizada em suporte com funcionalização SH.

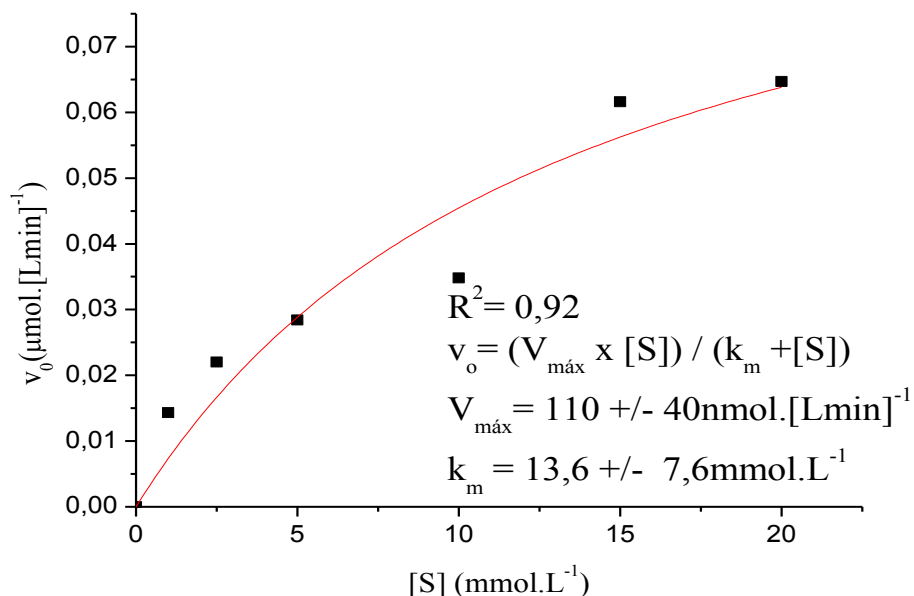


Figura 5.22– Adequação dos resultados obtidos ao modelo de Michaelis-Menten da GOx imobilizada em suporte com funcionalização OH.

Os parâmetros k_m e $V_{máx}$ da equação de Michaelis Menten podem ser representados através das equações 5.1 e 5.2 (GARRET e GRISHAM, 2009):

$$k_m = (k_{-1} + k_2) / k_1 \quad (\text{Equação 5.1})$$

$$V_{máx} = k_2 E_t \quad (\text{Equação 5.2})$$

Sendo:

E_t a quantidade total da enzima (soma das quantidade de enzima livre e da enzima contida no complexo enzima-substrato);

k_1 razão direta de formação do intermediário ES (conforme Equação 3.2);

k_{-1} razão reversa de formação do intermediário ES (conforme Equação 3.2);

k_2 razão de formação produto (conforme Equação 3.2).

Para processos onde a reação $E + S \rightarrow ES$ é mais frequente que a reação $ES \rightarrow E + P$, temos que $k_2 < k_{-1}$. Nestas condições a constante k_m pode ser determinada

aproximadamente pela equação 5.3, sendo uma **indicação da afinidade da enzima pelo substrato**.

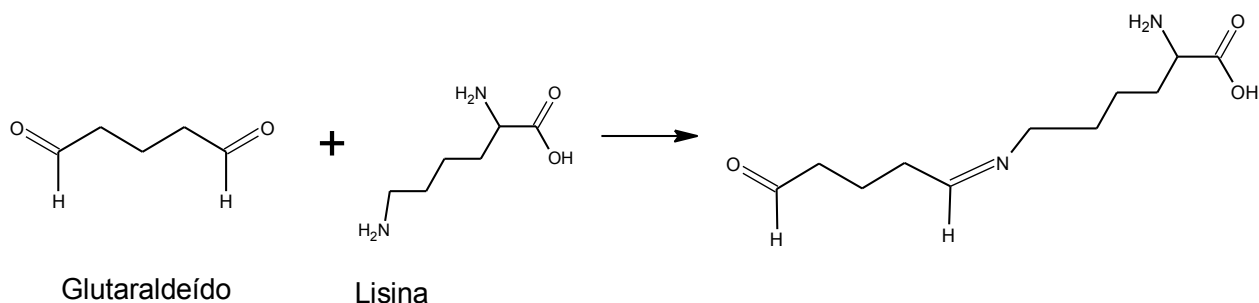
$$k_m = (k_{-1}) / k_1 \quad (\text{Equação 5.3})$$

Analisando os parâmetros de Michaelis-Menten obtidos para a GOx em solução e imobilizada em suportes sólidos:

- O valor encontrado da constante k_m no experimento com GOx em solução foi de $19,2 \text{ mmol.L}^{-1}$. Este valor está coerente com valor relatado por UKEDA e colaboradores. (1998), que realizaram experimentos em condições similares aos dos experimentos aqui relatados (pH=7,2). É importante ressaltar que apesar de existirem valores distintos na literatura, outras condições de pH são empregadas (OZYILMAX et al., 2005; ELÇIN e AKBULUT, 1982);
- Na comparação dos resultados de k_m para a enzima em solução com os valores obtidos para a enzima imobilizada, vemos que o resultado da enzima imobilizada em suporte sólido amina e em suporte sólido hidroxila apresentaram menores valores, indicando um acréscimo da afinidade da enzima pelo substrato para estas imobilizações. Efeitos semelhantes de melhora de afinidade após imobilização de enzimas também foram relatados por YAGAR e colaboradores (2008), PANDEY e colaboradores (2007) e SVOBODOVÁ e colaboradores (2002), onde se relata a influência de microambientes na atividade enzimática. Tais efeitos podem estar relacionados com mudanças no pH no microambiente causados pela interação com o suporte sólido, interações de atração ou repulsão com o substrato ou produto.

É possível que variações destes valores possam estar também relacionadas a mudanças conformacionais induzidas pela imobilização. Como temos 30 resíduos lisina, que são preferenciais para ligação com os aldeídos do glutaraldeído, distribuídos na estrutura da GOx (MOSSAVARALI et al, 2006; HOSSEINKHANI et al., 2004), mudanças conformacionais podem ser induzidas em função da localização e quantidade de resíduos utilizados na imobilização, inclusive com imobilização

multiponto, alterando a flexibilidade conformacional (RUSMINI et al., 2007; KÖHM, 2009). A Figura 5.23 apresenta a ligação do glutaraldeído com o aminoácido lisina com a formação de uma base Schiff.



A Figura 5.23– Representação da ligação do glutaraldeído com o aminoácido lisina com a formação de uma base Schiff.

- Comparando-se os resultados referentes aos dois experimentos independentes de imobilização de GOx em suportes sólidos com funcionalização amina, podemos notar a concordância dos valores das constantes do modelo de Michaelis-Menten. Os valores centrais de $V_{\text{máx}}$ foram semelhantes: $540 \text{ nmol} \cdot (\text{L} \cdot \text{min})^{-1}$. Os valores de k_m estão coerentes quando observarmos as margens de erro estabelecidas pelo modelamento ($7,0 \pm 0,9$) $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ para a 1º experimento e ($6,6 \pm 1,4$) $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ para a 2º experimento.

Comparando-se resultados obtidos nas imobilizações de GOx em suportes sólidos vítreos com funcionalização amina, hidroxila e tiol com o auxílio da Tabela V.3:

Tabela V.3 – Estimativa dos parâmetros de Michaelis-Menten para a imobilização de GOx em suportes sólidos com funcionalização amina, tiol e hidroxila

Estratégia de funcionalização	$V_{\text{máx}}$ (nmol.[L.min] ⁻¹)	k_m (mmol.L ⁻¹)
Amina	540 +/- 40	6,6 +/- 1,4
Tiol	890 +/- 560	61,1 +/- 48,0
Hidroxila	110 +/- 40	13,6 +/- 7,6

- Na imobilização na superfície com funcionalização tiol já foi citada a possível reação dos tióis não reagidos na superfície com grupos tióis da enzima;
- Na imobilização na superfície com funcionalização hidroxila as hipóteses já levantadas (ligações oxigênio-silício na superfície da amostra) implicariam numa adsorção não específica que poderia trazer resultados não repetitivos pela relativa facilidade que as enzimas imobilizadas podem se soltar do suporte sólido, o que explicaria a aparente perda de afinidade e a grande dispersão de k_m observada (LIU et al., 2006);
- Realizando a comparação das velocidades, que nos dariam uma indicação da quantidade de enzimas imobilizadas, temos que a imobilização em suporte com funcionalização tiol produziu valores de $V_{m\acute{a}x}$ que tenderiam a nos apontar para um maior número de enzimas imobilizadas para esta funcionalização, em comparação com as demais imobilizações covalentes. Esta hipótese não tem correspondência nos resultados de absorvância apresentados na Figura 5.14, onde a GOx imobilizada em suporte com funcionalização amina apresentou resultados superiores aos da GOx imobilizada em suporte com funcionalização tiol. A explicação para este fato está no alto valor de k_m obtido para a imobilização tiol, que indica que a enzima imobilizada nesta estratégia apenas atingirá seu valor máximo em uma concentração de substrato maior, como pode ser visto na Figura 5.24.

As curvas contidas no gráfico da Figura 5.24 foram obtidas pela aplicação da equação de Michaelis-Menten utilizando-se dos valores $V_{m\acute{a}x}$ e k_m resultantes do modelamento dos dados experimentais. Pode-se notar que para valores inferiores a aproximadamente 75mmol.L^{-1} temos que a velocidade da estratégia de imobilização utilizando-se de suporte sólido amina é maior do que a do suporte tiol, explicando a causa das maiores absorvâncias obtidas com a funcionalização amina em 5mmol.L^{-1} e 15mmol.L^{-1} em comparação com a funcionalização tiol.

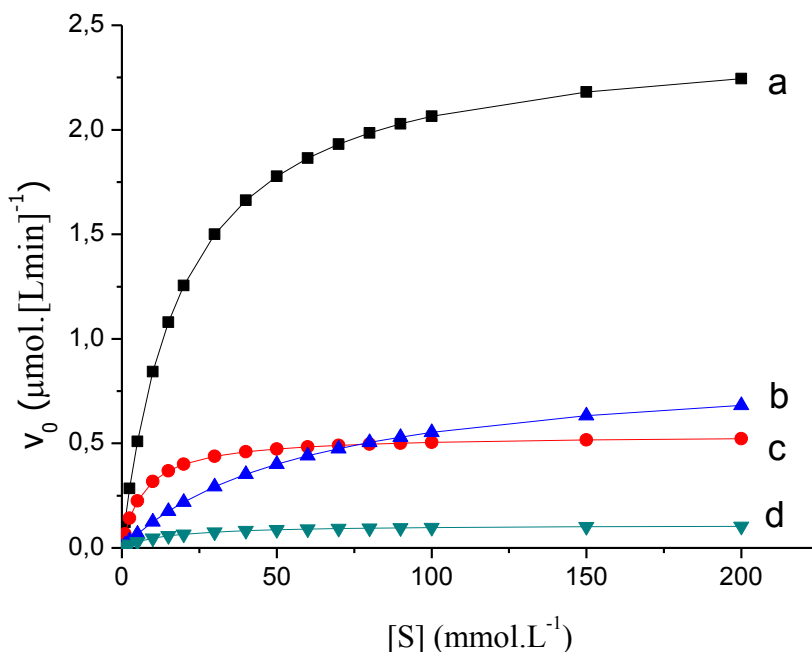


Figura 5.24- Curvas de velocidade inicial de reação x concentração do substrato obtidas para a GOx em solução (a) e das três estratégias de imobilização estudadas: imobilização em suporte sólido tiol (b), imobilização em suporte amino (c) e imobilização em suporte hidroxila (d), utilizando-se a equação de Michaelis-Menten e os parâmetros obtidos no modelamento.

5.3.1.2. Curvas de Absorbância x Concentração para a Produção de Biossensores

A Figura 5.25 apresenta os gráficos da absorbância obtidos após 3 minutos de reação, para cada concentração de substrato e para cada estratégia de imobilização, este tempo foi escolhido para que os resultados fossem obtidos na região linear da curva v_0 x tempo, obtidos nos experimentos realizados. Para que fosse garantida a sensibilidade ao substrato este foi limitado ao valor de k_m pela imobilização da GOx em cada suporte sólido modificado para a realização dos cálculos da regressão linear e estimativa da equação de resposta do biossensor.

Como pode ser visto, há uma razoável correlação com o modelo linear, com $R^2 = 0,96$ para o suporte funcionalizado com OH, $R^2 = 0,98$ para o substrato funcionalizado com NH_2 e R^2

= 0,98 para o suporte funcionalizado SH, indicando a possibilidade do uso destes sistemas para uso da detecção de glucose através de espectroscopia UV-Vis e de aproximação linear para aplicações em que os erros encontrados possam ser acomodados.

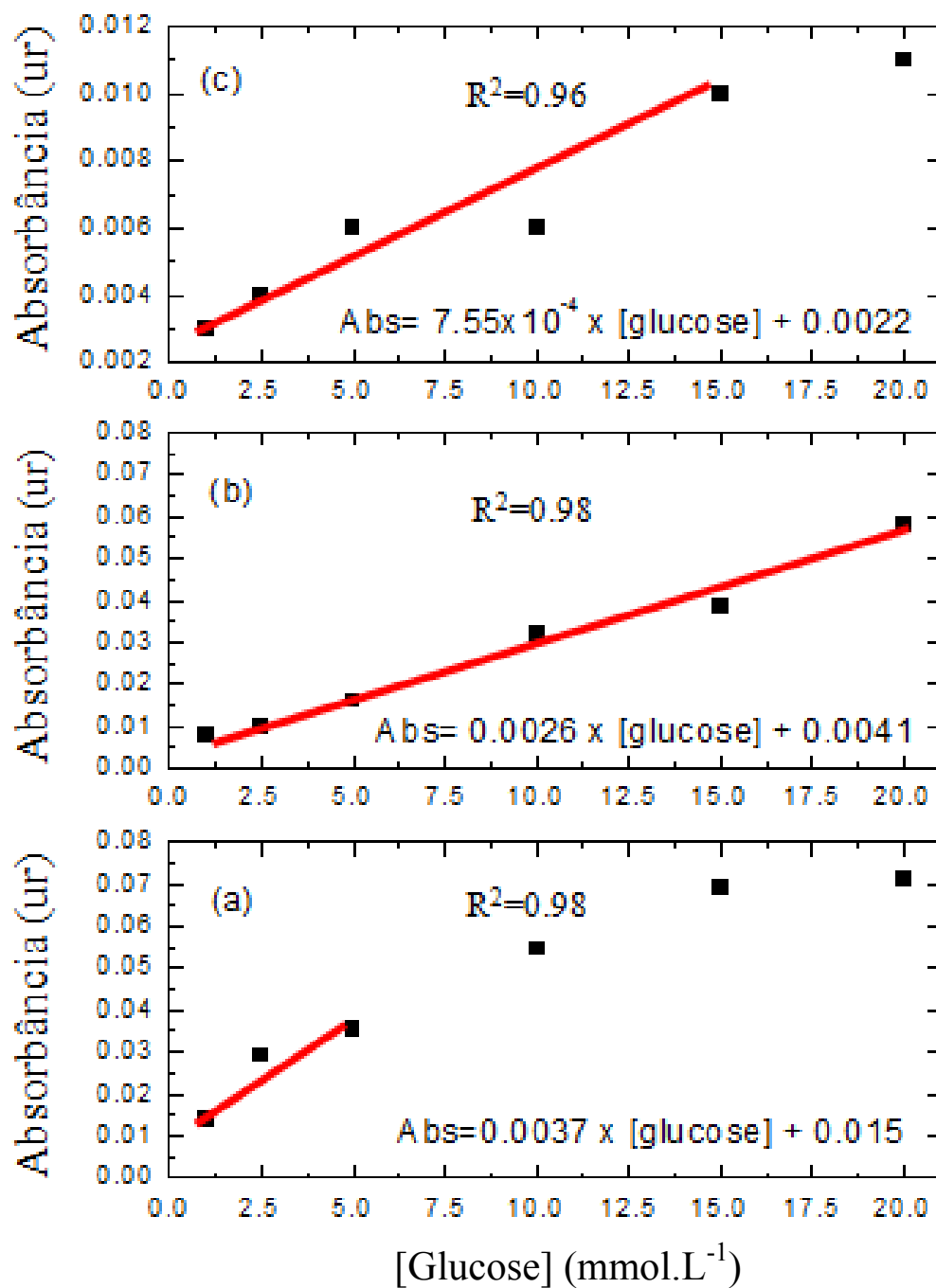


Figura 5.25 – Curvas de absorbância x concentração do substrato obtidas com a GOx imobilizada em substratos com funcionalização NH₂ (a), SH (b) e OH (c).

5.3.2. Imobilização da Proteína Glucose Oxidase em Microplacas com Superfície Modificada com Grupos Amina

O uso de microplacas com funcionalização amina foi decorrente dos resultados da imobilização em suportes vítreos. A estratégia de adsorção também foi avaliada por ser comum nas atividades de laboratório.

A estratégia de imobilização em microplacas possui vantagens quando comparamos a imobilização em suportes vítreos e medidas por espectroscopia UV-Vis:

- é possível obter superfícies com a funcionalização requerida direto do fabricante;
- os volumes empregados das soluções para análise da reação são muito menores;
- permite a leitura de várias amostras simultâneas, facilitando o aumento significativo do número de amostras utilizadas nos experimentos;
- a velocidade das leituras no leitor de absorvância é maior que a do espectrômetro.

Nesta avaliação foi acrescentada a avaliação da enzima GOx biotinizada, necessária para a estratégia de construção das estruturas enzimáticas nanoestruturadas multicamadas a ser adotada. Isto se deve ao fato que ligações biotina-avidina serão empregadas na construção das mesmas.

5.3.2.1. Avaliação da Atividade Enzimática

Na Figura 5.26 podem ser vistas as absorvâncias obtidas para concentrações de glucose de 5mmol.L^{-1} e 15mmol.L^{-1} , no tempo de 9 minutos, para a GOx e GOx-biot imobilizadas em microplacas e em solução.

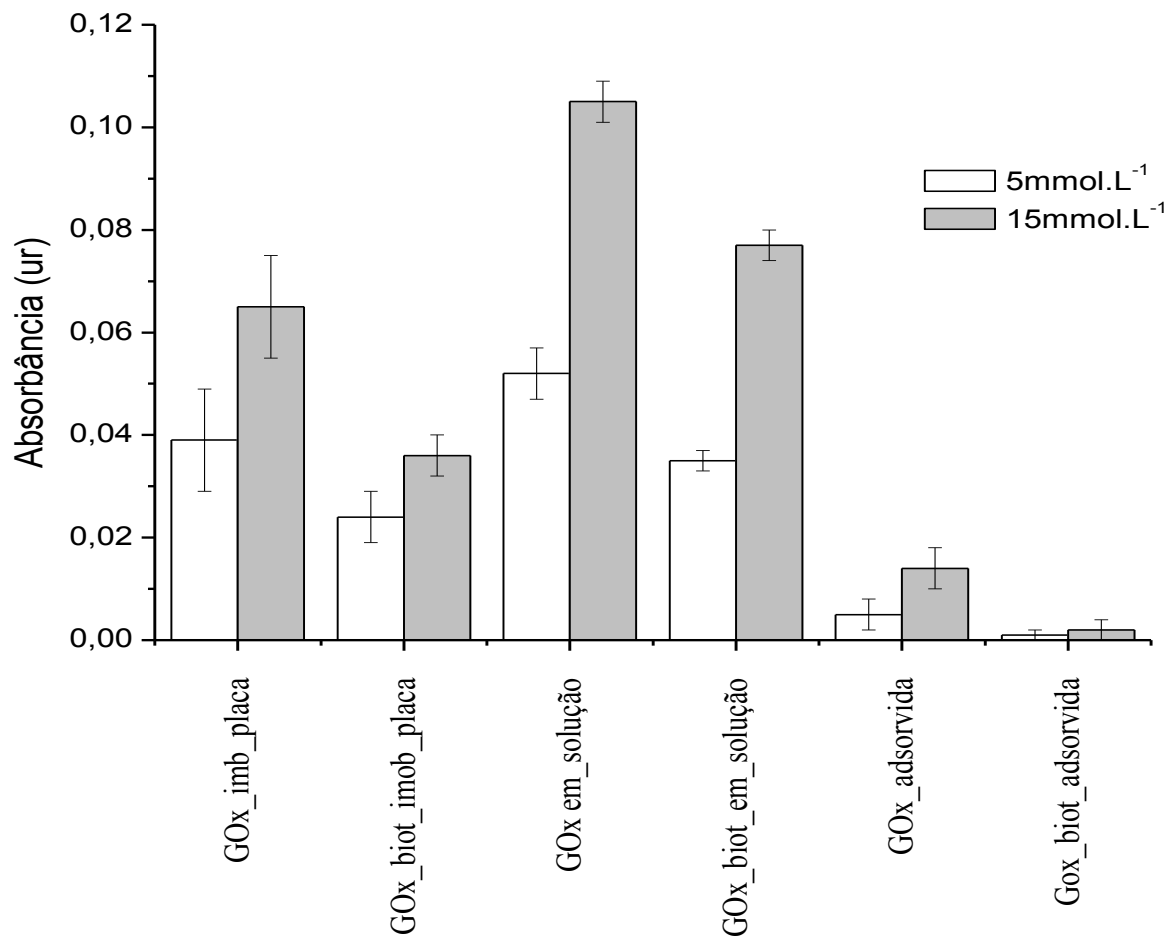


Figura 5.26 - Valores de atividade enzimática em microplaca para concentrações de glicose de 5mmol.L⁻¹ e 15mmol.L⁻¹ (tempo = 9 minutos).

Através dos dados apresentados as seguintes considerações podem ser feitas:

- A imobilização da GOx em microplacas manteve a atividade enzimática das enzimas;
- Novamente os dados obtidos com a estratégia de imobilização com suporte funcionalizado amina apresentaram maiores resultados de atividade enzimática se comparados ao da estratégia de adsorção, por razões já discutidas;

- A imobilização da GOx-biot em microplacas também manteve a atividade enzimática das enzimas. Um esperado decréscimo da atividade enzimática da GOx-biot (40% em relação à GOx, tomando-se a estratégia de imobilização com suporte amina como referência) foi observado. A redução ou mesmo a inativação da enzima submetida ao processo de biotinação já foi relatada em diversos trabalhos (SHRAY et al., 1985). Também na imobilização por adsorção houve uma menor absorvância da GOx biotinizada. As possíveis causas para a menor absorvância da GOx biotinizada podem estar relacionadas:
 - Durante o processo de biotinação a NHS-biotina se liga através das amins da GOx, formando amidas. Com isso há um consumo das amins disponíveis na GOx, conforme pode ser visto na Figura 5.27. Este consumo faz com que, quando imobilização da enzima biotinizada, um menor número de grupos amina esteja disponível para a ligação com o glutaraldeído, podendo assim dificultar a imobilização e diminuir a densidade de enzimas no suporte sólido (HERMANSON, 2008);

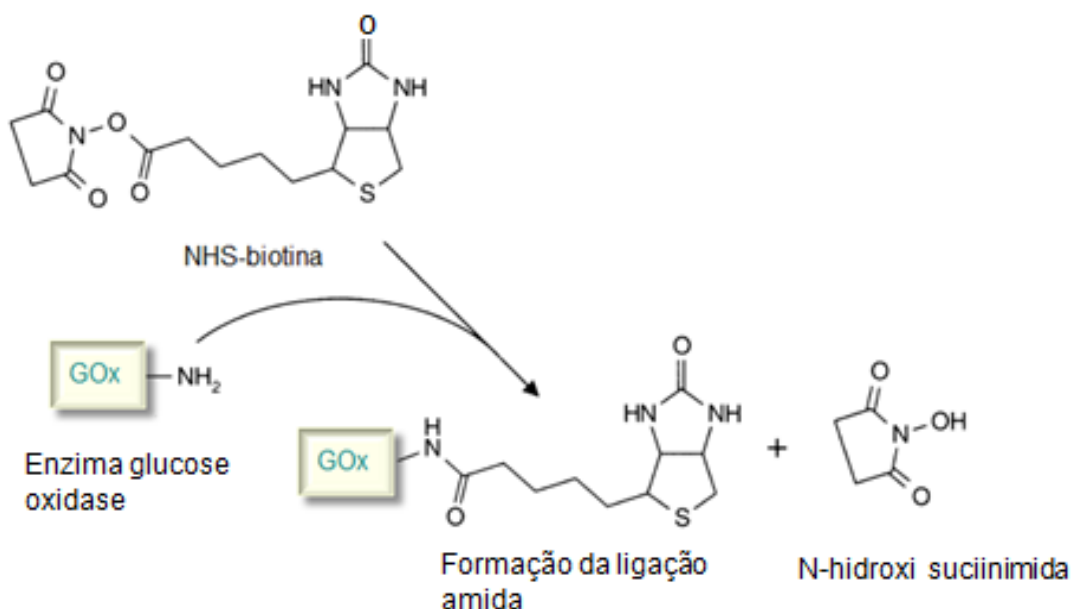


Figura 5.27– Esquema proposto da ligação entre a NHS-biotina e a enzima glucose oxidase (Adaptado de HERMANSON, 2008).

- Várias moléculas de NHS-biotina poderiam estar ligadas a diferentes grupos amina da GOx, impedindo o acesso do substrato (glucose) ao sítio ativo da enzima (restrição estérica), conforme apresentado esquematicamente na Figura 5.28;

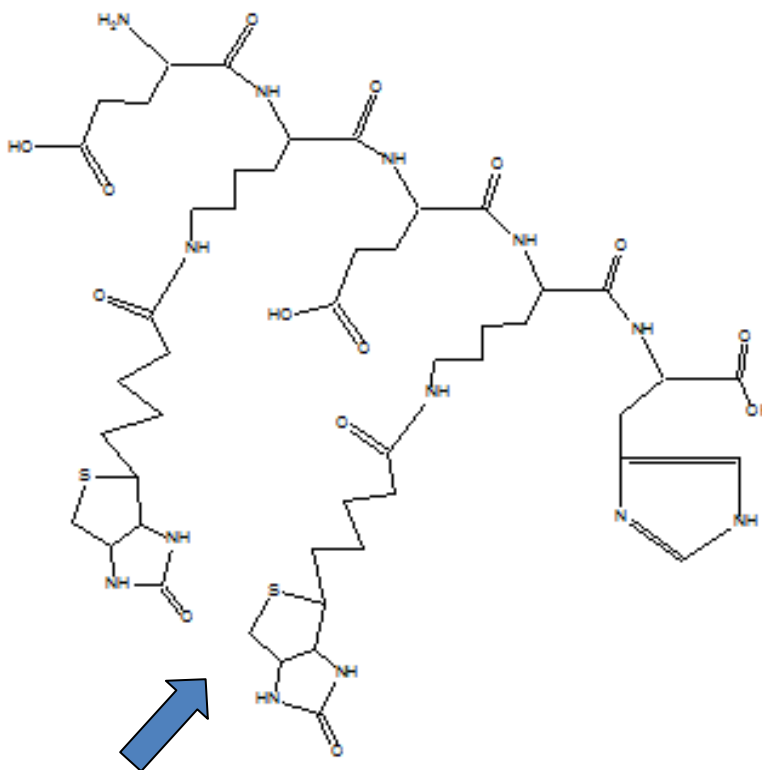


Figura 5.28– Representação esquemática de uma cadeia peptídica com restrição estérica pela ligação da biotina com aminoácidos lisinas. A seta mostra o local onde foi simulada uma possível restrição estérica do substrato a um aminoácido ácido glutâmico.

No gráfico da Figura 5.29 é apresentado um comparativo entre os valores de absorbância, em um tempo de 9 minutos, obtidos da imobilização da GOx (em suportes vítreos e em microplacas) e para a mesma enzima em solução (na cubeta e na microplaca). Os valores de absorbâncias foram corrigidos para caminhos ópticos equivalentes.

Pode-se notar uma coerência entre os valores de atividade enzimática da enzima em solução para os dois métodos. Para a enzima imobilizada nota-se que os valores de absorbância apresentados na microplaca são maiores que aqueles apresentados pelo suporte vítreo.

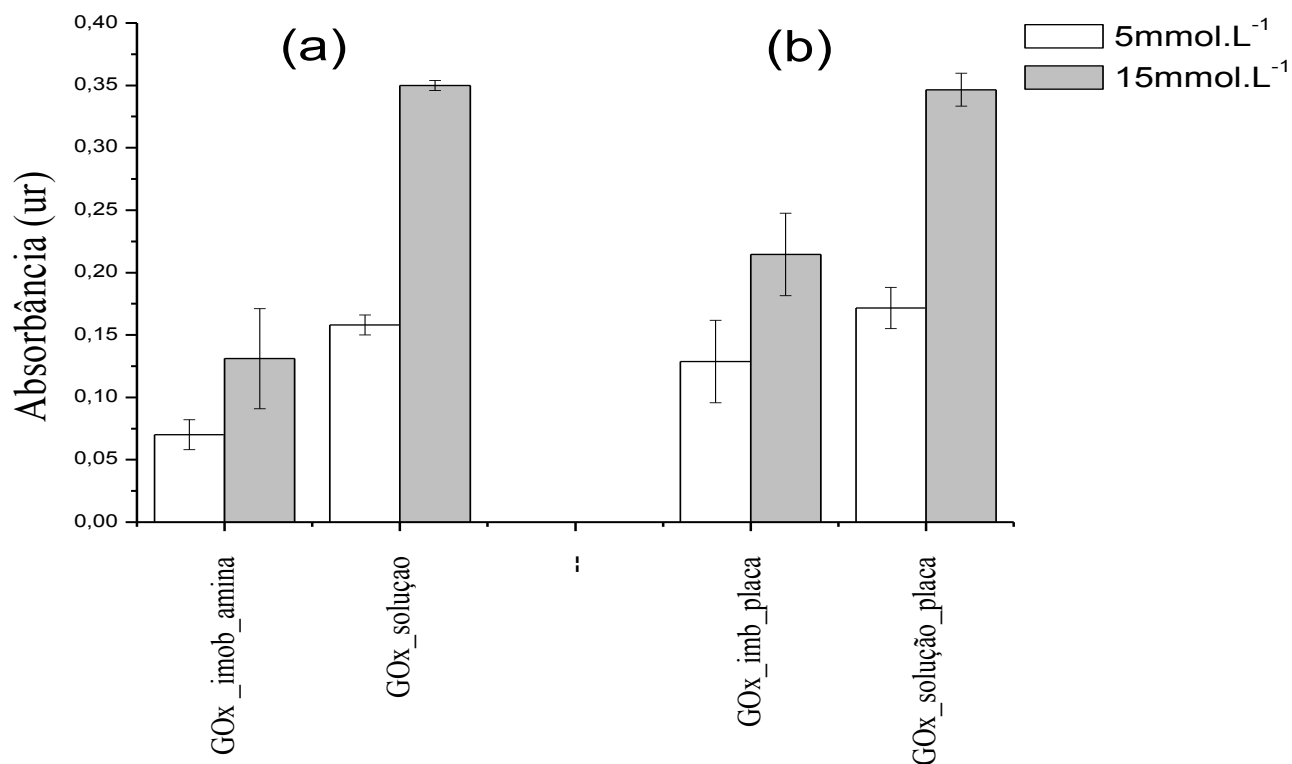


Figura 5.29 – Comparativo das atividades enzimáticas obtidas em 9 minutos para concentrações de glicose de 5mmol.L⁻¹ e 15mmol.L⁻¹ da GOx imobilizada em suporte vítreo e em solução com reação na cubeta de quartzo (a) e imobilização e reação em cavidades de microplacas (b) utilizando a correção do caminho óptico.

5.3.2.2. Cinética Enzimática – Michaelis-Menten

As Figuras 5.30 a 5.33 apresentam os gráficos de Michaelis-Menten para a imobilização em microplacas com superfície funcionalizada amina e em solução.

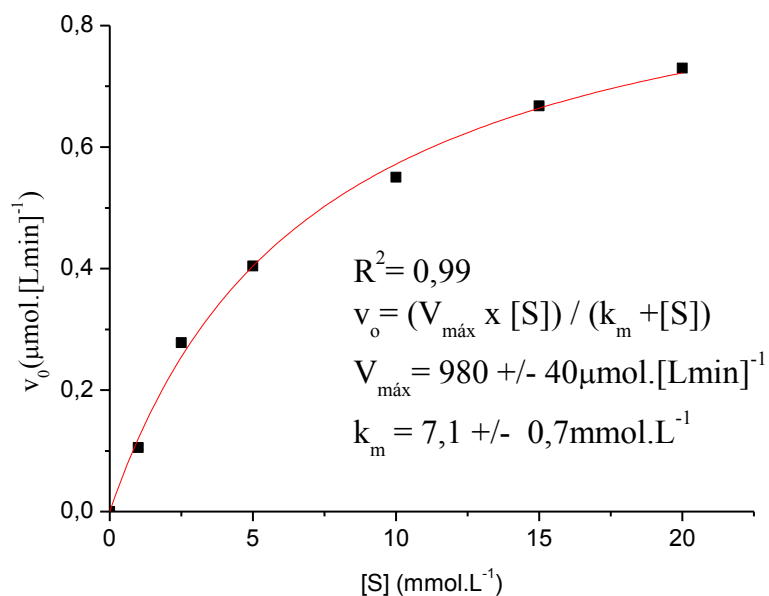


Figura 5.30 - Adequação dos resultados obtidos ao modelo de Michaelis-Menten da GOx imobilizada em microplaca com funcionalização NH_2 .

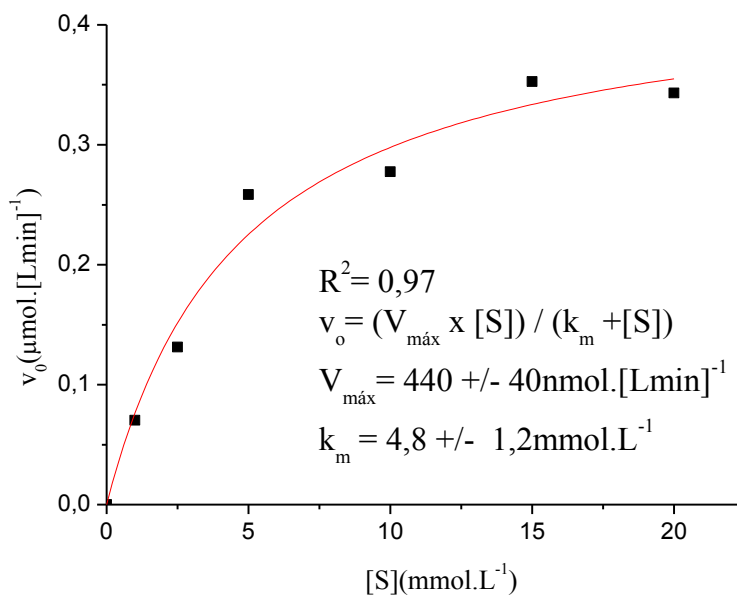


Figura 5.31 - Adequação dos resultados obtidos ao modelo de Michaelis-Menten da GOx-biot imobilizada em microplaca com funcionalização NH_2 .

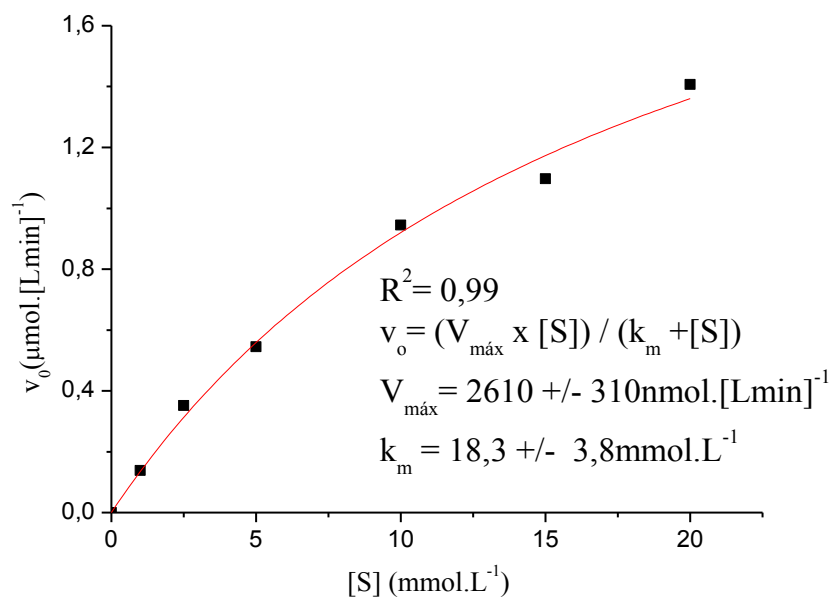


Figura 5.32 - Adequação dos resultados obtidos ao modelo de Michaelis-Menten da GOx em solução em microplaca.

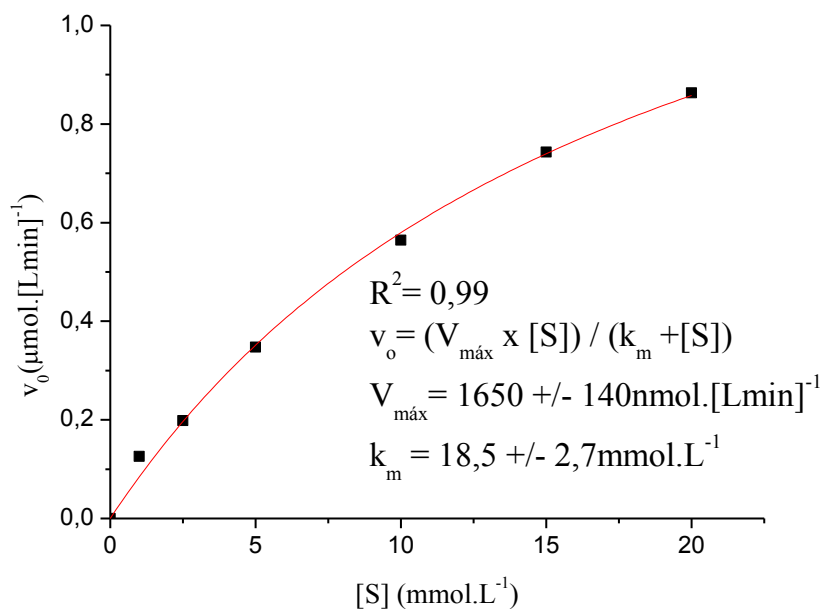


Figura 5.33 - Adequação dos resultados obtidos ao modelo de Michaelis-Menten da GOx-biot em solução em microplaca.

As imobilizações da GOx e da GOx-biot em microplacas produziram resultados de cinética enzimática consistentes com o modelo de Michaelis-Menten, com valores de aderência de 97 e 99%.

Tomando como referência os dados de k_m , quando comparamos os dados obtidos da GOx nos experimentos com imobilização em suporte vítreo com aqueles feitos em placas de titulação temos uma boa concordância de valores, como pode ser visto na Tabela V.4.

Tabela V.4– Comparação dos parâmetros de Michaelis-Menten para GOx imobilizada ou em solução para os sistemas suporte vítreo/cubeta de quartzo e placas de titulação

Estratégia	$V_{m\acute{a}x}$ (nmol.[Lmin] ⁻¹)	k_m (mmol.L ⁻¹)
Imobilização GOx em suporte vítreo	540 +/- 40	6,6 +/- 1,4
Imobilização GOx em microplaca	980 +/- 40	7,1 +/- 0,7
GOx em solução cubeta de quartzo	2460 +/- 270	19,2 +/- 3,7
GOx em solução microplaca	2610 +/- 310	18,3 +/- 3,8

Através destes dados podemos retirar as seguintes informações:

- A imobilização nos dois tipos de suporte sólido apresentaram valores de k_m coerentes;
- Analisando-se os resultados das enzimas em solução para as duas estratégias, vemos que os valores de k_m e $V_{m\acute{a}x}$ são equivalentes, se levarmos em consideração as suas margens de erro;
- Comparando-se os valores de k_m para as enzimas em solução com os das enzimas imobilizadas, temos uma redução de k_m para as enzimas imobilizadas nas duas estratégias. A discussão da diminuição de k_m quando da imobilização já foi feita anteriormente (condições de microambiente, no item 5.3.1.1).

Comparando-se os dados obtidos da GOx e GOx-biot nos experimentos feitos em placas de titulação e com o auxílio da Tabela V.5, podemos extrair as seguintes informações:

Tabela V.5 – Comparação dos parâmetros de Michaelis-Menten para GOx e GOx-biot utilizando-se de placas de titulação

Estratégia	$V_{\text{máx}}$ (nmol.[Lmin] ⁻¹)	k_m (mmol.L ⁻¹)
Imobilização GOx em microplaca	980 +/- 40	7,1 +/- 0,7
Imobilização GOx-biot em microplaca	440 +/- 40	4,8 +/- 1,2
GOx em solução microplaca	2610 +/- 310	18,3 +/- 3,8
GOx-biot em solução na microplaca	1650 +/- 140	18,5 +/- 2,7

- A diminuição de $V_{\text{máx}}$ observado quando da comparação da GOx-biot em relação a GOx em solução foi também observada quando da sua imobilização. Porém a redução de $V_{\text{máx}}$ em solução foi de aproximadamente 35%, enquanto comparando as enzimas imobilizadas a GOx-biot apresentou uma redução de $V_{\text{máx}}$ de aproximadamente 55% em relação a GOx. Com estes dados é razoável supor que a imobilização de enzimas biotinizadas foi em menor número que o da enzima sem biotinizacão;
- Comparando-se os valores de k_m para as enzimas em solução com os das enzimas imobilizadas, tem-se uma redução de k_m . A adição da biotina não alterou este comportamento, como foi visto anteriormente;
- Os valores de k_m para as enzimas em solução foram bastante consistentes. Porém quando temos a imobilização da GOx com e sem biotinizacão, esta última apresenta um menor valor de k_m . A adição da biotina pode estar criando situações de microambiente favoráveis.

5.3.2.3. Curvas de Absorbância x Concentração para a Construção de Biossensores

As Figuras 5.34 e 5.35 apresentam os gráficos da absorbância obtidos após 3 minutos de reação, para cada concentração de substrato e para cada tipo de enzima imobilizada.

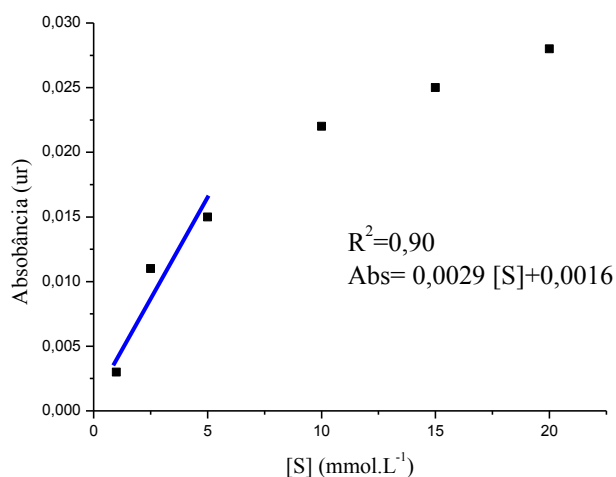


Figura 5.34 – Curva de absorbância x concentração do substrato para a imobilização de GOx em microplaca amina.

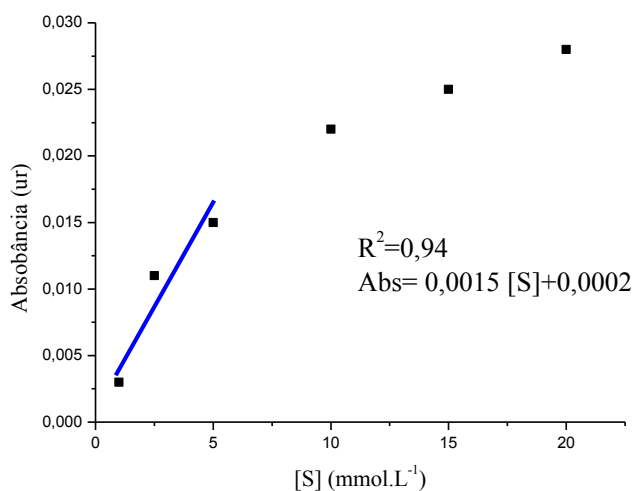


Figura 5.35 – Curva de absorbância x concentração do substrato para a imobilização de GOx-biot em microplaca amina.

Como pode ser visto, ainda há uma razoável correlação com o modelo linear, com $R^2 = 0,90$ para a GOx e com $R^2 = 0,94$ para a GOx-biot indicando a possibilidade destes sistemas para uso da detecção de glucose através de espectroscopia UV-Vis e de

aproximação linear, para aplicações que possam acomodar os erros obtidos. Entretanto, se compararmos os resultados da imobilização da GOx obtidos neste experimento com aqueles obtidos na imobilização em suportes vítreos (item 5.3.1.3), nota-se que esta aproximação é menos eficiente, fruto de uma melhor adequação dos dados obtidos em placas de titulação à equação hiperbólica descrita pelo modelo de Michaelis-Menten.

5.4. Estruturas Nanométricas Bienzimáticas

5.4.1. Atividade Enzimática

Os resultados de atividade enzimática da exposição da estrutura GOx-biot/HRP-biot e HRP-biot/GOx-biot em tampão PBS (pH=7,4), usando concentrações de 1mmol.L^{-1} e 15mmol.L^{-1} de glucose e tempo de reação de 50 minutos podem ser observados nas Figura 5.36 e 5.37. Também nestas figuras estão os resultados do teste de comparação das médias, utilizando um nível de confiança de 95% ($\alpha = 5\%$), confirmando a diferença estatística entre as leituras em diferentes concentrações.

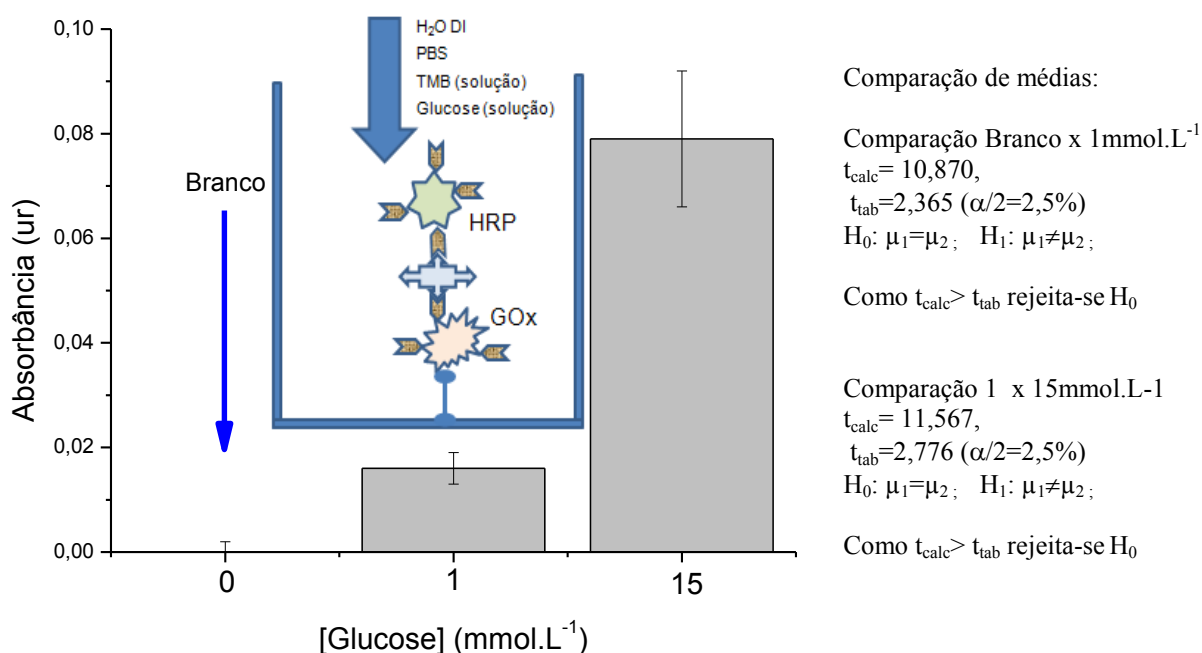


Figura 5.36 – Atividades enzimáticas para o branco e para concentrações de 1mmol.L^{-1} e 15mmol.L^{-1} de glucose utilizando-se a Estrutura GOx-biot/HRP-biot ($t = 50\text{minutos}$).

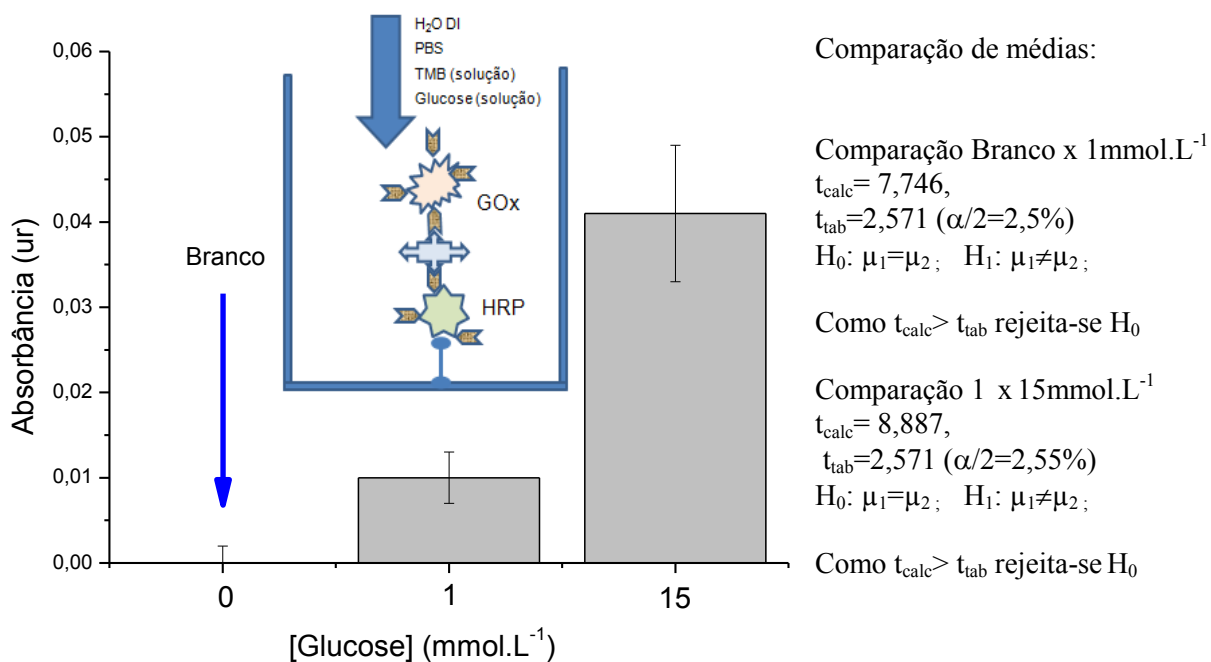


Figura 5.37– Atividades enzimáticas para o branco e para concentrações de 1mmol.L⁻¹ e 15mmol.L⁻¹ de glucose para a Estrutura HRP-biot/GOx-biot ($t = 50$ minutos).

Pode-se observar que a construção dos sistemas nanoestruturados baseados nas cascatas bienzimáticas apresentaram atividade biocatalítica com adição de substrato glucose, demonstrando que as duas nanoestruturas bienzimáticas foram construídas com sucesso. Além disso, é possível afirmar, baseado na comparação estatística das médias, que as nanoestruturas apresentaram resposta dependente da concentração do substrato, possibilitando a utilização potencial em biossensores.

A representação esquemática das reações em cascata de ambas as estruturas está contida na Figura 5.38. Para melhor comparação entre as atividades enzimáticas apresentadas pelas duas nanoestruturas, a Figura 5.39 apresenta os seus resultados em um mesmo gráfico, juntamente com a análise estatística comparando a resposta entre as nanoestruturas nas concentrações estudadas.

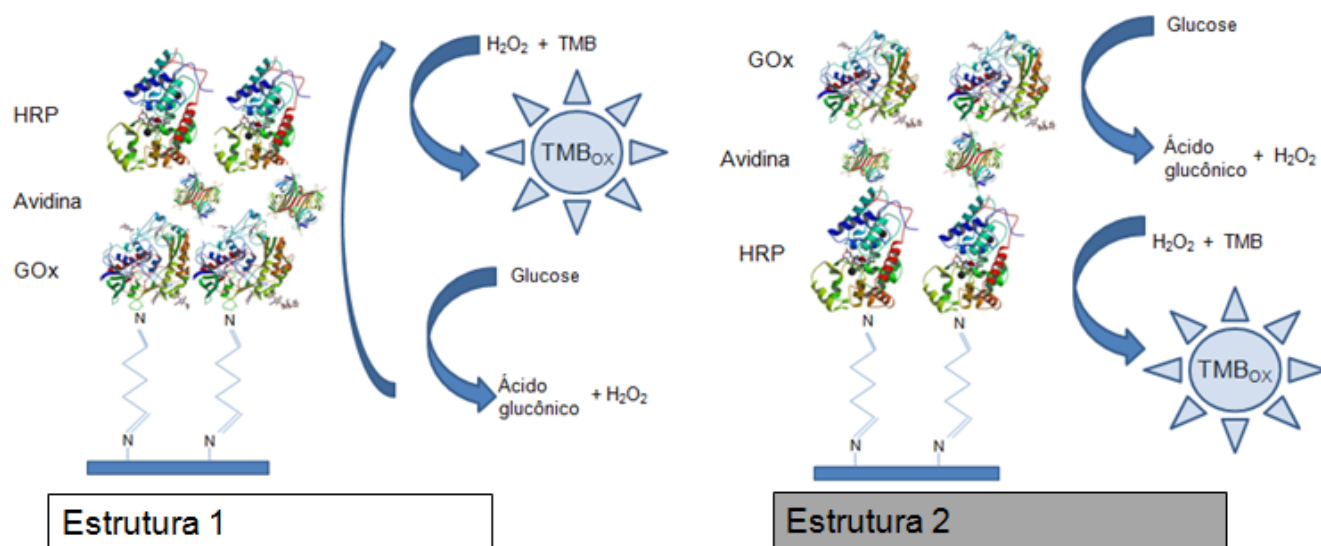


Figura 5.38 – Representação esquemática das reações em cascata das estruturas bienzimáticas estudadas

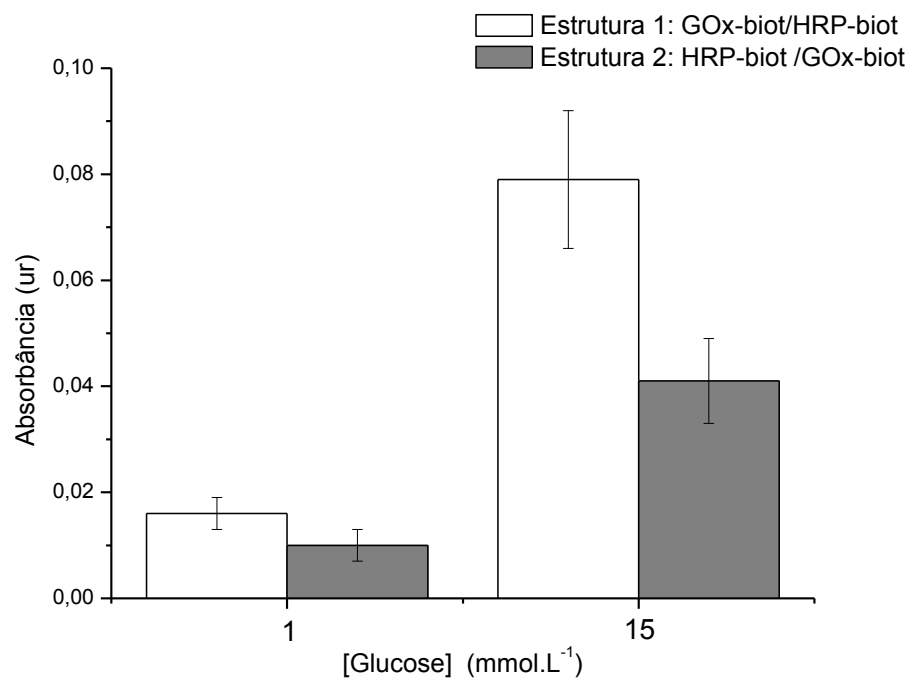


Figura 5.39 – Comparação entre os atividades enzimáticas obtidas nas Estruturas GOx-biot/HRP-biot e HRP-biot/GOx-biot para concentrações de 1mmol.L⁻¹ e 15mmol.L⁻¹ de glucose (t = 50minutos).

Realizando comparação dos resultados de ambas as estruturas, com o auxílio da Figura 5.39, pode-se observar que as atividades enzimáticas foram dependentes da posição relativa de cada enzima na estrutura tridimensional desenvolvida. A Estrutura GOx-biot/HRP-biot apresentou respostas cerca de 1,7 vezes maiores do que aquelas obtidas com a Estrutura HRP-biot/GOx-biot. Este comportamento é um somatório global dos efeitos difusionais na solução e entre as enzimas, estratégia de imobilização (pH e agente de imobilização) e pH do meio. Estes fatores influenciam diretamente as enzimas e o microambiente (FU et al., 2012; SONDEGAARD et al., 2008; OZYILMAZ et al., 2004; SVOBODOVÁ et al., 2002; SU e KLINMAN, 1999; ELÇIN e AKBULUT, 1982). É importante ressaltar que a diferença na resposta bioquímica entre as duas nanoestruturas alternadas, e bem definidas, demonstra a dependência **topológica** do sítio ativo em sistemas de cascatas multienzimáticas.

Pode-se atribuir os resultados a uma série de fatores:

A - Relacionando os resultados com os efeitos difusionais:

- Comparando-se a disponibilidade de glucose para que tenhamos a atividade da GOx, a Estrutura HRP-biot/GOx-biot tenderia a ser mais favorável a esta atividade. A enzima está em contato íntimo com o substrato, havendo maior possibilidade de que haja a atividade enzimática, como pode ser visto na Figura 5.40. Já na Estrutura GOx-biot/HRP-biot, teremos a necessidade da difusão da glucose através das camadas de HRP-biot e avidina. Como os resultados de absorbância da Estrutura GOx-biot/HRP-biot/foram maiores que o da estrutura HRP-biot/GOx-biot, temos que a disponibilidade da glucose não explica os resultados obtidos. A mesma análise pode ser feita com a disponibilidade do O₂. Estas afirmações levam a atentar para a atividade da nanoestrutura bienzimática em relação à atividade da HRP.

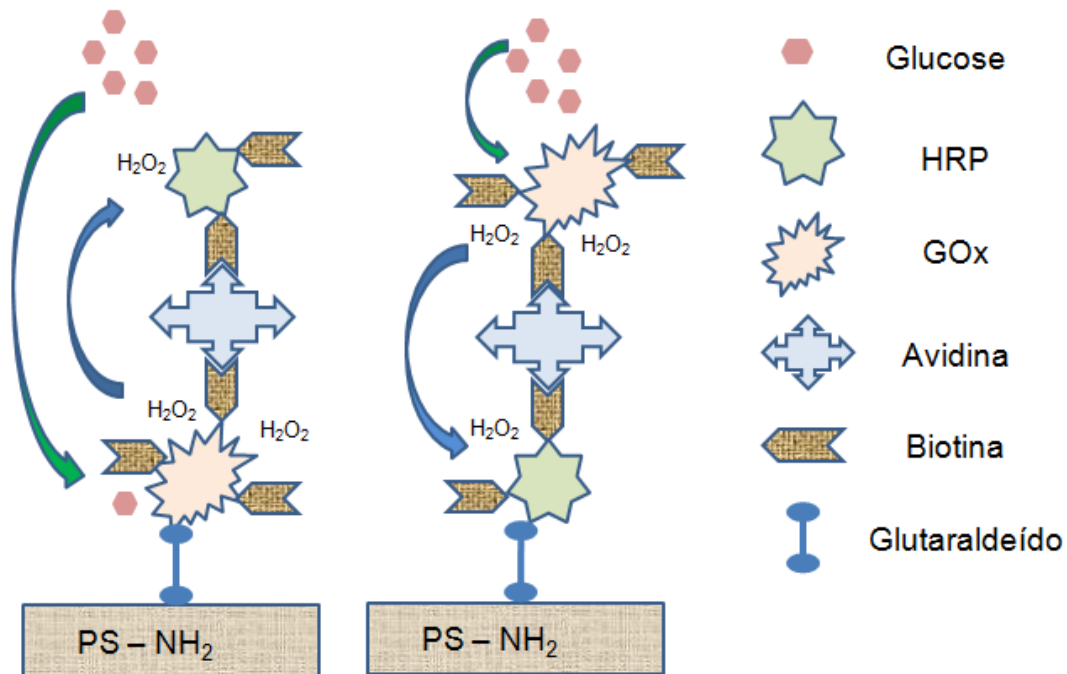


Figura 5.40 – Comparação entre as duas estruturas bienzimáticas em relação ao fluxo de substrato glucose.

- Uma possível variável a ser analisada é a difusão do peróxido de hidrogênio. Iniciando a análise através da primeira lei de Fick, apresentada na equação 5.4, com a simplificação de análise do fluxo somente na direção “x”, tem-se que o fluxo de matéria, no caso em estudo é o substrato peróxido de hidrogênio, está ligado à diferença de concentrações do substrato (MALPIECE, 1980).

$$J_x = -D \frac{\partial[S]}{\partial x} \quad (\text{Equação 5.4})$$

Sendo:

J o fluxo do elemento;

D o coeficiente de difusão do elemento no meio;

[S] a concentração do elemento.

O sinal negativo mostra que o fluxo flui no sentido de diminuir os gradientes de concentração. Realizando a análise somente a partir desta equação é possível sugerir que em se utilizando do suporte sólido como condição limítrofe é razoável assumir que o volume confinado entre a GOx e este suporte terá uma diferença de

concentração menor que aquela no volume superior, compreendendo da GOx até a superfície do líquido da cavidade, em ambas as estruturas. Dentro destas premissas, é também razoável assumir que a direção superior deve ser a mais provável para o fluxo de peróxido de hidrogênio. A Figura 5.41 mostra as duas estruturas estudadas, assinalando em ambas um plano de referência para a análise das concentrações de substrato na direção “x”, de onde também é tomada a referência para os sentidos inferior ou superior.

Porém nesta análise temos duas limitações: a primeira lei de Fick assume um estado estacionário, onde o fluxo do elemento em análise é constante, e não foi levada em consideração a atividade enzimática como mecanismo de alteração da concentração do substrato.

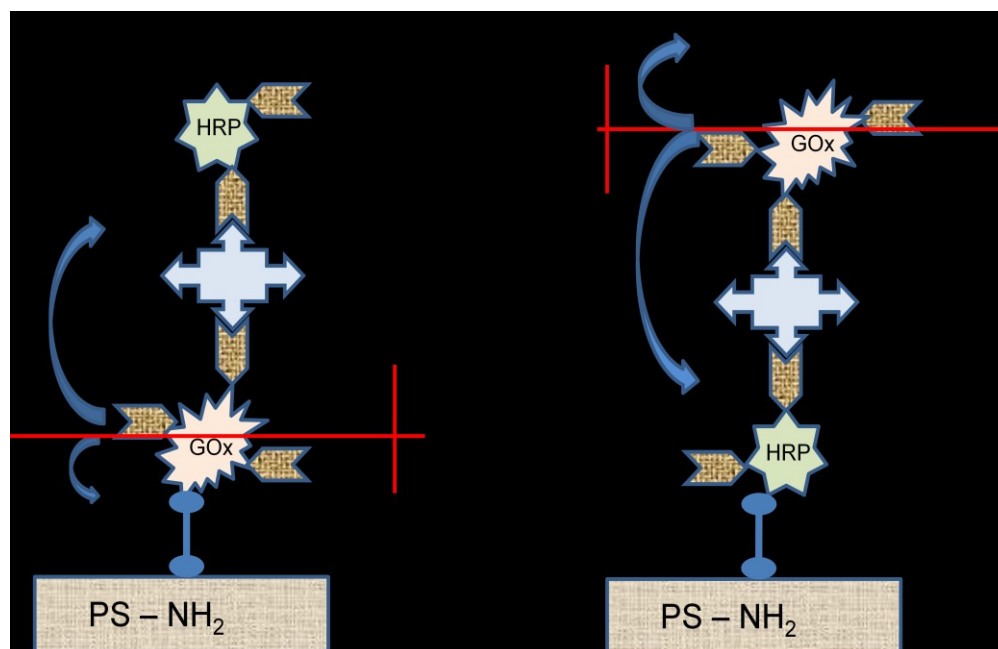


Figura 5.41 – Possíveis direções de difusão do peróxido de hidrogênio nas Estruturas GOx-biot/HRP_biot e HRP-biot/GOx-biot.

Uma análise mais apurada para o caso das concentrações do peróxido de hidrogênio deve levar os fenômenos difusionais em condições transitórias e também a ação enzimática sobre este substrato. MALPIECE e colaboradores (1980) apresentam o detalhamento diferencial para este situação, a análise se inicia pelo modelamento da

concentração do substrato em um elemento de volume próximo a enzima, partindo da premissa que ela está ativa, obtendo-se a equação 5.5:

$$\frac{\partial[S]}{\partial t} = \frac{\partial[S]}{\partial t}_{\text{difusão}} + \frac{\partial[S]}{\partial t}_{\text{ação enzimática}} \quad (\text{Equação 5.5})$$

Detalhando os termos constituintes da equação 5.5, temos as equações 5.6 e 5.7;

$$\frac{\partial[S]}{\partial t}_{\text{difusão}} = D_s \frac{\partial^2[S]}{\partial x^2} \quad (\text{Equação 5.6})$$

A equação 5.6 é a equação da segunda lei de Fick e é aplicada para situações onde o fluxo de matéria não é constante. Já a equação 5.7 descreve a atividade enzimática a partir do modelo de Michaelis-Menten.

$$\frac{\partial[S]}{\partial t}_{\text{ação enzimática}} = - \frac{V_{\text{máx}}[S]}{k_m + [S]} \quad (\text{Equação 5.7})$$

Substituindo as equações 5.6 e 5.7 na equação 5.5 é possível obter a equação 5.8:

$$\frac{\partial[S]}{\partial t} = D_s \frac{\partial^2[S]}{\partial x^2} - \frac{V_{\text{máx}}[S]}{k_m + [S]} \quad (\text{Equação 5.8})$$

Analisando a equação 5.8 e assumindo que as atividades enzimáticas da peroxidase (segundo termo da equação) imobilizada nas Estruturas GOx-biot/HRP-biot e HRP-biot/GOx-biot são semelhantes, ou seja retirando possíveis diferenças devidas a posição relativa, novamente temos que o mecanismo de difusão dependerá do gradiente de concentração. Tendo estas premissas, é razoável assumir que a direção superior deve ser a mais provável para o fluxo de peróxido de hidrogênio. Esta direção preferencial do peróxido de hidrogênio é favorável ao sistema da Estrutura

GOx-biot/HRP-biot, já que ele vai em direção a HRP. Ainda analisando a Estrutura GOx-biot/HRP-biot, temos que volume superior não possui barreiras difusionais significativas, que já que o empilhamento dos componentes da estrutura não forma uma estrutura densa e compacta.

Os resultados apresentam resultados compatíveis com a análise da difusão do peróxido de hidrogênio. Adicionalmente podemos dizer que a atividade da oxidação do TMB fica facilitado na Estrutura GOx-biot/HRP-biot, já que nesta configuração a HRP está em uma posição mais favorável. A HRP está em contato íntimo com o substrato, havendo maior possibilidade de que haja a atividade enzimática, sem a necessidade de difusão do TMB na estrutura, semelhante à análise feita sobre a disponibilidade de glucose para a GOx.

B – Relacionando os resultados com a posição ocupada na estrutura pela enzima

- Outra possibilidade é que a posição que a molécula esteja sendo influenciada pela sua posição relativa na estrutura como, por exemplo, a GOx sendo imobilizada na primeira camada tem comportamento diferente em relação ao seu comportamento quando imobilizada na segunda camada, e que o grau de influência seja diferente para as diferentes enzimas. Tais mudanças de comportamento podem estar associadas a diferentes condições de microambiente.

5.4.2. Reprodução da Construção das Estruturas

Para verificar a exequibilidade da reprodução da construção das estruturas bienzimáticas estudadas, foram produzidas novas amostras. A comparação dos resultados obtidos (utilizando-se a concentração de 15mmol.L^{-1} de glucose e tempo de reação de 50 minutos), entre os novos resultados e aqueles já apresentados no item 5.4.1 estão apresentados nas Figuras 5.42 e 5.43.

Os testes de média apontaram para a **não** existência de diferenças estatisticamente significantes, o que demonstra a possível replicação das estruturas.

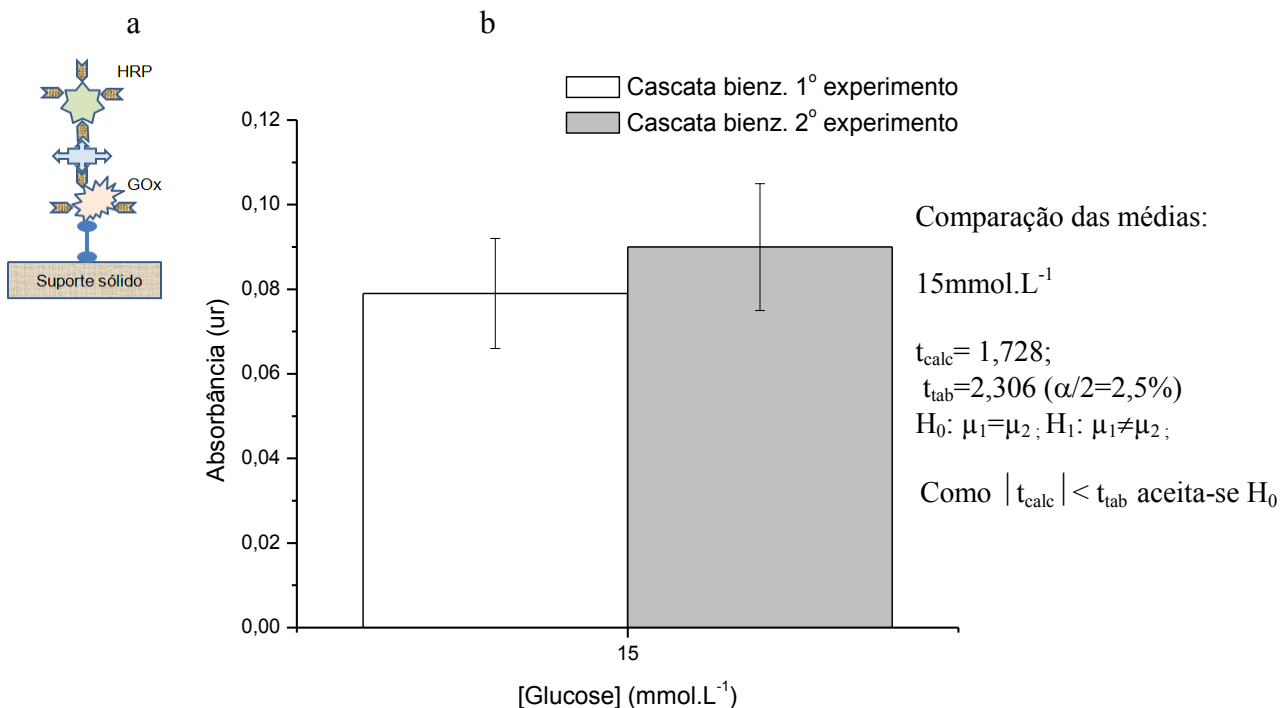


Figura 5.42 – Representação esquemática (a) e atividades enzimáticas da avaliação da cascata bienzimática da estrutura GOx-biot/HRP-biot em diferentes experimentos (b).

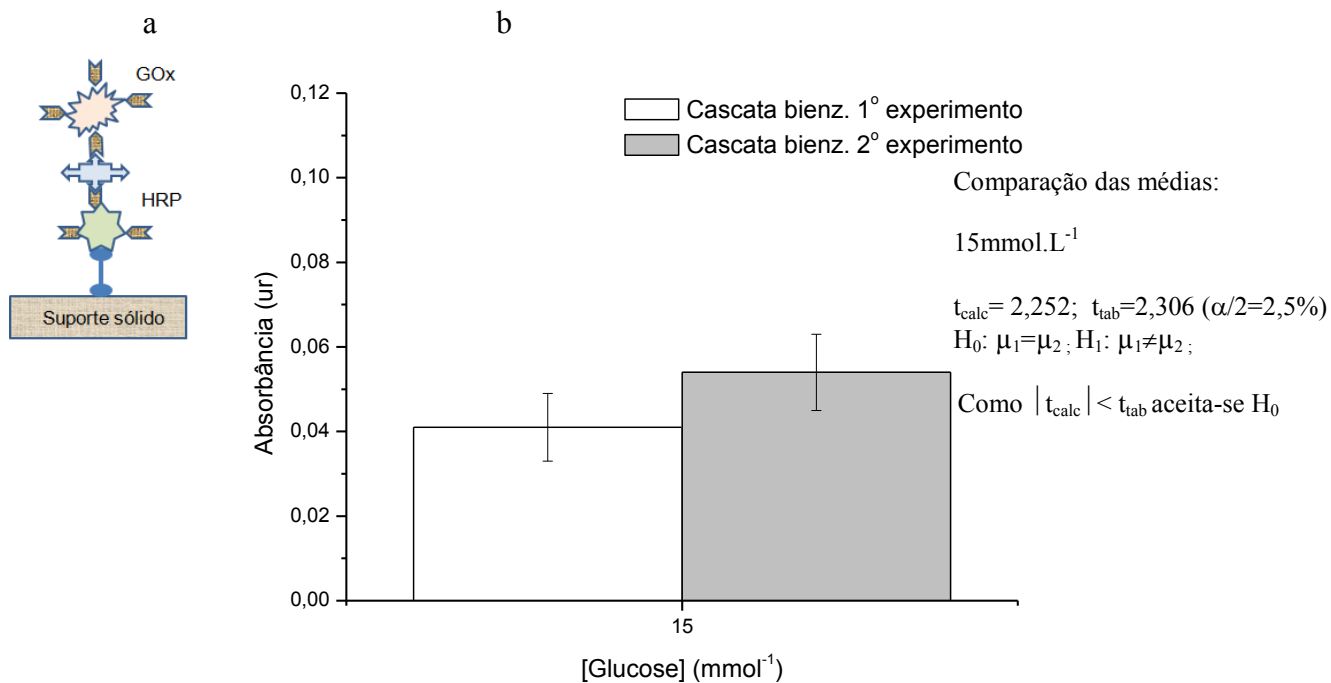


Figura 5.43 – Representação esquemática (a) e atividades enzimáticas da cascata bienzimática da estrutura HRP-biot/GOx-biot em diferentes experimentos (b).

5.4.3. Ciclos de Biocatálise Enzimática

Ambas as estruturas foram submetidas a múltiplos ciclos de exposição ao substrato, conforme pode ser visto através da Figura 5.44, desta vez com um tempo de 30 minutos, (para a Estrutura GOx-biot/HRP-biot) e da Figura 5.45 (para a Estrutura HRP-biot/GOx-biot).

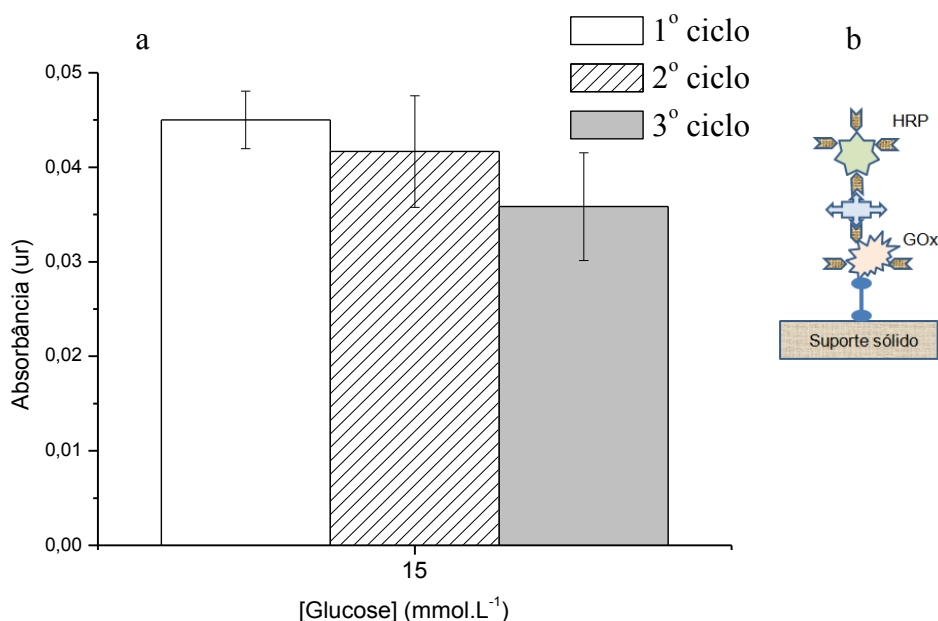


Figura 5.44 – Atividades enzimáticas obtidas em três ciclos de exposição da Estrutura GOx-biot/HRP-biot à uma concentração de glicose de 15mmol.L^{-1} por um tempo 30 minutos (a) e representação esquemática da estrutura (b).

Os resultados do gráfico da Figura 5.44, quando da aplicação de testes estatísticos para comparação de médias, **não** apresentam diferenças estatisticamente significativas entre as leituras de absorbância entre o primeiro e segundo ciclos. No entanto, há diferença entre os valores de absorbância obtidos entre o primeiro e terceiro ciclos. Houve uma queda de absorbância de 20% entre o primeiro e terceiro ciclos.

Analisando a reutilização da Estrutura HRP-biot/GOx-biot, ver Figura 5.45, temos uma queda média de absorbância de aproximadamente 48% entre o primeiro e segundo ciclos. A aplicação de substrato no terceiro ciclo não apresentou resposta significativa (maior que o branco).

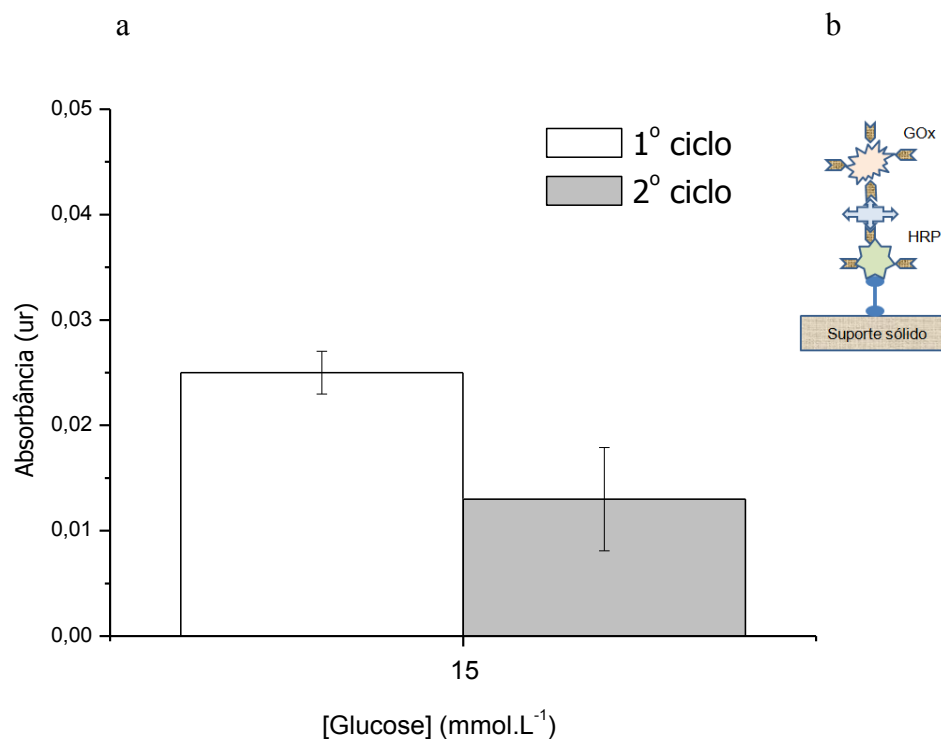


Figura 5.45 – Atividades enzimáticas obtidas em 2 ciclos de exposição da Estrutura HRP-biot/GOx-biot à uma concentração de glucose de 15mmol.L^{-1} por um tempo 30 minutos (a) e representação esquemática da estrutura (b).

Estes resultados são bastante promissores no aspecto potencial de reusabilidade do biossensor. A otimização deste sistema e da sua estabilidade com o tempo estão fora do escopo deste trabalho.

5.4.4. Especificidade

Para verificação da especificidade do sistema, foi substituído o substrato glucose pela frutose. A atividade enzimática foi monitorada e os resultados abaixo foram obtidos após um tempo de 50 minutos para a Estrutura GOx-biot/HRP-biot, que foi escolhida por apresentar os maiores resultados de absorbância. Os resultados estão apresentados na Figura 5.46.

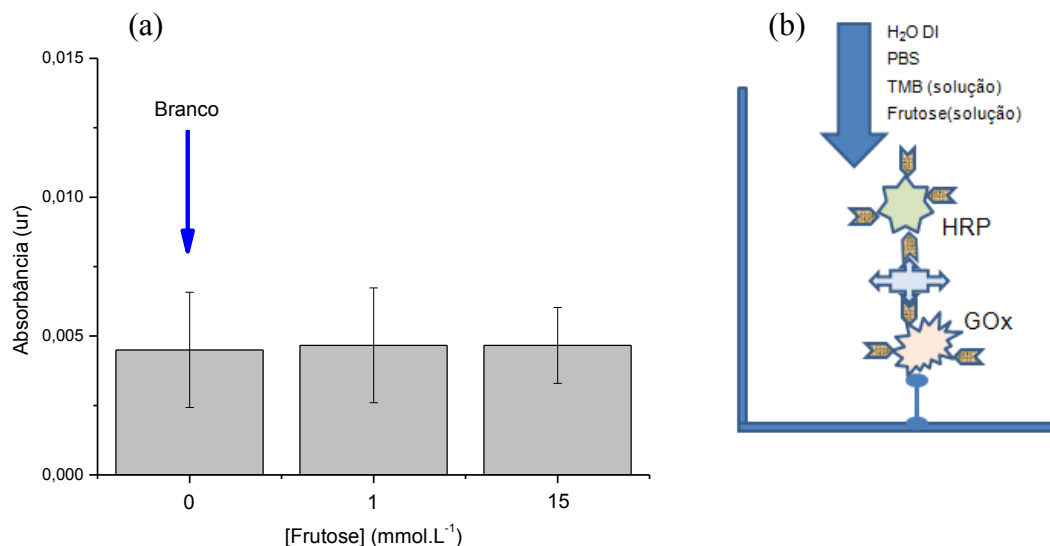


Figura 5.46 – Resultados de atividade enzimática para as concentrações de 1mmol.L^{-1} e 15mmol.L^{-1} de frutose para a Estrutura GOx-biot/HRP-biot (a) e representação esquemática do experimento (b).

Através dos resultados é possível observar que não houve diferença entre as medições do branco e as soluções com a adição de frutose, atestando que a especificidade da GOx não foi alterada em relação a frutose. Este resultado é devido à notável especificidade deste biocatalizador. Existem dois modelos que explicam a especificidade enzimática, são eles o modelo chave-fechadura de Emil Fisher, desenvolvido em 1894 e do encaixe induzido de 1958 sendo que ambos têm a estrutura tridimensional do substrato como determinante para a ação enzimática (COPELAND, 2000).

A Figura 5.47 apresenta a comparação dos resultados de absorbância obtidos com uso de substratos glucose e frutose para a Estrutura GOx-biot/HRP-biot, ambos para um tempo de reação de 50 minutos. Como pode ser visto as afirmações quanto à especificidade da estrutura podem novamente ser comprovadas.

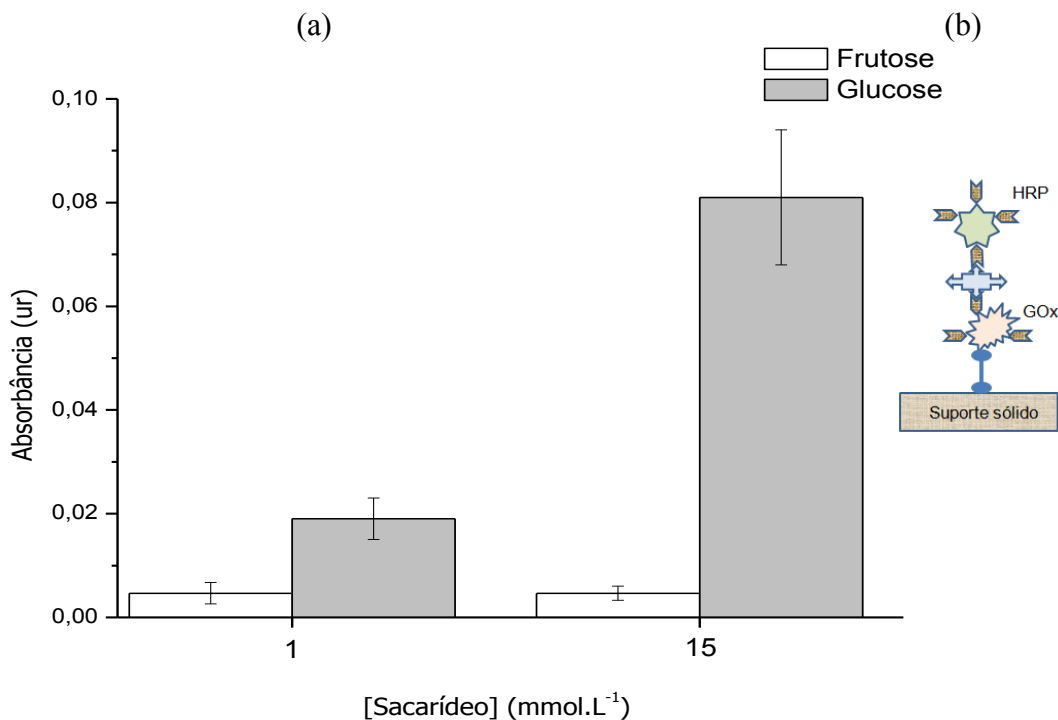


Figura 5.47 – Resultado da avaliação da especificidade da Estrutura GOx-biot/HRP-biot através da comparação das absorbâncias para as concentrações de 1mmol.L⁻¹ e 15mmol.L⁻¹ de frutose e glucose e representação esquemática da nanoestrutura (b).

5.4.5. Ensaio de Aplicação do Biossensor Nanoestruturado

Como prova de conceito, as estruturas bienzimáticas foram submetidas a amostras de refrigerantes. A Figura 5.48 mostra a detecção positiva da glucose em refrigerante regular (com adição de sacarose) através da cor azulada, fruto da oxidação da TMB, nas cavidades onde o refrigerante regular foi utilizado. Já nas cavidades onde o refrigerante dietético foi utilizado não houve detecção.

O consumo de refrigerantes e de bebidas energéticas tem chamado bastante atenção e preocupação devido ao crescimento de problemas de saúde ligados à obesidade e sobrepeso, problemas de diabetes infantil e adulta, decaimento dental, hipertensão, etc. Os refrigerantes são bebidas que tipicamente contém água, um adoçante e um agente aromatizante. Refrigerantes regulares são adoçados com açúcar de cana (América Latina e África), açúcar de beterraba (Europa) e de xarope de milho com alto teor de frutose (Estados Unidos). Estes açucares resultam numa mistura de sacarose, frutose e glucose no

produto final. A maioria dos refrigerantes dietéticos é adoçada com aspartame. A quantidade de açúcar contida em uma lata de refrigerante (355mL) é de aproximadamente 39g (MALIK et al., 2006; SÁDECKÁ e POLONSKÝ, 2000)

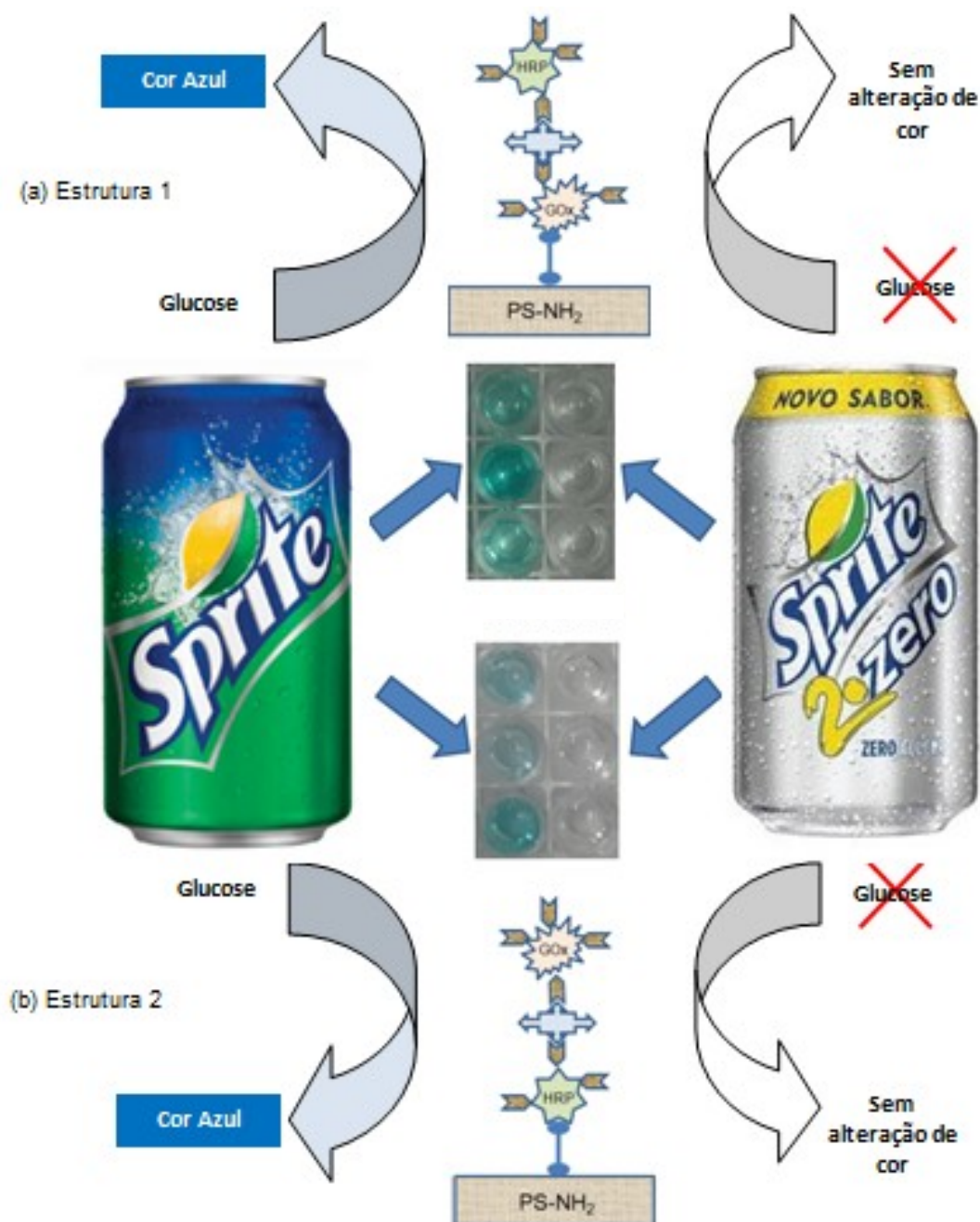


Figura 5.48 – Aspecto das cavidades com as nanoestruturas bienzimáticas após serem testadas com refrigerante regular e dietético.

Este resultado é bastante significativo, já que uma estrutura nanométrica foi validada com amostras “comerciais” com presença de todos os interferentes do meio, sem prejudicar sua resposta bioativa.

5.5. Estruturas Nanométricas Trienzimáticas

5.5.1. Atividade da Invertase em Solução

Estes ensaios foram realizados para verificar a exequibilidade da utilização da invertase em PBS, já que os ensaios até o momento utilizaram este tampão. A faixa ótima de trabalho da INV está entre os pHs de 3,5 a 4 (REED e NAGODAWITHANA, 2007). Para isto foi estudada a eficiência da invertase em solução nos pHs 7,4 (tampão PBS) e 5,3 (tampão citrato).

A Figura 5.49 apresenta a avaliação da atividade enzimática da INV em solução utilizando-se 100mmol.L^{-1} de sacarose e modulando-se o pH em duas condições, através do uso dos tampões PBS e citrato.

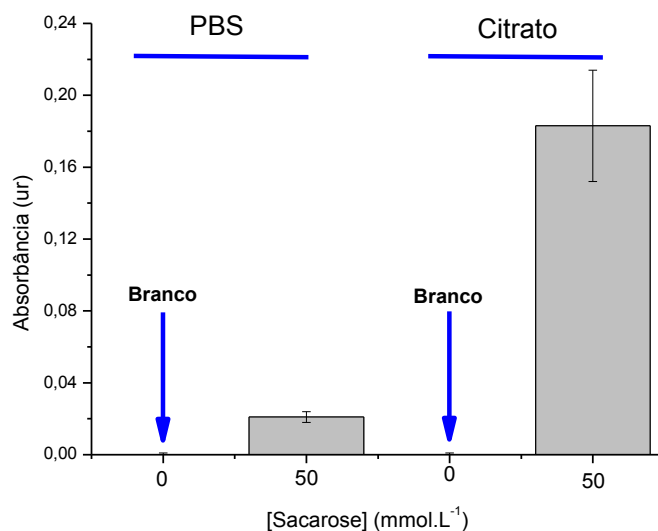


Figura 5.49 – Atividades enzimáticas da avaliação da invertase em solução em diferentes tampões (PBS e citrato) para uma concentração de sacarose de 50mmol.L^{-1} e tempo de 50 minutos.

Como pode ser visto na Figura 5.49 houve um aumento da atividade enzimática de aproximadamente 800% quando a invertase foi submetida ao tampão citrato. O uso de PBS na monitoração da atividade enzimática da cascata trienzimática em muito prejudicaria o funcionamento da mesma.

5.5.2. Atividades Enzimáticas da Cascata Trienzimática

Em função dos resultados do item 5.5.1, os experimentos das cascatas trienzimática foram feitos com tampão citrato. A Figura 5.50 apresenta os resultados de absorvância obtidos para a cascata trienzimática (Estrutura GOx-biot/HRP-biot/INV-biot) imobilizada para um tempo de 510 minutos. Os resultados obtidos nos mostram a viabilidade do sensor.

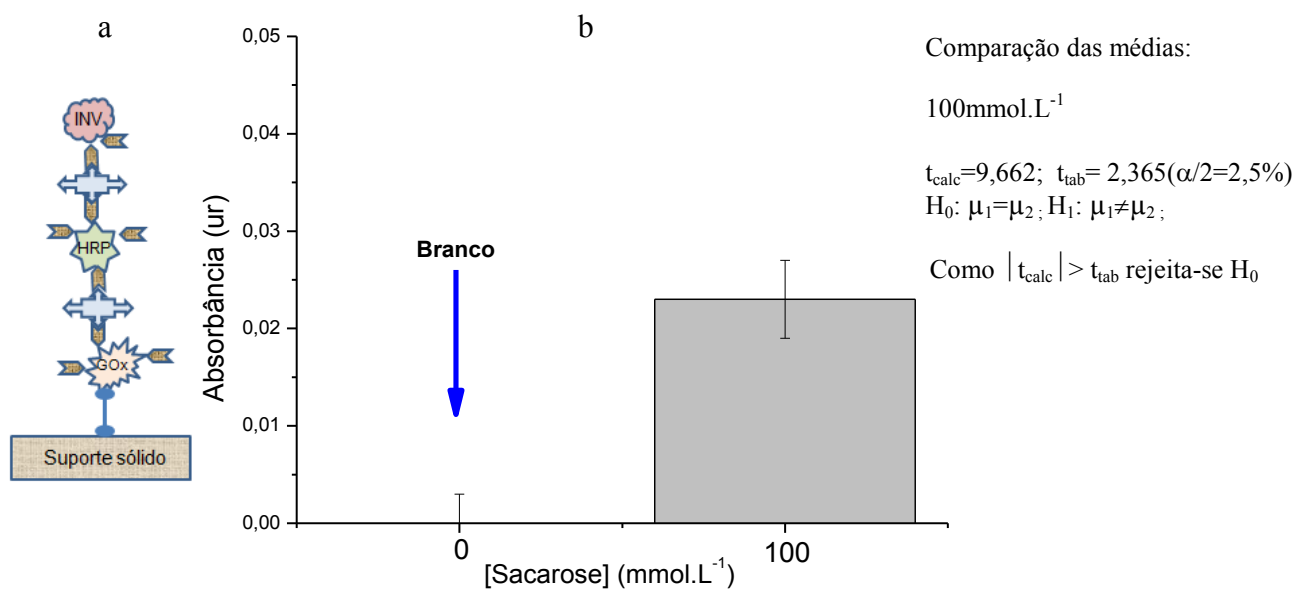


Figura 5.50 – Representação esquemática (a) e atividades enzimáticas da estrutura trienzimática GOx-biot/HRP-biot/INV-biot para a concentração de sacarose de 100mmol.L⁻¹, tempo de 510 minutos (b).

A Figura 5.51 apresenta os resultados de absorvância obtidos para a cascata trienzimática (Estrutura HRP-biot/GOx-biot/INV-biot) imobilizada para um tempo de 510 minutos.

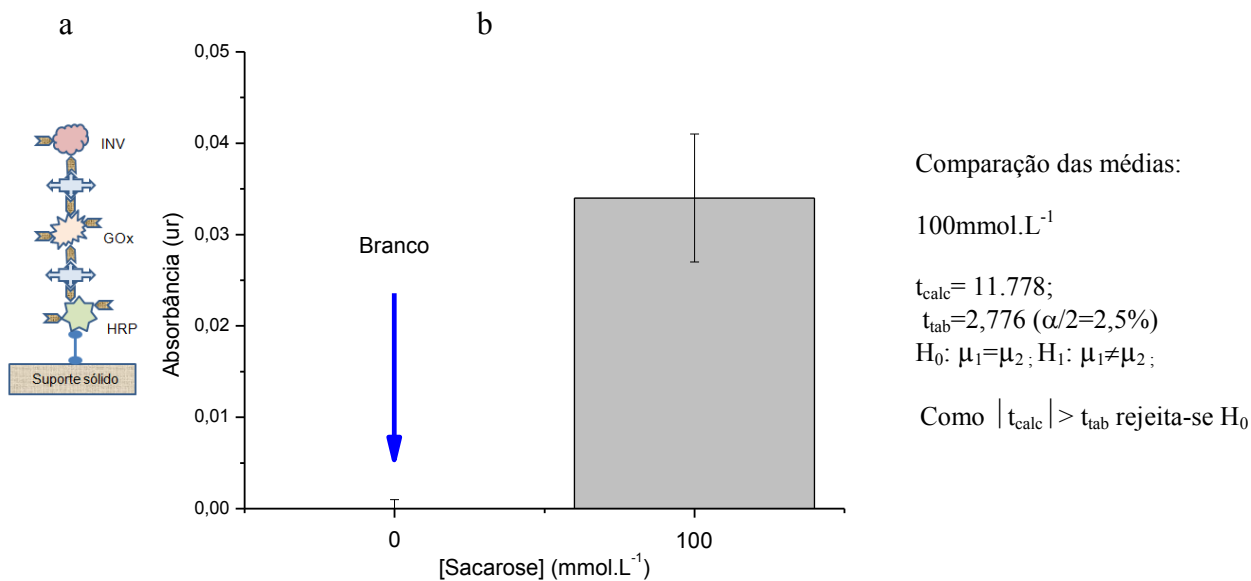
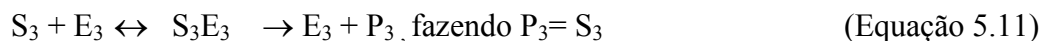
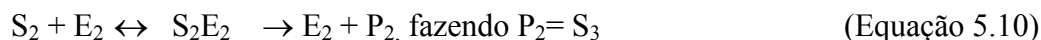


Figura 5.51 – Representação esquemática (a) e atividades enzimáticas da estrutura trienzimática HRP-biot/GOx-biot/INV-biot para a concentração de sacarose de 100mmol.L⁻¹, tempo de 510 minutos (b).

A Figura 5.52 mostra a representação esquemática das reações em cascata do experimento da estruturas trienzimáticas estudadas, a fim de ilustrar o funcionamento das reações. O funcionamento das cascatas enzimáticas pode ser descrito genericamente pelas equações 5.9 à 5.12. Neste conjunto de equações o produto resultante da ação de uma enzima é usado como substrato da próxima enzima. As equações foram limitadas ao empilhamento de três enzimas, mas teoricamente pode ser usado em um número ilimitado.



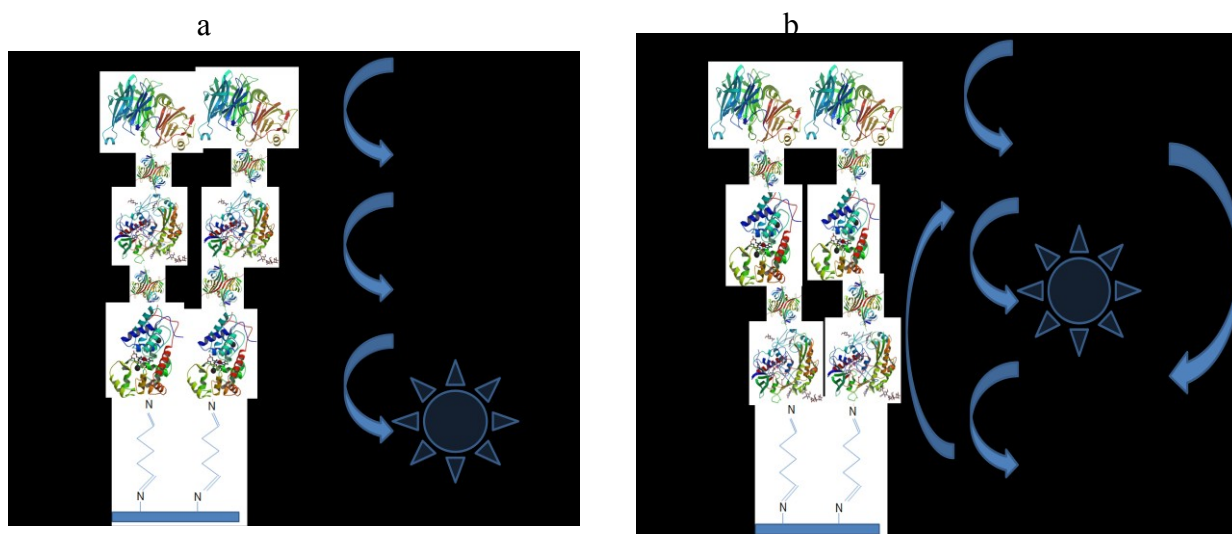


Figura 5.52 – Representação esquemática das reações em cascata das estruturas trienzimáticas HRP-biot/GOx-biot/INV-biot (a) GOx-biot/HRP-biot/INV-biot (b).

Comparando-se as duas estruturas GOx-biot/HRP-biot/INV-biot e HRP-biot/GOx-biot/INV-biot, com o auxílio da Figura 5.53, temos que a estrutura HRP-biot/GOx-biot/INV-biot apresentou o melhor resultado.

Tomando-se como referência **apenas as duas primeiras camadas** de enzimas das estruturas trienzimáticas e comparando-se os resultados das cascatas bienzimáticas descritas em 5.4.1 houve uma inversão dos resultados, já que a estrutura GOx-biot/HRP-biot apresentou melhores resultados de atividade enzimática. Porém é necessário lembrar que os ensaios realizados com a cascata bienzimática ocorreram em tampão PBS e os ensaios da cascata trienzimática em tampão citrato. Esta diferença motivou os experimentos a serem descritos no item 5.6.

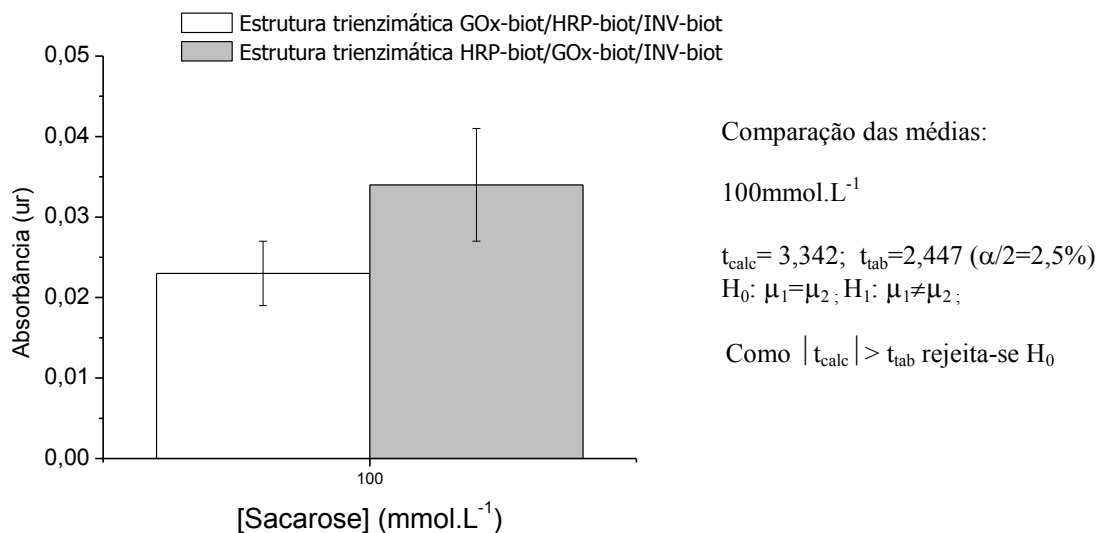


Figura 5.53 – Atividades enzimáticas das cascatas trienzimáticas GOx-biot/HRP-biot/INV-biot e HRP-biot/GOx-biot/INV-biot (tempo= 510 minutos).

5.5.3. Ciclos de Biocatálise Enzimática

Em função dos melhores resultados da atividade enzimática da estrutura HRP-biot/GOx-biot/INV-biot, foram realizados ensaios de ciclos de utilização e especificidade, similares aos realizados na cascata bienzimática. A aplicabilidade da reutilização da estrutura trienzimática HRP-biot/GOx-biot/INV-biot pode ser vista através da Figura 5.54.

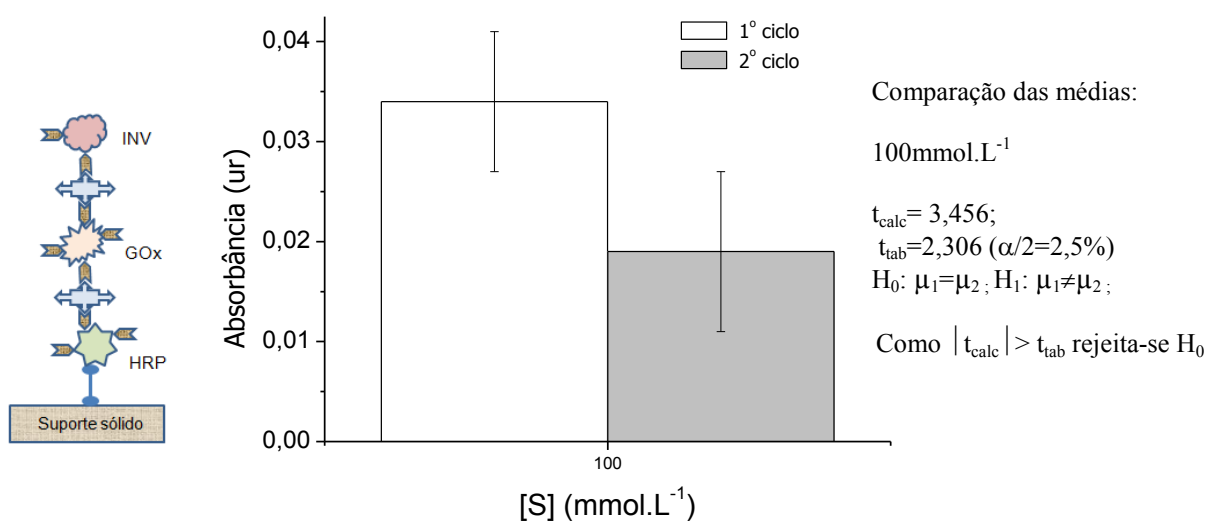


Figura 5.54 – Atividades enzimáticas da avaliação da reutilização da Estrutura HRP-biot/GOx-biot/INV-biot (tempo= 510 minutos).

Assim como relatado para as estruturas bienzimáticas, este resultado é promissor no aspecto da reusabilidade do sistema, abrindo perspectivas para estudos de otimização da estrutura construída.

Analisando a reutilização da Estrutura HRP-biot/GOx-biot/INV-biot, temos uma queda média de absorbância de aproximadamente 44% entre o primeiro e segundo ciclos para a concentração de 100mmol.L^{-1} . A reutilização por mais vezes não foi avaliada.

5.5.4. Especificidade

Para verificação da especificidade do sistema, foi substituído o substrato sacarose pela frutose. A atividade enzimática foi monitorada e os resultados apresentados na Figura 5.55, para um tempo de 510 minutos.

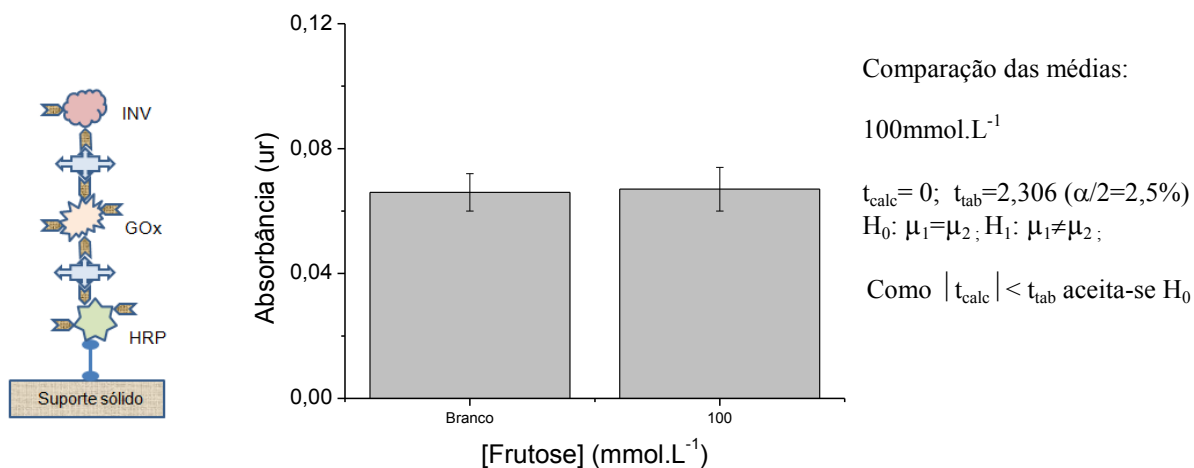
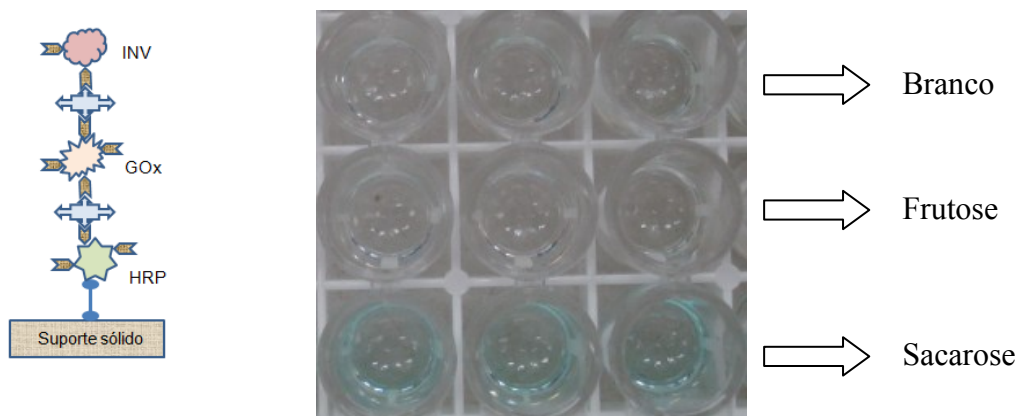


Figura 5.55– Absorbâncias da avaliação da especificidade da Estrutura HRP-biot/GOx-biot/INV-biot utilizando-se frutose como substrato (tempo= 510 minutos).

Na Figura 5.56 pode ser visto o aspecto das cavidades contendo as nanoestruturas trienzimáticas após serem submetidas aos testes de especificidade. Apenas as cavidades submetidas ao substrato sacarose apresentaram mudança de cor.



5.56 - Aspecto das cavidades com as nanoestruturas trienzimáticas referentes à Estrutura HRP-biot/GOx-biot/INV-biot após serem submetidas aos testes utilizando-se sacarose e frutose após um intervalo de 510 minutos.

Como pode ser visto, através das Figuras 5.55 e 5.56, não houve diferença entre as medições entre o branco e as soluções com a adição de frutose, atestando a especificidade da GOx e da INV.

5.6. Estudo de Fatores que Afetam a Atividade das Cascatas Trienzimáticas (Efeitos Difusionais, Topologia e pH)

5.6.1. Estudos de Efeitos Difusionais

Para estes experimentos as enzimas GOx-biot e HRP-biot e as estruturas bienzimáticas GOx-biot/HRP-biot e HRP-biot/GOx-biot foram avaliadas isoladamente e também quando montadas em estruturas trienzimáticas.

A Figura 5.57 apresenta os resultados de atividade enzimática para a GOx-biot imobilizada na primeira camada, com e sem a estrutura trienzimática montada. Para esta avaliação os procedimentos foram idênticos, realizados de forma a avaliar uma monocamada de enzima (em ambas as situações HRP em excesso e substrato glucose foram utilizados para a avaliação da atividade enzimática). A Figura 5.58 ilustra as duas configurações de teste da GOx-biot.

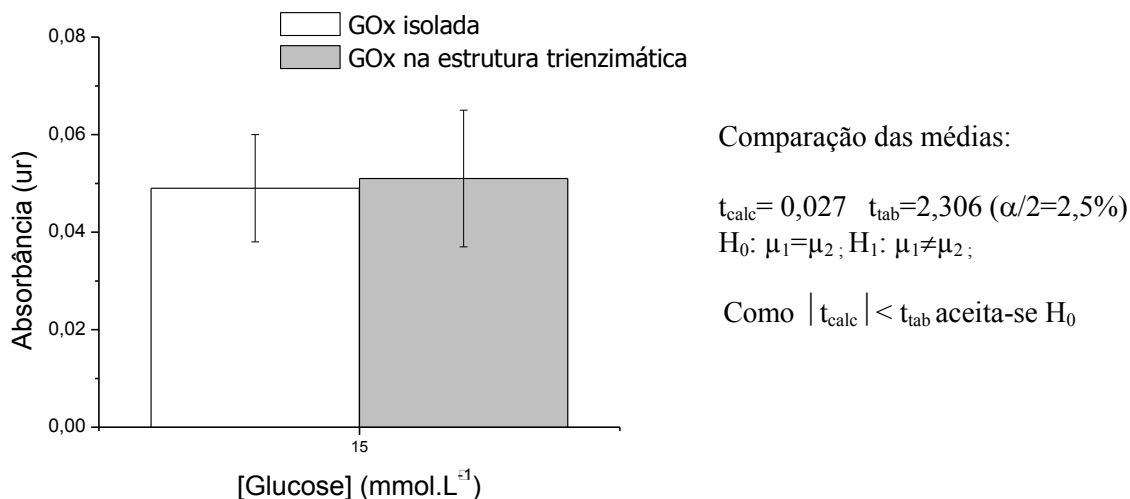


Figura 5.57 – Atividades enzimáticas da avaliação da enzima GOx na Estrutura GOx-biot/HRP-biot/INV-biot (tempo = 9 minutos).

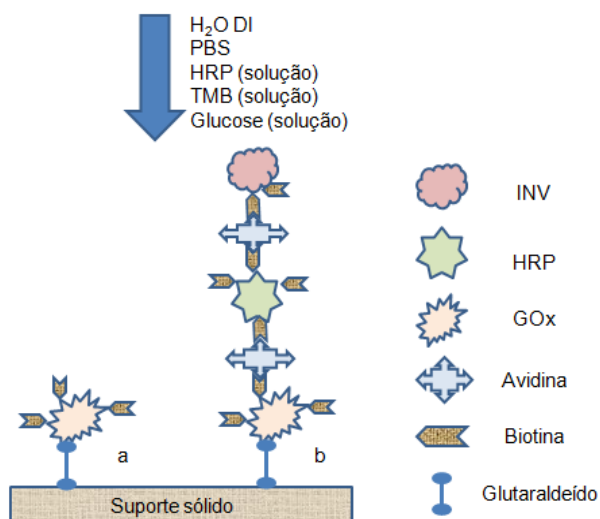


Figura 5.58 – Representação esquemática das configurações usadas para teste da GOx-biot immobilizada: (a) isolada, (b) parte integrante da cascata trienzimática.

A Figura 5.59 apresenta os resultados de atividade enzimática para a HRP-biot immobilizada na primeira camada, com e sem a estrutura trienzimática montada. Novamente ambos os experimentos ocorreram considerando-se os procedimentos de avaliação de uma **monocamada** de enzimas (em ambas as situações foi utilizado H_2O_2 como substrato). A Figura 5.60 ilustra as duas configurações de teste da HRP-biot.

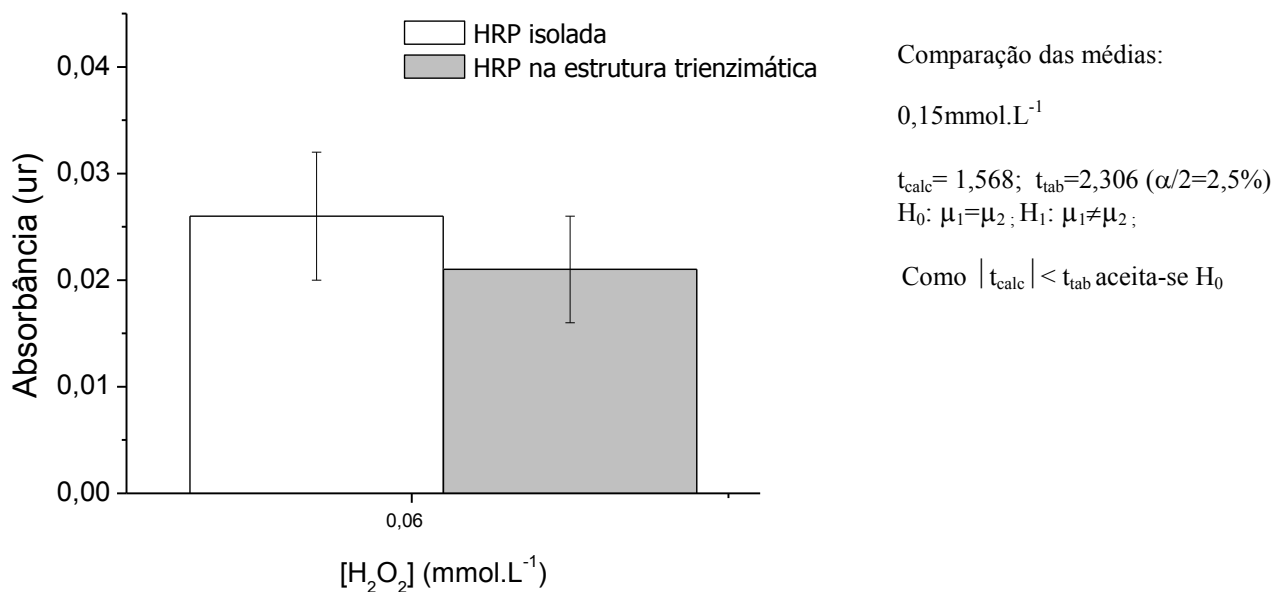


Figura 5.59 – Atividades enzimáticas da avalia o da enzima HRP na Estrutura HRP-biot/GOx-biot/INV-biot (tempo = 9 minutos).

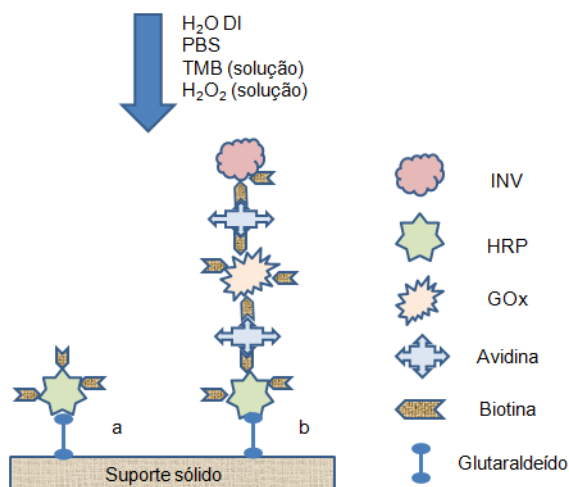


Figura 5.60 – Representa o esquemática das configura es usadas para teste da HRP-biot imobilizada: (a) isolada, (b) parte integrante da cascata trienzimática.

As Figuras 5.61 e 5.63 apresentam respectivamente os resultados de atividade enzimática para as cascatas GOx-biot/HRP-biot e HRP-biot/GOx-biot imobilizadas isoladamente ou como parte de uma estrutura trienzimática. Todos os experimentos ocorreram considerando-se os procedimentos de avalia o de uma **cascata bienzimática** de enzimas

(foi utilizado glucose como substrato em ambas as situações). As Figuras 5.62 e 5.64 ilustram as configurações de teste.

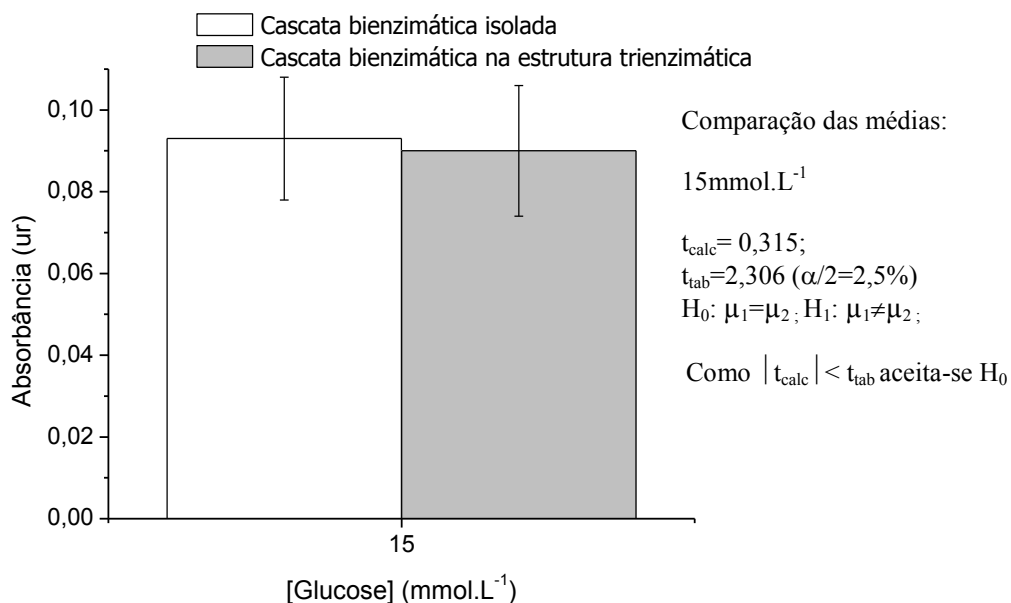


Figura 5.61– Atividades enzimáticas da cascata bienzimática GOx-biot/HRP-biot isolada e quando a mesma é parte da Estrutura GOx-biot/HRP-biot/INV-biot (tempo = 50 minutos).

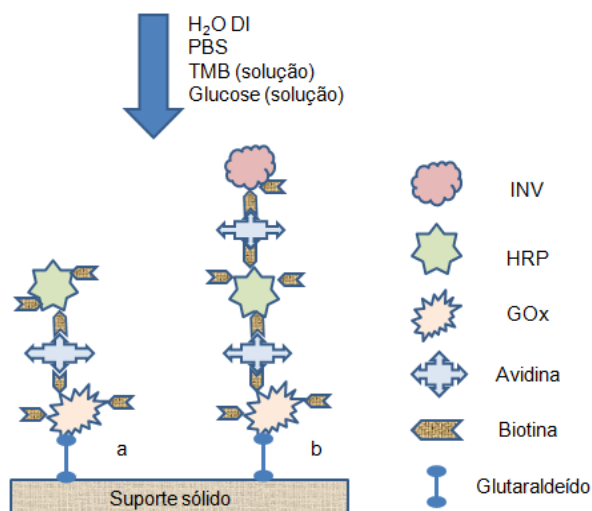


Figura 5.62 – Representação esquemática das configurações usadas para teste da cascata bienzimática GOx-biot/HRP-biot immobilizada: (a) isolada, (b) parte integrante da cascata trienzimática.

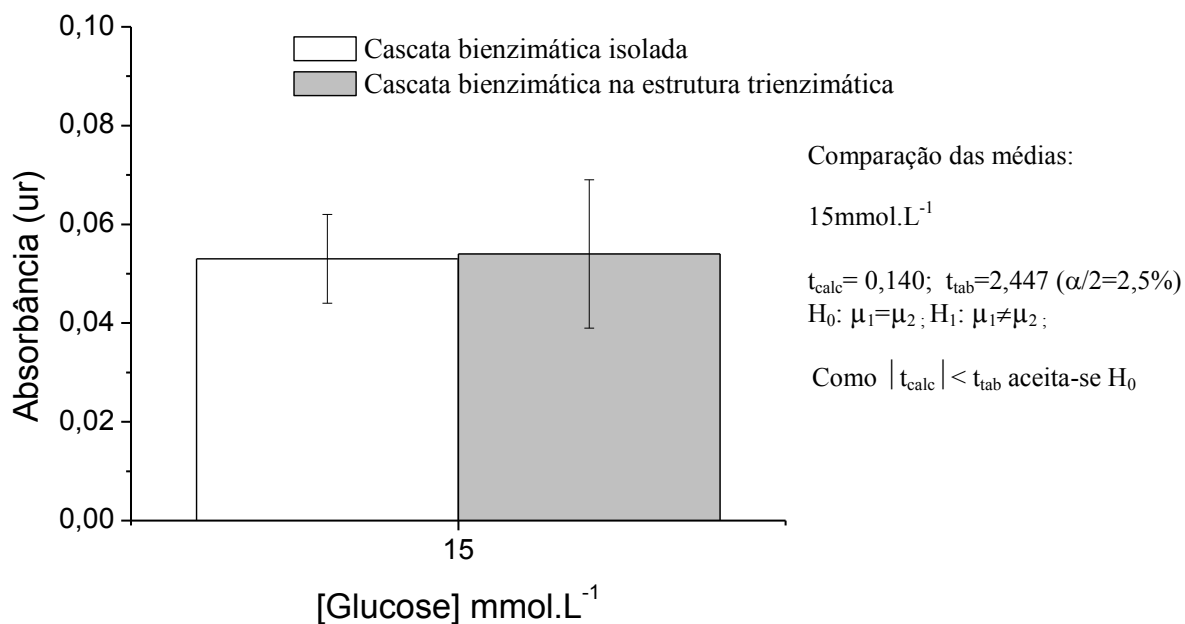


Figura 5.63 – Atividades enzimáticas da cascata bienzimática HRP-biot/Gox-biot isolada e quando a mesma é parte da Estrutura HRP-biot/GOx-biot /INV-biot (tempo = 50 minutos).

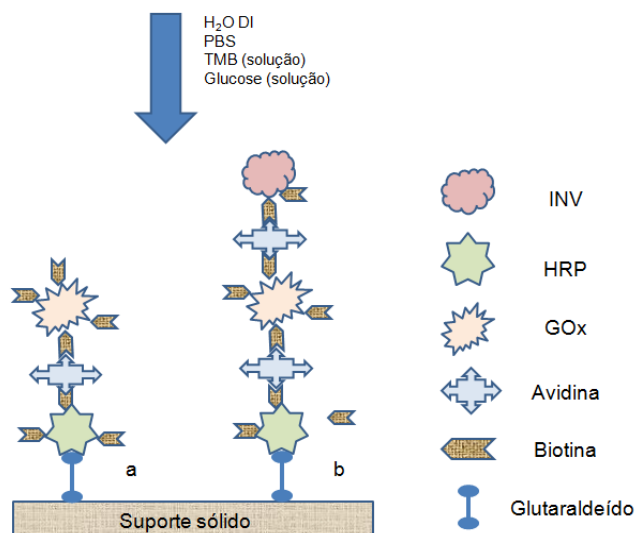


Figura 5.64 – Representação esquemática das configurações usadas para teste da cascata bienzimática HRP-biot/GOx-biot immobilizada: (a) isolada, (b) parte integrante da cascata trienzimática.

Não houve diferença detectável entre as absorbâncias em nenhum dos experimentos realizados, demonstrando que e a posterior deposição das demais camadas em relação à imobilização na 1ª camada de GOx-biot e HRP-biot e das estruturas bienzimáticas **não**

impõe influência significativa sobre sua eficiência. Tal resultado aponta para que efeitos difusionais **não** estejam presentes nos tempos escolhidos, provavelmente a situação de equilíbrio das espécies que sofrem difusão seja atingida antes dos intervalos de leitura.

5.6.2. Estudos de Topologia

Efeitos do posicionamento das enzimas dentro das estruturas bienzimáticas foram estudados para prover informações sobre o desempenho destas cascatas. Para este fim, foram estudados o posicionamento da GOx-biot e da HRP-biot dentro das estruturas trienzimáticas através da desativação da cascata, ou seja para a monitoração da atividade da GOx-biot, foi utilizado HRP em solução, “desativando” a HRP imobilizada. Para a monitoração da atividade da HRP-biot foi injetado substrato H_2O_2 , sem ser necessária a catálise da GOx-biot imobilizada.

A comparação das atividades enzimáticas da GOx-biot e HRP-biot (monitorada de forma isolada) nas estruturas GOx-biot/HRP-biot/INV-biot e HRP-biot/GOx-biot/INV-biot podem ser vistas na Figura 5.65 e 5.66.

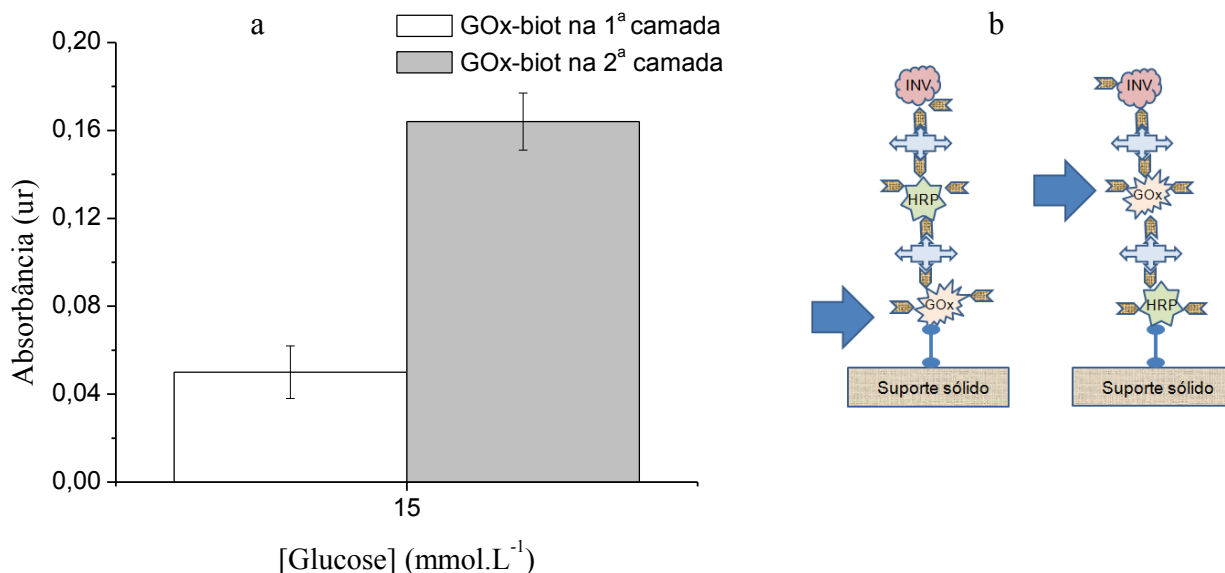


Figura 5.65 – Atividades enzimáticas da GOx-biot quando montada na 1ª e 2ª camadas de uma estrutura trienzimática [t = 9 minutos] (a) e representação esquemática da posição relativa na 1ª camada e 2ª camada das estruturas multienzimáticas estudadas (b).

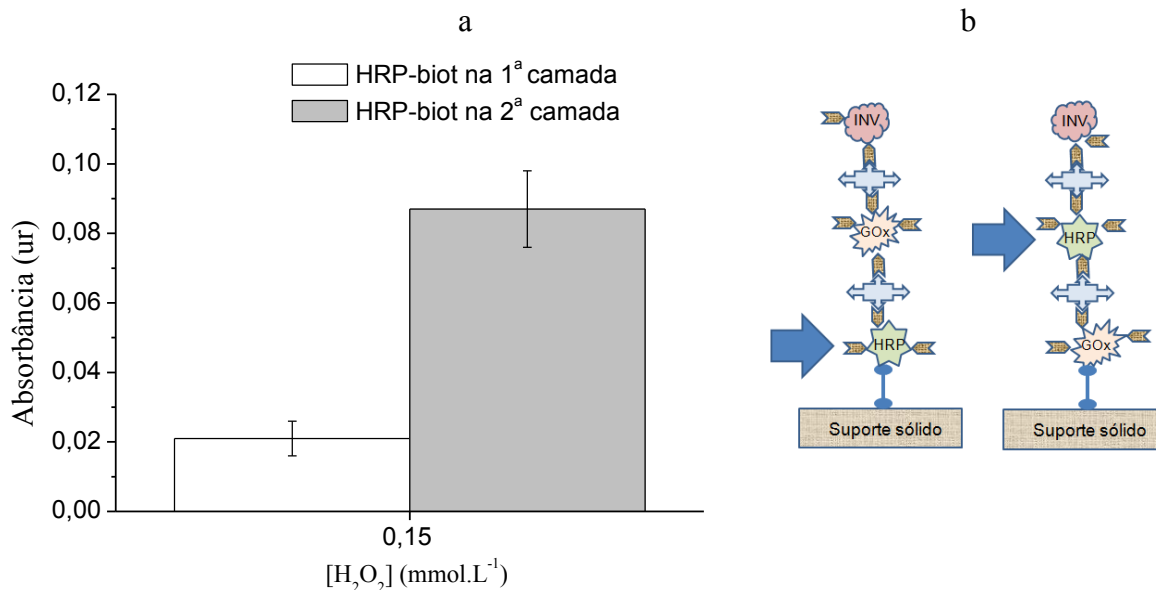


Figura 5.66 – Atividades enzimáticas da HRP-biot quando montada na 1^a e 2^a camadas de uma estrutura trienzimática [t = 9 minutos] (a) e representação esquemática da posição relativa na 1^a camada e 2^a camada das estruturas multienzimáticas estudadas (b).

Realizando a comparação entre a atividade enzimática da GOx-biot quando na primeira camada na estrutura (montada na estrutura GOx-biot/HRP-biot/INV-biot) e a atividade da mesma enzima agora na segunda camada (montada na estrutura HRP-biot/GOx-biot/ INV-biot) temos uma melhoria de eficiência de aproximadamente 320%, quando a GOx-biot está na segunda camada.

Realizando a mesma comparação com a HRP-biot, tem-se uma melhoria de eficiência de aproximadamente 360% quando a HRP-biot está na segunda camada.

Uma possibilidade para explicar tal diferença está nas diferenças de microambiente das enzimas nas duas condições. Enquanto a enzima na primeira camada está submetida a condições de microambiente impostas pela interação entre o suporte sólido, tampão, substrato, produto, a avidina e a enzima em si, o fator suporte sólido não é aplicável à enzima imobilizada nas camadas superiores. Lembrando que no suporte sólido poderemos ter moléculas de glutaraldeído não ligadas à enzima, bem como amins que não reagiram

com o glutaraldeído. Um trabalho que vêm a colaborar com esta hipótese pode ser encontrado em CAO (2005). Este trabalho relata a modificação controlada do microambiente de forma a obter melhoria na estabilidade enzimática.

A GOx tem dimensões aproximadas de 5-7nm nos três eixos (HECHT et al., 1993), enquanto a HRP tem dimensões aproximadas de 4-6nm nos três eixos (SUN et al., 2008), já molécula do glutaraldeído tem um comprimento de aproximadamente 7.7Å. Uma possível explicação para a diferença entre as atividades enzimáticas das enzimas pode estar na existência de interações residuais hidrofóbicas e de forças fracas entre as enzimas e o suporte sólido. Adicionalmente para a análise da HRP, UKEDA e colaboradores (1996) relatam que a adsorção direta de HRP em microplacas tem grande chance de inativar a enzima, o que sugere que modificações conformacionais pelas forças envolvidas na adsorção da enzima podem alterar sua estrutura tridimensional.

5.6.3. Avaliação do pH na Atividade do Sistema Multienzimático

Na Figura 5.67 são apresentados os resultados de atividade enzimática da cascata bienzimática, relativa à estrutura GOx-biot/HRP-biot, e na Figura 5.68 estão apresentados os resultados relativos à estrutura HRP-biot/GOx-biot modulando-se o pH da reação pela utilização de tampões citrato (pH=5,3) e PBS (pH=7,4). Nota-se que houve um incremento significativo da eficiência da cascata com na condição de pH = 5,3 (tampão citrato). Os tempos de reação foram de 50 minutos.

A estrutura terciária das enzimas tem íntima ligação com as interações dos aminoácidos, e a interação destes aminoácidos pode ser alterada quando da variação do número de aminoácidos ionizados. Como aminoácidos tem diferentes pK_a s a variabilidade do número de aminoácidos ionizados depende do número específico de um determinado aminoácido e da faixa de pH em análise (COPELAND, 2000).

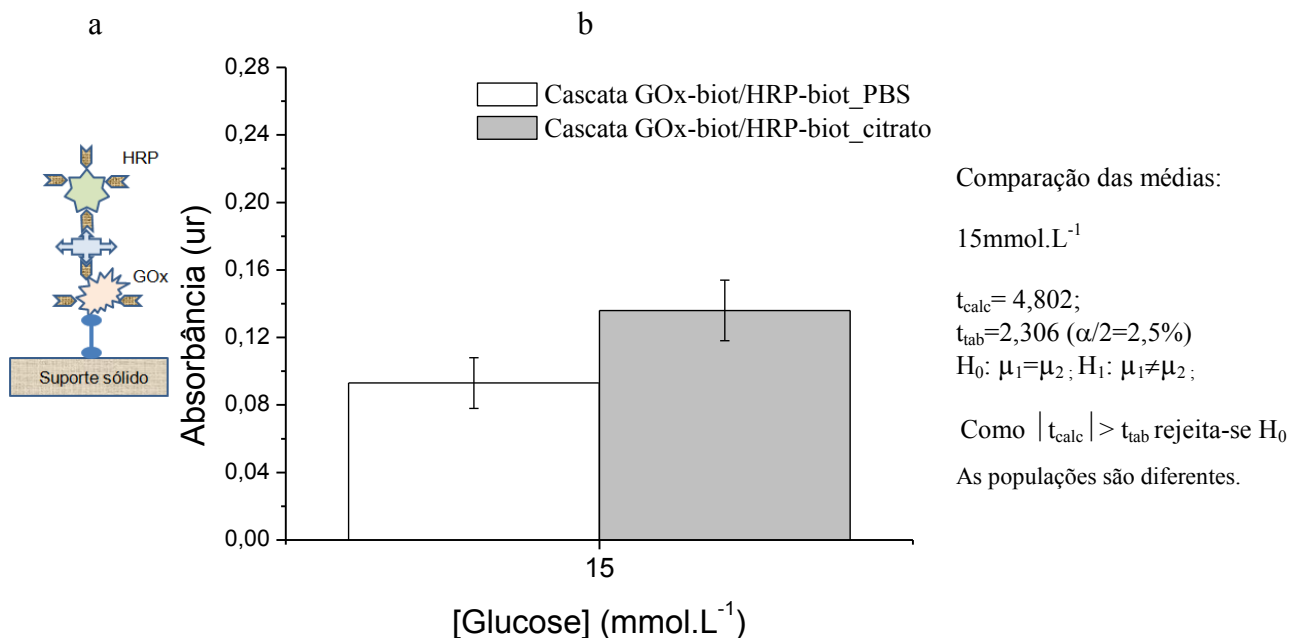


Figura 5.67 – Estrutura (a) e atividades enzimáticas (b) da cascata bienzimática da Estrutura GOx-biot/ HRP-biot em diferentes condições de modulação de pH.

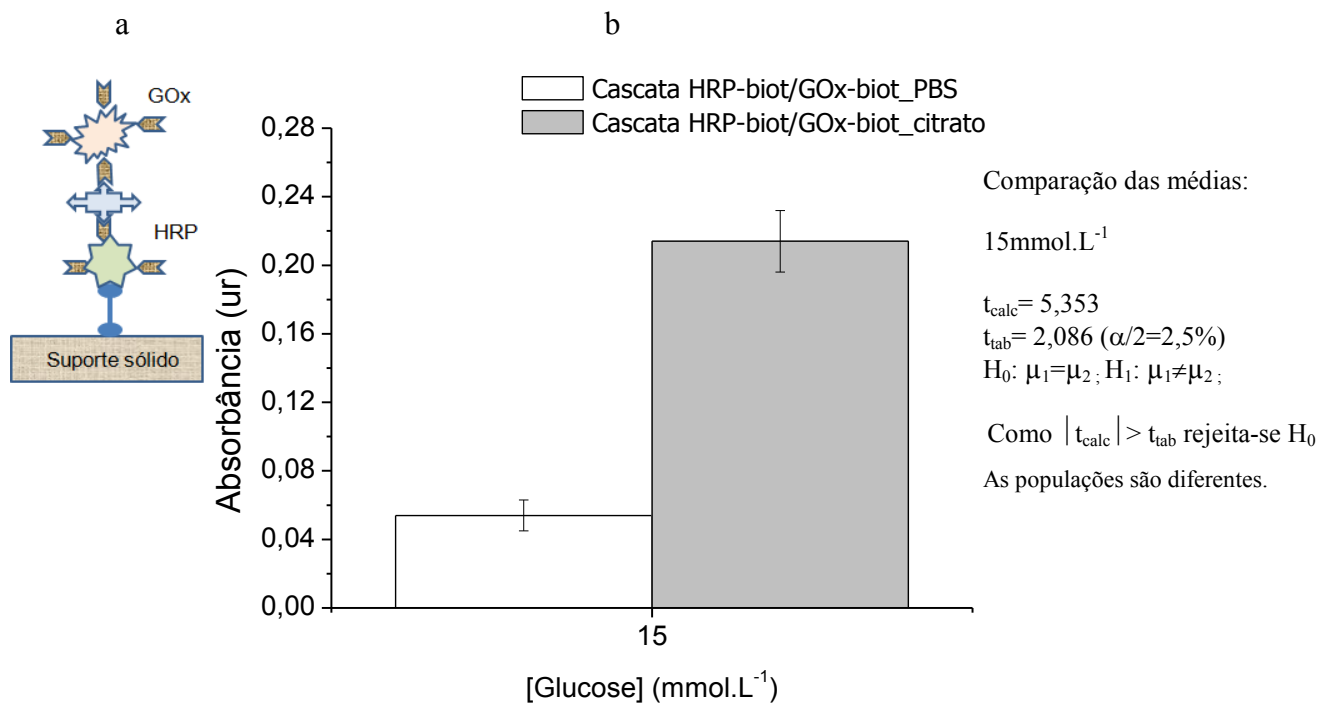


Figura 5.68 – Estrutura (a) e atividades enzimáticas (b) da cascata bienzimática da Estrutura HRP-biot/GOX-biot em diferentes modulações de pH.

Como por exemplo, se tomarmos a sequência de aminoácidos da GOx, temos que o número de aminoácidos histidina na cadeia polimérica da GOx é de 19 aminoácidos. Tendo o pK_a da histidina como igual a 6,9 (HERMANSON, 2008), temos que na condição do pH do tampão PBS a maioria dos grupos laterais destes aminoácidos estarão na sua forma **não protonada**, não possuindo carga. Na condição de pH do tampão citrato estas histidinas possuirão cargas positivas nos seus grupos laterais conforme ilustrado na Figura 5.69.

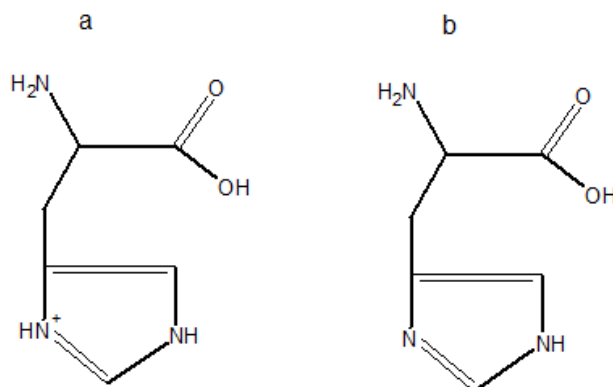


Figura 5.69 - Representação esquemática do aminoácido histidina, com o grupo lateral na sua forma protonada (a) e deprotonada (b) - (Adaptado de HERMANSON, 2008).

Diferentes graus de ionização dos grupos laterais podem:

- Levar ao aparecimento de forças eletrostáticas, regidas pela equação 5.13, conhecida pela equação de Coulomb. A força resultante pela ação das cargas obtidas pela ionização destes grupos em uma enzima será a resultante do somatório vetorial das forças existentes. Diferentes condições de pH podem resultar em diferentes forças resultantes e estas podem levar a alterações tridimensionais, alterando, assim, a atividade enzimática (COPELAND, 2000).

$$F = \frac{q_1 q_2}{r^2 d} \quad (\text{Equação 5.13})$$

Sendo: F força eletrostática entre os grupos ionizados;
 q_1 e q_2 são as cargas dos grupos envolvidos;
 r a distância entre eles;
 d a constante dielétrica do meio,

- Resultar em diferentes cargas líquidas nas enzimas, ou seja, o somatório das cargas individuais dos aminoácidos em duas condições de pH podem levar a diferentes cargas na enzima. Este resultado global pode ser obtido através do uso ponto isoelétrico da enzima, levando-se em consideração o ponto isoelétrico da GOx de 3,9 - 4,3 (WILSON e TURNER, 1992), temos que na condição de pH do tampão PBS temos que a enzima está mais negativamente carregada que no pH do tampão citrato, esta carga líquida pode ter interações com o substrato levando a diferentes resultados.

Ainda se referindo a efeitos eletrostáticos, os aminoácidos que compõem os sítios ativos podem ter diferentes reatividades. Já que como já discutido anteriormente, as diferentes condições de pH podem levar a diferentes condições de ionização dos grupos laterais dos aminoácidos que podem ficar mais ou menos reativos (SØNDENGAARD et al., 2008). Como exemplo, a GOx possui dois grupos histidina e um grupo ácido glutâmico no seu sítio ativo (SU e KLINMAN, 1999). O efeito do pH na carga do grupo lateral na histidina já foi discutido anteriormente, realizando a análise no ácido glutâmico e considerando seu pK_a igual a 4,3 (HERMANSON, 2008) temos que em ambos os tampões a maioria dos grupos laterais destes aminoácidos estará não protonada e com carga negativa, conforme Figura 5.70 (b). Porém se aplicarmos a equação de Henderson-Hasselbalch, equação 5.14, temos que diferentes níveis de ionização são aplicáveis. Enquanto no pH do tampão PBS, aproximadamente 99,98% dos aminoácidos estarão não protonados, este percentual cai para 91,80% em tampão citrato.

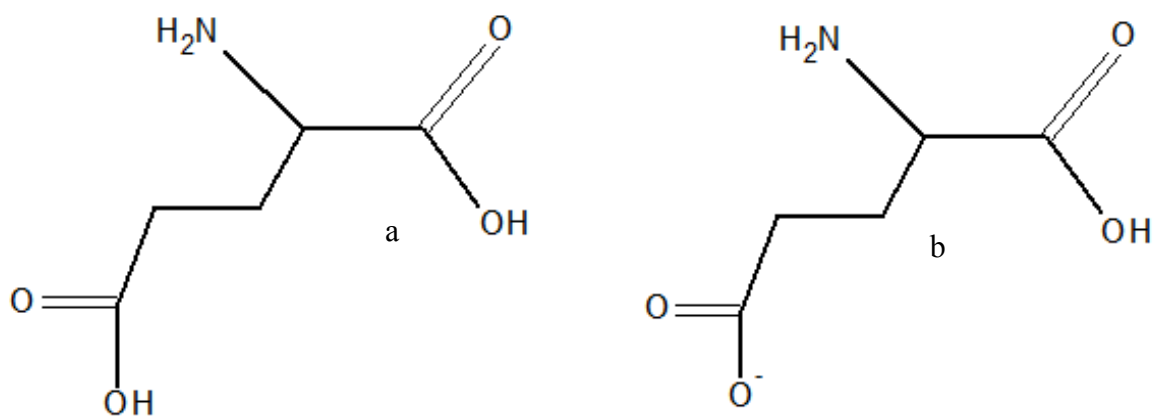


Figura 5.70 - Representação do aminoácido ácido glutâmico, com o grupo lateral na sua forma protonada (a) e não protonada (b) - (Adaptado de HERMANSON, 2008).

$$pK_a = pH - \log \frac{[A^-]}{[AH]} \quad (\text{Equação 5.14})$$

Sendo: pK_a – constante de dissociação do aminoácido em estudo;

pH – pH do tampão;

$[A^-]$ – concentração de aminoácidos não protonados;

$[AH]$ – concentração de aminoácidos protonados.

A comparação dos dados obtidos com as cascatas bienzimáticas das estruturas GOx-biot/HRP-biot e HRP-biot/GOx-biot podem ser vistas na Figura 5.71. É possível notar uma inversão quanto à eficiência das duas estruturas em função da modulação de pH utilizada.

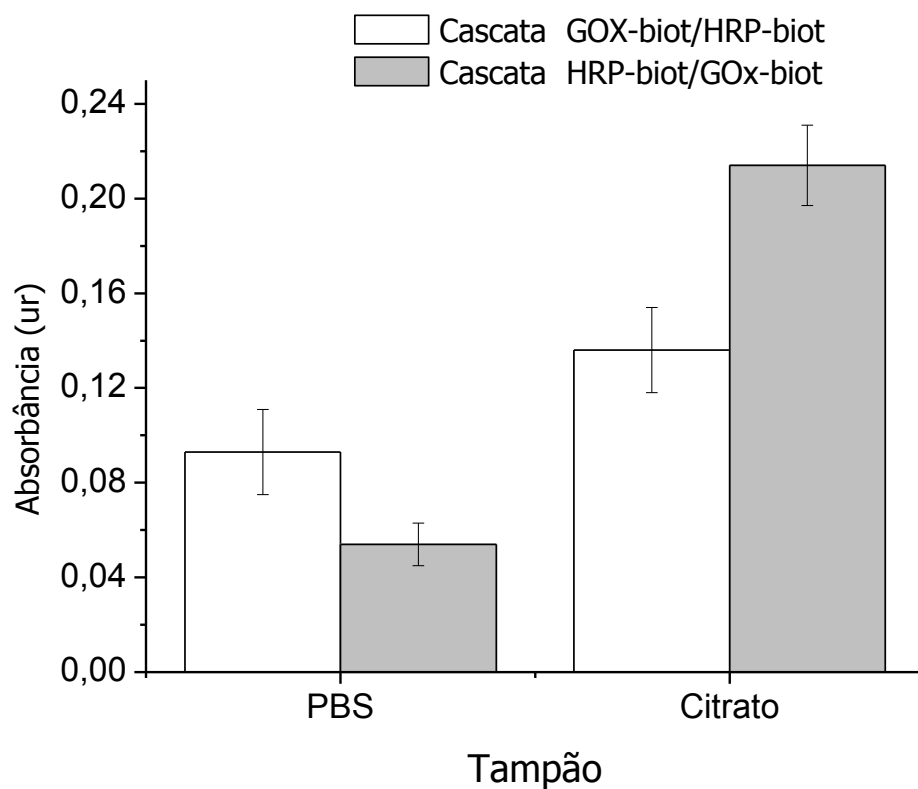


Figura 5.71 – Atividades enzimáticas das cascatas bienzimáticas das Estruturas GOX-biot/HRP-biot e HRP-biot/GOX-biot em diferentes tampões.

A mudança do comportamento final das cascatas tem explicação nos efeitos de mudança conformacional, efeitos de ionização de grupos laterais dos aminoácidos e mudanças nas condições de microambiente das enzimas, conforme já discutido anteriormente.

5.7. Experimento para Otimização da Biotinização da Invertase

A comparação dos resultados da atividade enzimática em solução para a enzima invertase biotinizada em diferentes pHs (citrato, 5,3 e PBS, 7,4) pode ser vista na Figura 5.72. A atividade enzimática da invertase biotinizada em tampão citrato foi aproximadamente 2x maior que a da enzima biotinizada em PBS.

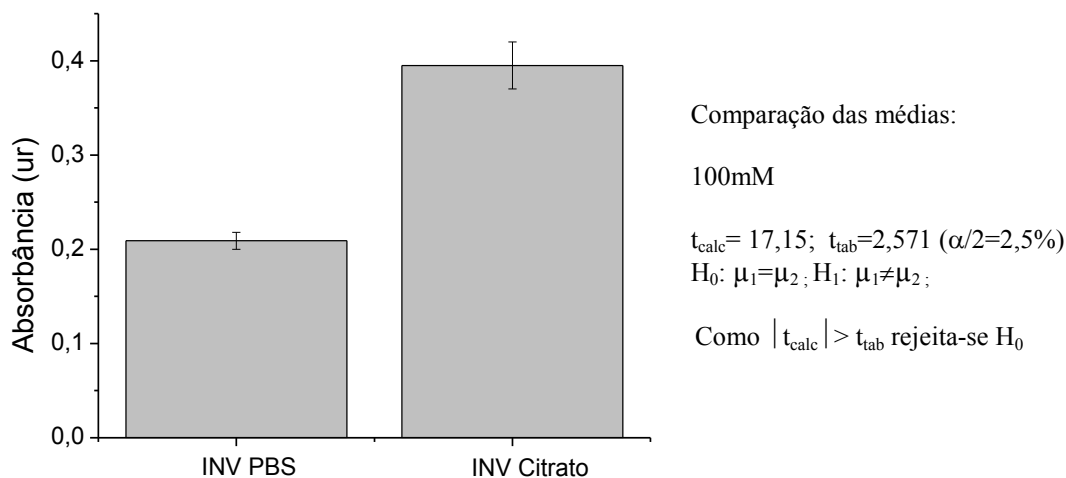


Figura 5.72 – Atividades enzimáticas da invertase biotinizada em solução, utilizando-se tampão PBS e tampão citrato, para um tempo de 30 minutos e concentração de sacarose de 100mmol.L⁻¹.

A invertase apresenta melhor funcionamento quando em tampão citrato, em lugar do tampão PBS. O faixa de pH ótimo para esta enzima é de 3,5 - 4,0 (REED e NAGODAWITHANA, 2007), o que motivou a tentativa de biotinização neste tampão.

Para a verificação da atividade enzimática da invertase biotinizada foi feito em experimento bienzimático: GOx-biot e INV-biot (com HRP em excesso). As duas estruturas testadas

podem ser vistas na Figura 4.18. Todos os experimentos foram feitos utilizando-se tampão citrato. Os resultados obtidos para as enzimas isoladamente (GOx-Biot e INV-biot, com as demais enzimas da cascata de reação em solução) após imobilização na primeira camada e na segunda camada da estrutura bienzimática estão mostradas nas Figuras 5.73 e 5.74. Os testes da nanoestrutura bienzimática estão resumidos na Figura 5.75.

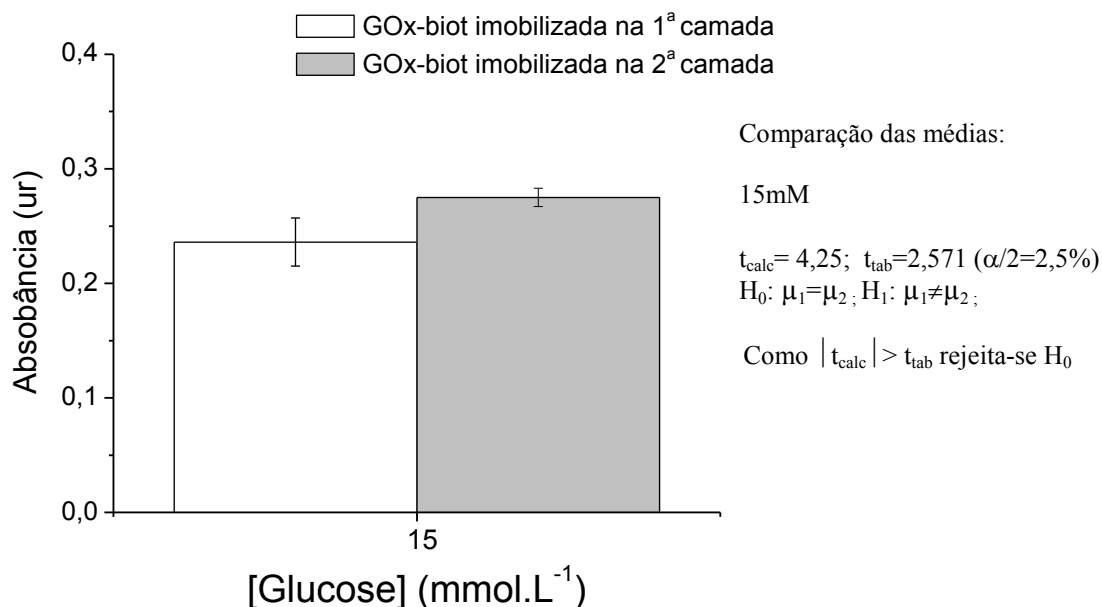


Figura 5.73 – Atividades enzimáticas da GOx-biot imobilizada na 1^a e 2^a camadas para concentra o de glicose de 15mmol.L⁻¹ e tempo de 9 minutos.

Comparando-se o comportamento da GOx-biot quando imobilizada na primeira camada utilizando-se de glutaraldeído com a sua imobiliza o na segunda, utilizando-se de biotina/avidina, temos um comportamento semelhante ao encontrado no item 5.6.2, onde a GOx-biot na segunda camada apresenta melhor eficiência do que na primeira camada. Porém o incremento na melhora da eficiência da GOx-biot quando comparamos a posi o relativa na cascata GOx-biot/INV-biot foi de aproximadamente 1,2x, contra 3,2x encontrados na cascata GOx-biot/HRP-biot. Como as situa es são diferentes, não somente na composi o da cascata mas também no tampão utilizado, as mesmas razões apontadas para este comportamento no item 5.6.2 podem ser agora novamente apontadas: possível intera o GOx-biot suporte sólido e influência do microambiente.

Fazendo a análise da INV-biot, tal como feito para GOx-biot, temos uma inversão de comportamento. A invertase immobilizada na primeira camada tem uma eficiência superior ao apresentado quando da immobilização na segunda camada de aproximadamente 490%. Para este caso, se houve alguma influência da interação com o suporte sólido ela foi benéfica. A Figura 5.74 apresenta o gráfico com os valores obtidos para a immobilização da invertase nas duas posições relativas.

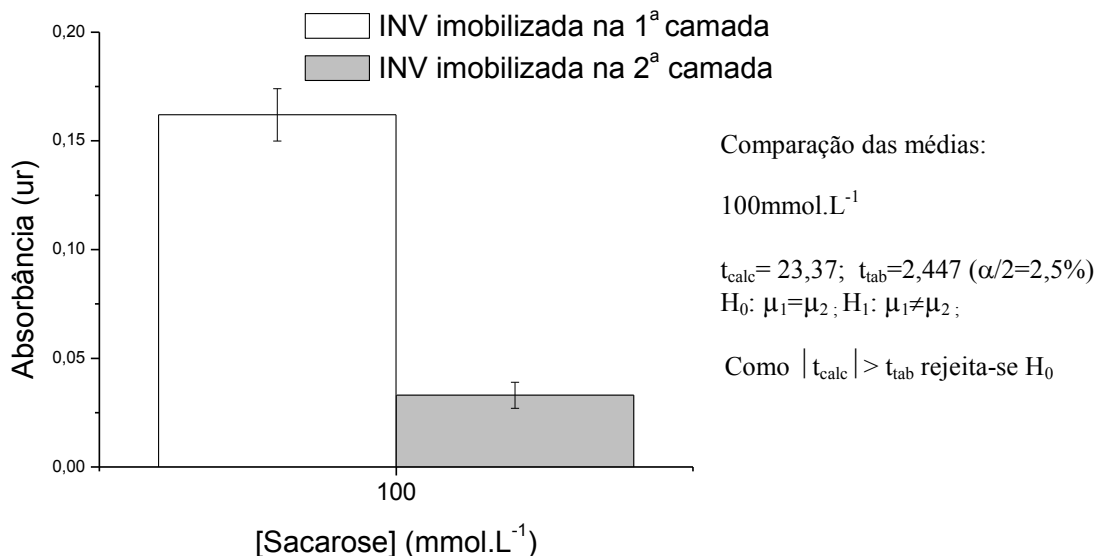


Figura 5.74 – Atividades enzimáticas obtidas quando da avaliação da INV-biot immobilizada na 1ª e 2ª camadas.

As duas cascatas bienzimáticas se mostraram funcionais, atestando o sucesso da operação de biotinizacão da invertase com citrato. A cascata enzimática INV-biot/GOx-biot apresentou melhores resultados que os da cascata GOx-biot/INV-biot, conforme pode ser visto na Figura 5.75.

Este comportamento aparentemente está relacionado com a eficiência das enzimas individuais em relação a sua posição relativa na cascata. Os resultados obtidos, quando da análise individual das enzimas, mostram que a invertase tem sua eficiência melhorada se immobilizada na primeira camada e a GOx melhora sua eficiência quando immobilizada na segunda camada, com estes resultados era esperado a melhor eficiência da cascata INV-biot/GOx-biot.

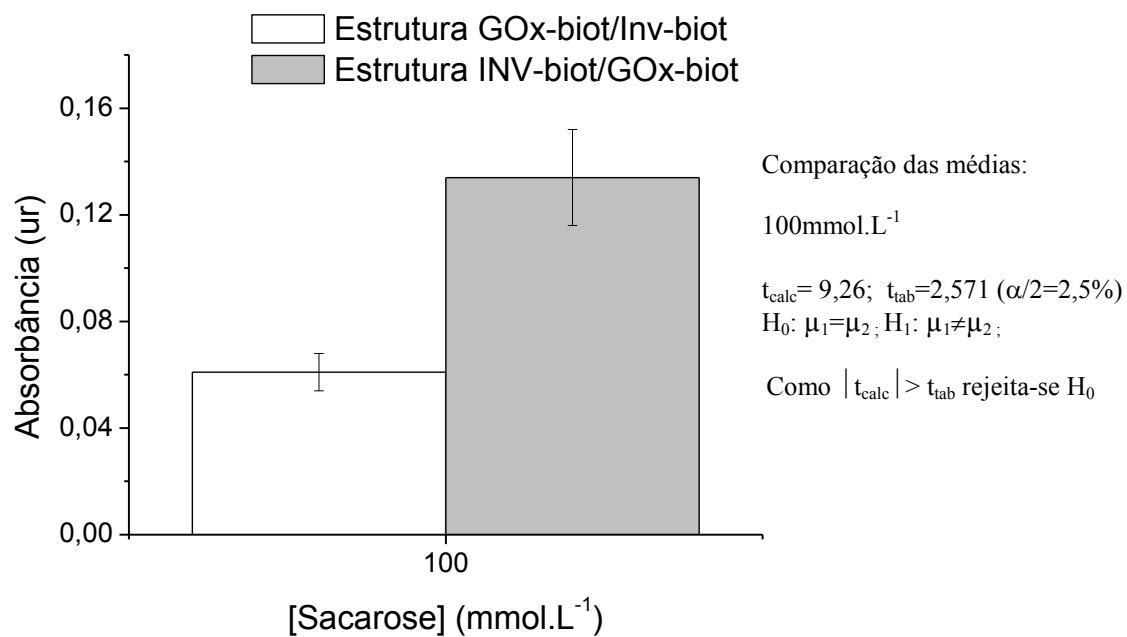


Figura 5.75 – Atividades enzimáticas obtidas quando da avaliação das cascatas bienzimáticas GOx-biot/INV-biot e INV-biot/GOx-biot, tempo = 360 minutos.

6. CONCLUSÕES

Funcionalizações de superfície utilizando-se de organossilanos foram estudadas, onde foi possível concluir que a característica da superfície do suporte funcionalizado está condicionada ao grupo introduzido na sua superfície.

A imobilização de GOx em suporte sólido vítreo manteve a sua atividade bioquímica. Há uma dependência da atividade enzimática da GOx em função da funcionalização do suporte sólido.

Estruturas bienzimáticas e trienzimáticas nanoestruturadas baseadas em imobilização permanente através de ligação covalente e por afinidade foram construídas e: apresentaram resposta catalítica pela injeção de substrato, apresentaram resultados positivos quanto à especificidade e provaram a possibilidade de reuso.

Há uma dependência da atividade enzimática em função da posição relativa ocupada pela enzima na estrutura multienzimática. Não foram evidenciadas restrições difusionais e esta dependência foi creditada aos diferentes microambientes criados em cada situação.

A construção de estruturas multienzimáticas prova o conceito de que a estratégia de imobilização utilizada:

- Preserva as condições para o funcionamento da cascata enzimática, obtida pela imobilização das enzimas apropriadas, e tem potencial para ser entendido para um maior número de enzimas imobilizadas;
- Tem o potencial de ser empregada para imobilização de diferentes biorreceptores.

Foi obtida a otimização da biotinação da invertase, utilizando-se de tampão citrato, em lugar de tampão PBS. A atividade catalítica da enzima biotinizada como o novo processo foi superior ao do anterior.

É importante salientar que as estruturas apresentadas **abrem a um novo conceito** que pode ser explorado para inúmeros propósitos, incluindo os o de nanosensoreamento e mimetização de canais metabólicos.

7. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Estudo da eficiência de biotinação de enzimas em diferentes condições de pH, de acordo com sua faixa ótima de trabalho;
- Construção de cascatas com enzimas biotinizadas com diferentes tampões, de acordo com sua faixa ótima de trabalho;
- Imobilização de cascatas em suportes sólidos móveis, tais como nanotubos de carbono e “quantum dots”;
- Imobilização de diferentes enzimas para a construção de biossensores para detecção de metais pesados, pesticidas, contaminantes alimentares;
- Imobilização de diferentes biorreceptores tais como antígenos ou anticorpos para diferentes aplicações da nanoestrutura baseada na estratégia de imobilização utilizada neste trabalho, tais como detecção de doenças.
- Imobilização de diferentes enzimas no uso em embalagens ativas (“active packing”).

8. CONTRIBUIÇÕES PARA A LITERATURA

▪ Artigos Submetidos

Artigo submetido ao Periódico Biosensors and Bioelectronics em abril de 2012:

Engineering Enzymes Cascades: A Novel Approach for Building Nanostructured Biosensors, Autores: *Marco E. Marques, A. P. Mansur, Herman S. Mansur*.

Artigo submetido ao Periódico Applied Surface Science em maio de 2012:

Chemical Functionalization of Surfaces for Building Three-dimensional Engineered Nanosensors, Autores: *Marco E. Marques, A. P. Mansur, Herman S. Mansur*.

▪ Participação em congressos

Trabalhos completos publicados em anais de congresso:

1. **Organosilane Surface Functionalization for Biosensor Application: VI**
Congresso Latino Americano de Órgãos Artificiais e Biomateriais – Gramado (2010).
2. **Surface Functionalization for Biosensor Application Using Organosilanes : 19º**
CBECiMat (Congresso Brasileiro de Engenharia e Ciência dos Materiais) – Campos do Jordão (2010).

Resumos publicados em anais de congresso:

1. **Surface Functionalization by Silane Nanostructures: IX Braziliam MRS Meeting (SBPMat) - Ouro Preto (2010).**
2. **Evaluation of Glucose Oxidase Immobilization Using Organosilanes for Biosensor Application: X Braziliam MRS Meeting (SBPMat) – Gramado (2011).**
3. **3D Nanostructured Enzymes Cascade for Biosensing Applications: 2nd Nano Today Conference - Hawaii - USA (2011).**
4. **Three dimensional Engineered Nanostructures using Multi-enzymes Cascades: NANOSMAT - Florida - USA (2012).**
5. **Engineering Enzymes Cascades: A Novel Approach for Building Nanostructured Biosensors: Biosensors 2012 – Cancun – México (2012).**

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS-JR, E. C., MAST, R. L., FREE, A. h., Specificity of glucose oxidase, **Archives of Biochemistry and Biophysics**, n.91, n.2, p. 230-234, 1960.

AFAQ, S. e IQBAL, J., Immobilization and stabilization of papain on chelating sepharose: a metal chelate regenerable carrier, **EJB - Electronic Journal of Biotechnology**, v.4, n.3, p. 120-124, 2001.

ALLAIN, C., AUSSERRE, D. e RONDELEZ, F., A new method for contact-angle measurements of sessile drops, **Journal of Colloid and Interface Science**, v.107, n.1, p. 5-13, 1985.

ALMEIDA, A. C. S., ARAÚJO, L. C., COSTA, A. M., ABREU, C. A. M., LIMA, M. A. G. A. e PALHA, M. L. A. P. F., Sucrose hydrolysis catalyzed by auto-immobilized invertase into intact cells of *Cladosporium cladosporioides*, **Electronic Journal of Biotechnology**, v.8, n.1, p. 54-62, 2005.

ALTUN, G. D e CETINUS, S. A., Immobilization of pepsin on chitosan beads, **Food Chemistry**, v.100, p. 964-971, 2007.

ANDRADE, G., MANSUR, A. A. P., STANCIOLI, E. F. B., VASCONCELOS, W. L. e MANSUR, H. S., Design of novel hybrid organic-inorganic nanostructured biomaterials for immunoassay applications, **Biomedical Materials**, v. 1, p. 221-234, 2006.

ARANCIBIA, G. e MORATA, D., Compositional variations of syntectonic white-mica in low-grade ignimbritic mylonite, **Journal of Structural Geology**, v.27, p. 745-767, 2005.

ARIGA K. e HILL, J. P., Layer-by-layer (LbL) assembly, a "gentle yet flexible method toward functional biomaterials, **Material Matters**, v. 3, n.3, p. 57-59, 2008.

ARKLES, B., STEINMETZ, J. R., ZAZYCZNY, J., e MEHTA P., Factors contributing to the stability of alkoxysilanes in aqueous solution, **Journal of Adhesion Science and Technology**, v.6, n.1, p. 193-206, 1992

ARYA, S. K., DATTA, M. e MALHOTRA, B. D., Recent advances in cholesterol biosensor, **Biosensors and Bioelectronics**, v.23, p. 1083-1100, 2008.

ATASHBAR, M. Z., BEJCEK, B, VIJH, A. e SINGAMANENI, S., QCM biosensor with ultra thin polymer film, **Sensors and Actuators B**, v.107, p. 945-951, 2005.

BALDRICH, E., LACZKA, O., CAMPO, F. J. e MUÑOZ, F. X., Self-assembled monolayers as a base for immunofunctionalisation: unequal performance for protein and bacteria detection, **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v.390, p.557–1562, 2008.

BALLY E. W. e GRIBNAU, T. C. J., Some aspects of the chromogen 3,3', 5, 5'-Tetramethylbenzidine as hydrogen donor in horseradish peroxidase assay, **Clinical Chemistry and Clinical Biochemistry**, v.27, p. 791-796, 1989.

BANKAR, S. B., BULE, M.V., SINGHAL, R. S. e ANANTHANARYAN, L., Glucose oxidase –An overview, **Biotechnology Advances**, v.27, p.489-501, 2009.

BARC'H, N. L., GROSSEL, J. M., LOOTEN, P. e MATHLOUTHI, M., Kinetics study of the mutarotation of D-glucose in concentrated aqueous solution by gas-liquid chromatography, **Food Chemistry**, v. 74, p.119-124, 2001.

BASCOM, W. D., Structure of silane adhesion promoter films on glass and metal surfaces, **Macromolecules**, 5,6, 1972, p.792-796.

BERGOGNE, L., FENNOUH, S., GUYON, S., LIVAGE, J. e ROUX, C., Bio-encapsulation within sol-gel glasses, **Molecular Crystals and Liquid Crystals**, v. 354, p. 79-89, 2000.

BESBES, S., OUADA, H. B., DAVENAS, J., POSONNET, L., JAFFREEZIC, N. e ALCOUFFE, P., Effect of surface treatment and functionalization on the ITO properties for OLEDs, **Materials Science and Engineering C**, v.26, p. 505-510, 2006.

BETANCOR, L., LÓPPEZ-GALLEGO, F. e HIDALGO, A., Different mechanisms of protein immobilization on glutaraldehyde activated supports: Effect of support activation and immobilization conditions, **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, p. 877–882, 2006.

BHANDARI, S., GUPTA, V. K. e SINGH H., Enhanced stabilization of mungbean thiol protease immobilized on glutaraldehyde-activated chitosan beads, **Biocatalysis and Biotransformation**, v. 27, n. 1, pp. 71-77, 2009.

BISTRICIC, L., VOLOVŠEK, V. e DANANIĆ, V., Conformational and vibrational analysis of gamma-aminopropyltriethoxysilane, **Molecular Structure**, v. 834–836, p. 355–363, 2007.

BOURHIS, E. L., **Glass mechanics and technology**, 1. ed. Wiley-VHC Verlag, 2008, 366p.

BRUTIN, D., ZHU, Z. Q., RAHLI, O., XIE, J. C. e LIU Q. S. e TADRISH L., Sessile drop I microgravity: creation contact angle and interface, **Microgravity Science technology**, p. 1-10, 2009.

BYFIELD M. P. and ABUKNESHA R. A., Biochemical aspects of biosensors, **Biosensors and Bioelectronics**, v.9, p. 373-400, 1994.

BUERK, D., **Biosensors: theory and applications**, 1.ed., Boca Raton, CRC Press, 1993, 221p.

BUMGARDNER, J. D., WISER, R., ELDER, S. H., JOUETT, R., YANG, Y. e ONG, J. L., Contact angle, protein adsorption and osteoblast precursor cell attachment to chitosan coatings bonded to titanium, **Biomaterial Science - Polymer Edition**, v14, n12, p. 1401– 1409, 2003.

CAMARERO, J. A., Recent developments in the site-specific immobilization of proteins onto solid supports, **PeptideScience**, v.90, n.3, p.450-458, 2007.

CAO, L., Immobilised enzymes: science or art?, **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 9, p. 217–226, 2005.

CAO, T., TANG, H., LIANG, X., WANG, A., AUNER, G. W., SALLEY, S. O. e SIMON Ng, K. Y., Nanoscale investigation on adhesion of E. coli to surface modified silicone using atomic force microscopy, **Biotechnology and Bioengineering**, 94, 1, p. 167-176, 2006.

CARVALHO, N. M. F., PIRES, B. M., ANTUNES, O. A. C., FARIA, R. B., OSÓRIO, R. E. H. M. B., PIOVEZAM, C. e NEVES A., Uso de equações lineares na determinação dos parâmetros de Michaelis-Menten, **Química Nova**, v. 33, n. 7, p.1607-1611, 2010.

CASS T. e LIGLER F. S., **Immobilized biomolecules in analysis: A practical approach**, 1ed., Glasgow, Oxford University Press, 1999, 240p.

CASTILLO J. et al., Biosensors for life quality Design, development and applications, **Sensors and Actuators B**, v. 102, p.179–194, 2004.

CASTRO-ORTÍZ, L. P., PABELLO, V. M. L. e PIETRINI, R.V., Estado del arte y perspectivas del uso de biosensores ambientales en México, **Revista Internacional de Contaminação Ambiental.**, v.23, n.1, pp.35-45, 2007.

CHAMBERS, J. P., ARALANANDAM, B. P., MATTA, L. L., WEIS, A. e VALDES, J. J., Biosensor recognition elements, **Current Issues in Molecular Biology**, v.10, p. 1-12, 2008.

CHANIoTAKIS, N. e SOFIKITI, N. , Novel semiconductor materials for the development of chemical sensors and biosensors: A review, **Analytica Chimica Acta**, v.615, p. 1-8, 2008.

CHAUBEY, A. e MALHOTRA, B. D., Mediated biosensors, **Biosensors and Bioelectronics**, v. 17, p. 441-456, 2002

CHAUHAN, A. K., ASWAL, D. K., KOIRY, S. P., GUPTA, S. K., YAKHMI, J. V., SÜRGER, et al., Self-assembly of the 3-aminopropyltrimethoxysilane multilayers on Si and hysteretic current–voltage characteristics, **Applied Physics A**, v.90, n.3, p. 581–589, 2008.

CHEN, X., ZHU, J., TIAN, R., YAO, C., Bienzymatic glucose biosensor based on three dimensional macroporous ionic liquid doped sol–gel organic–inorganic composite, **Sensors and Actuators B**, v. 163, p. 272-280, 2012.

CHERAN, L-E, et al., Probing the bioelectrochemistry of living cells, **Electrochimica Acta**, v.53, p. 6690-6697, 2008.

CHIANG, C.-H. e KOENIG, J. L., Fourier transform infrared spectroscopic study of the adsorption of multiple amino coupling agents on glass surfaces, **Colloid Interface Science**, v.83, p. 361-370, 1981.

CLARK, J.L.C. e LYONS C. , Electrode system for continuous monitoring in cardiovascular surgery, **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 102, p. 29-45, 1962.

CONSTANTINO, H.R., SCHWENDEMAN, S.P., LANGER, R. e KLIBANOV A.M., Deterioration of lyophilized pharmaceutical proteins, 1998. **Biochemistry (Moscou)**, 63, n.3,p. 357–422, 1998

COPELAND, R. A., **Enzymes: A practical introduction to structure, mechanism, and data analysis**, 2. ed, Wiley-VCH, Inc, 2000, 390p.

COSNIER, F. CELZARD, A., FURDIN, G., BÈGIN, D., MARÊCHÉ, J.F. e BARRÈS, A., Hydrophobization of active carbon surface and effect on the adsorption of water, **Carbon**, v.43, p. 2554–2563, 2005.

COSTA-JR, E. S., STANCIOLI, E. F. B., MANSUR, A. A. P., VASCONCELOS, W. L. e MANSUR, H. S., Preparation and characterization of chitosan/poly(vinyl alcohol) chemically crosslinked blends for biomedical applications, **Carbohydrate Polymers**, V. 76. p. 472–481, 2009.

CUTTER, C. N., Microbial control by packaging: A review, **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 42, n. 2, p. 151–161, 2002.

DAMOS, F. S., Aplicações de QCM, EIS e SPR na investigação de superfícies e interfaces para o desenvolvimento de (bio)sensores, **Química Nova**, v.27, n.6, p. 970-979, 2004.

DHATHATHREYAN, A., Real-time monitoring of invertase activity immobilized in nanoporous aluminum oxide, **Journal of Physical Chemistry B**, v.115, p. 8878-6682, 2011.

DELVAUX, M., WALCARIUS, A. and DEMOUSTIER-CHAMPAGNE, S., Bienzyme HRP-GOx modified gold nanoelectrodes for the sensitive amperometric detection of glucose at low temperatures, **Biosensors and Bioelectronics**, v. 20, p.1587- 1594 , 2005.

DEWICK, P. M., **Essentials of Organic Chemistry: For Students of Pharmacy, Medicinal Chemistry and Biological Chemistry**, 1.ed., John Willey and Sons, 2006, 696p.

EISENTHAL, R. e DANSON, M. J., **Enzyme Assays: A Pratical Approach**, 2 ed. OXFORD, 2002, 302 p.

ELÇIN Y. M. e AKBULUT, U., Polyester film strips coated with photographic gelatin containing immobilized glucose oxidase hardned by chromium(III) sulphate, **Biomaterials**, v. 13, n.3, p. 156-161, 1992

ELNASHAR, M. M. M., Immobilized Molecules Using Biomaterials and Nanobiotechnology, **Biomaterials and Nanobiotechnology**, v.1, p-61-77, 2010

ERDEMIR, S. , Effect of the glutaraldehyde derivatives of Calix[n]arene as cross-linker reagents on lipase immobilization, **Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry**, v.64, p.273–282, 2009.

ESTRELA P., STEWART, A. G. e MIGLIORATO, P., Field effect detection of biomolecular interactions, **Electrochimica Acta**, v. 50, p. 4995-5000, 2005.

FAN, X., WHITE, I.M., SHOPOVA S.I., ZHU, H., SUTER, J. D. e SUN, Y., Sensitive optical biosensors for unlabeled targets: A review, **Analytica Chimica Acta**, v. 620, p.8–26, 2008.

FANJUL-BOLADO, P., GONZÁLES-GARCIA, M. G. e COSTA-GARCIA, A., Amperometric detection in TMB/HRP-based assays, **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v.382, n.2, p. 297-302, 2005.

FERREIRA, V. F. e ROCHA, D. R., Potencialidades e oportuidades na química da sacarose e de outros açucares, **Química Nova**, v. 32. n. 3, p. 623-638, 2009.

FORNERA, S., BALMER, T. E., ZHANG, B., SCHLÜLER, A. D. e WALDE P., Immobilization of peroxidase on SiO₂ surfaces with the help of a dendronized polymer and the avidin-biotin system, **Macromolecular Bioscience**, v.11, p.1052–1067, 2011.

FORTINA, P., KRICKA, L. J. e GRODZINSKI, P., Nanobiotechnology: the promise and reality of new approaches to molecular recognition, **Trends in Biotechnology**, v.23, n.4, p. 168-173, 2005.

FU, J., LIU, M., LIU, Y., WOODBURY, N. W e YAN, H., Interenzyme substrate diffusion for an enzyme cascade organized on spatially addressable DNA nanostructures, **American Chemistry Society**, v.134, p. 5516-5519, 2012.

FRANKS, F., Physical chemistry of small carbohydrates- equilibrium solution properties, **Pure and Applied Chemistry**, v. 59, n. 9, p. 1189-1202, 1987.

GAO, L., WU, J. e GAO, D., Enzyme-Controlled Self-Assembly and Transformation of Nanostructures in a Tetramethylbenzidine/Horseradish Peroxidase/H₂O₂ System, **ACS Nano**, v.5, n.8, p. 6736-6742, 2011.

GARRET, R. H. e GRISHAM, C. M., **Biochemistry**, 4. ed. BROOKS/COLE, 2009, 1021p.

GELEST, INC. Silane Coupling Agents: Connecting Across Boundaries. Boletim Tecnico, 60 p. 2006. Disponivel em: www.gelest.com. Acesso em: agosto de 2010.

GIRAUDEAU, P., LEMEUNIER, P., COUTANT, M., DOUX, J-M, GILBERT, A., REMAUD, G. S e AKOKA, S., Ultrafast 2D NMR applied to the kinetic study of D-glucose mutarotation in aqueous solution, **Spectroscopy and Dynamics**, v.1, n.2, p.1-7, 2011.

GIZELE, E. e LOWE, C. R., **Biomolecular Sensors**, 1.ed., Taylor & Francis, 2002, 319p.

GODDARD, J. M. e ERICKSON, D. et al., Bioconjugation techniques for microfluidic biosensors, **Anal Bioanal Chem** 394, 2009, p.469-479

GOLDSTEIN, J., NEWBURRY, D., JOY, D., LYMAN, C., ECHLIN, P., LIFSHIN, E., SAWYER, e MICHAEL, J, **Scanning Electron Microscopy and X-ray Microanalysis**, 3, ed., Kluwer Academic/Plenum Publishers, 2002, 695p.

GOODWIN, J. W., HASBRON, R. S. e REYNOLDS, P. A., Functionalization of colloidal silica and silica surfaces via silylation reactions, **Colloid & Polymer Science**, v.268, p.766-777, 1990.

GÖPEL W. e HEIDUSCHAKA, P., Interface analysis in biosensor design, **Biosensors and Bioelectronics**, 10, 1995, pp.853-883

GRIESHABER, D., MACKENZIE, R., VÖRÖS, J. e HEIMHULT, E., Electrochemical biosensors - sensor principles and architectures, **Sensors**, n. 8, p.1400-1458, 2008.

GUIMARD, N. K., GOMEZ, N. e SCHMIDT C. E., Conducting polymers in biomedical engineering, **Progress in Polymer Science**, v.32, p. 876-921, 2007.

GUO, Z., GUILFOYLE, R.A., THIEL, A.J., WANG, R. e SMITH, L.M., Direct fluorescence analysis of genetic polymorphisms by hybridization with oligonucleotide arrays on glass supports, **Nucleic Acids Research**, v. 22 , p. 5456-5465, 1994.www

HA, S., GAO, J., TIDOR, B., BRADY, J. W. e KARPLUS, M., Solvent effect on the anomeric equilibrium in D-glucose: A free energy simulation analysis, **American Chemistry Society**, v.113, p. 1553-1557, 1991.

HALLIWELL, C. M., A factorial analysis of silanization conditions for the immobilization of oligonucleotides on glass surfaces, **Analytical Chemistry**, 73, p.2476-2483, 2001.

HALTER, I., Covalently attached organic monolayers on semiconductor surfaces, **Journal of the American Chemical Society**, v.100, n.26, p. 8050-8055, 1978.

HECHT, H. J., KALISZ, H. M., HENDLE, J., SCMID, R. D. e SCHOMBURG, D., Cristal structure of glucose oxidase from *Apergillus Niger* refine at 2.3 Å resolution, **Molecular Biology**, v.229, p. 153-172, 1993.

HERMANSON, G. T., **Bioconjugate techniques**, 2. ed. Elsevier, 2008, 1003p.

HERNÁNDEZ-PADRÓN, G., RODRÍGUEZ R. e CASTAÑERO, V.M., In-situ thiol-modified silica nanoparticles, **Internet Journal of Nanotechnology**, v. 1, n.2, 2005

HOWARTER, J. and YOUNGBLOOD, J. P., Optimization of silica silanization by 3 -aminopropyltriethoxysilane, **Langmuir**, v. 22, p.11142-11147, 2006.

HOSSEINKHANI, S., RANJBAR, B., NADERI-MANESH, H., e NEMAT-GORGAN, M., Chemical modification of glucose oxidase: possible formation of molten globule-like intermediate structure, **Federation of European Biochemical Societies Letters**, v.61, p. 213-216, 2004.

HOU, S., OU, Z., CHEN, Q. e WU, B, Amperometric acetylcholine biosensor based on self-assembly of gold nanoparticles and acetylcholinesterase on the sol-gel/multi-walled carbon nanotubes/choline oxidase composite-modified platinum electrode, **Biosensors and Bioelectronics**, v.33, p.44-49, 2012.

HUNG, T.-C., GIRIDHAR, R. CHOIU, S.-H. e WU, W.-T., Binary immobilization of *Candida rugosa* lipase on chitosan, **Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v.26, p. 69–78, 2003.

IM, J. S., YUM, J., KIM, J. G., BAE, T.-S., e LEE, Y.-S., The effects of carbon nanotube addition and oxyfluorination on the glucose-sensing capabilities of glucose oxidase-coated carbon fiber electrodes, **Applied Surface Science**, v. 258, n.7, p. 2219-2225, 2012.

INTERNATIONAL CRYSTAL MANUFACTURING – site www.icmfg.com, acessado em janeiro de 2011

ISIK, S., ALKAN, S., TOPPARE, L., CIANGA, I. e YAĞCI, Y., Immobilization of invertase and glucose oxidase in poly 2-methylbutyl-2-(3-thienyl) acetate/polypyrrole matrices, **European Polymer Journal**, v. 39, p. 2375–2381, 2003.

ISRAILEV, S., STEPANIANTS, S., BALSERA, M., OONO, Y. e SHULTEN, K., Molecular dynamics study of unbinding of the avidin-biotin complex, **Biophysical Journal**, v.72, p. 1568-1581, 1997.

JEYKUMARY, D. R. S. e NARAYANAN, S. S., Fabrication of bienzyme nanobiocomposite electrode using functionalized carbon nanotubes for biosensing applications, **Biosensors and Bioelectronics**, v. 23, p. 1686–1693, 2008.

JIANG, W. e PEACOR, D. R., Formation and modification of metastable intermediate sodium potassium mica,paragonite, and muscovite in hydrothermally alteredmetabasites from northern Wales, **American Mineralogist**, v. 78, p. 782-793, 1993.

JIANRONG, C., YUQING, M., NONGYUE, H., XIAOHUA, W. and SIJIAO, L., Nanotechnology and biosensors, **Biotechnology Advances**, v.2, p. 505-518, 2004.

JOHNSTONE, S., Is there potential for use of the Hall effect in analytical science?, **Analyst**, v. 133, p. 293–296, 2008.

JOSEPHY, P. D., ELING, T. e MASON, R., The horseradish-catalyzed oxidation of 3,5,3', 5',- Tetramethylbenzidine, **Biological Chemistry**, v. 257, n.7, p.3669 -3675, 1982.

KALLEMPUDI, S.S., GUL, O., BASAGA, H., SEZERMAN, U. e GURBUZ, Y., Label-free biosensors for the detection of cardiovascular risk markers, **Sensors Letters**, v.6, n.6, p.873-877, 2008.

KATHI, J., RHEE, K.-Y. e LEE, H. L., Effect of chemical functionalization of multi-walled carbon nanotubes with 3-aminopropyltriethoxysilane on mechanical and morphological properties of epoxy nanocomposites, **Composites A**, v.40, p.800–809, 2009.

KIM, D. C. e KANG D. J., Molecular recognition and specific interactions for biosensing applications, **Sensors**, v. 8, p. 6605-6641, 2008.

KIM, D.C., SOHN, J. I., ZHOU, D., DUKE, T. A. J. e KANG, D. J., Controlled assembly for well-defined 3D bioarchitecture using two active enzymes, **ACSNano**, v. 4, n.3, p. 1580-1586, 2010.

KÖSTER M., GLIESCHE, C. G. e WARDENGA, R., Microbiosensors for measurement of microbially available dissolved organic carbon: Sensor characteristics and preliminary environmental application, **Applied and Environmental Microbiology**, v.72, n.1, p. 7063–7073, 2006.

KÖHM, M., Immobilization strategies for small molecule, peptide and protein microarrays, **Journal of Peptide Science**, v.15, p. 393–397, 2009.

KOLOMEISKY, A. B., Michaelis–Menten relations for complex enzymatic networks, **The Journal of Chemical Physics**, v. 134, p. 1-6, 2011.

KOTWAL, S.M. e SHANKAR, V., Immobilized invertase, **Biotechnology Advances** v. 27, p.311–322, 2009.

KRAJEWSKA, B. Application of chitin- and chitosan-based materials for enzyme immobilizations: a review, **Enzyme and Microbial Technology**, v.35, p. 126–139, 2004.

KUMAR, D. S., NAIR, B. J., VARGHESE, S. H., NAIR R., HANAJIRE, T., MAEKAWA, T., et al., Blood compatibility of surface modified poly(ethylene terephthalate) (PET) by plasma polymerized acetobromo-a- D-glucose, **Journal of Biomaterials Applications**, v.24, n.6, p. 527-544, 2009.

LÄNGE, K., RAPP, B. E. e RAPP, M., Surface acoustic wave biosensors: a review, **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 391, , p.1509–1519, 2008.

LAVRIK, N. V., SEOANIAK, M. J. e DATSKOS, P. G., Cantilever transducers as a platform for chemical and biological sensors, **Review of Scientific Instruments**, v.76, n.5, p. 2229-2253, 2004.

LESKOVAV, V., TRIVIĆ, S., WOHLFAHRT, G., KANDRAČ, J. e PERIČIN, D., Glucose oxidase from *Aspergillus niger*: the mechanism of action with molecular oxygen, quinones, and one-electron acceptors, **Biochemistry & Cell Biology**, v. 37, p. 731–750, 2005.

LI, B., DU, Y., LI, T. e DONG, S., Investigation of 3, 3', 5, 5'-tetramethylbenzidine as a colorimetric substrate for a peroxidase DNAzyme, **Analytica Chimica Acta**, v.651, p.234-240, 2009.

LI, J., XU, J., FAN, L. e WONG, C. P., Lotus effect coating and Its application for microelectromechanical systems stiction prevention, **Proceedings of the 55th Electronic Components and Technology Conference**, v.2, p.1798-1801, Orlando, FL, Estados Unidos, 2005.

LI, J., DU, Y, SUN, L., LIANG, H., FENG, T., WEI, Y. e YAO, P., Chitosaneous hydrogel beads for immobilizing neutral protease for application in the preparation of low molecular weight chitosan and chito-oligomers, **Journal of Applied Polymer Science**, v. 101, p. 3743–3750, 2006.

LI, Y.-S., DU, Y.-D., CHEM, T.-M. e GAO, X.-F., A novel immobilization multienzyme glucose fluorescence capillary biosensor, **Biosensors and Bioelectronics**, v. 25, p. 1382-1388, 2010.

LIBERTINO, S., AIELLO, V., SCANDURRA, A., RENIS, M. e SINATRA, F., Immobilization of the enzyme glucose oxidase on both bulk and porous SiO₂ surfaces, **Sensors**, v.8, p. 5637-5648, 2008.

LIEBERZEIT P. A. e DICKERT F.L, Rapid bioanalysis with chemical sensors: novel strategies for devices and artificial recognition membranes, **Analytical Bioanalytical Chemistry**, v.391, pp. 1629–1639, 2008.

LISDAT, F. e SCHÄFER D., The use of electrochemical impedance spectroscopy for biosensing, **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v.391, pp.1555–1567, 2008.

LIU, A.-L., ZHOU, T., XU, J. J., LU, Y. CHEM, H. Y. e XIA X. H., Off-line form of the Michaelis–Menten equation for studying the reaction kinetics in a polymer microchip integrated with enzyme microreactor, **Lab Chip**, v. 6, p. 811–818, 2006.

LOGAN T. C. ae CLARK D. S., Photopatterning enzymes on polymer monoliths in microfluid devices for steady-state kinetic analysis and spatially separated multi-enzyme reactions, **Analytical Chemistry**, v.79, p.6592-6598, 2007.

LU, Y-C, CHUANG Y.-S., CHEN, Y.-Y., SHU, A.-C., HSU, H.-Y., CHANG, H.-Y. e YEY, T.-R., Bacteria detection utilizing electrical conductivity, **Biosensors and Bioelectronics**, v.23, p.1856-1861, 2008.

LUONG , H. T., MALE, K. B. e GLENNON, J. D., Biosensor technology: Technology push versus market pull, **Biosensors and Bioelectronics**, v.26, p. 492-500, 2008.

LUPPA P. B, SOKOLL, L. J. e CHAN, D. W., Immunosensors—principles and applications to clinical chemistry, **Clinica Chimica Acta**, v.314, p.1–26, 2001.

MALHOTRA, B. D. e CHAUBEY A., Biosensors for clinical diagnostics industry, **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 91, n. 1, p. 117-127, 2003.

MALIK, V.V., SCHULZE, M.B. e HU, F.B., Intake of sugar-sweetened beverages and weight gain: a systematic review **American Journal of Clinical Nutrition**, v 84, n. 2, p. 274-288, 2006.

MALPIECE, Y., SHARAN, M., BARBOTIN, J.-N., PERSONNE, P. e THOMAS, D., A histochemical model dealing with an immobilized glucose oxidase-peroxidase system, **Histochemistry and Cytochemistry**, v.28, n.9, p. 961-968, 1980.

MANSUR, A., MANSUR, H. e GONZÁLEZ, J., Enzyme-polymers conjugated to quantum-dots for sensing applications, **Sensors**, v. 11, p. 9951-9972, 2011.

MANSUR, A. A. P., NASCIMENTO, O. L., VASCONCELOS, W. L. e MANSUR, H. S., Chemical functionalization of ceramic tile surfaces by silane coupling agents: Polymer modified mortar adhesion mechanism implications, **Materials Research**, v. 11, n. 3, p.293-302, 2008.

MANSUR, H. S., LOBATO, Z. P., ORÈFICE, R. L., VASCONCELOS, W. L., OLIVEIRA, C. e MACHADO, L. J. C., Surface functionalization of porous glass networks: effects on bovine serum albumin and porcine insulin immobilization, **Biomacromolecules**, v. 1, p. 789-797, 2000.

MANSUR, H. S., ORÈFICE, R. L., VASCONCELOS, W. L., LOBATO, Z. P., e MACHADO, L. J. C., Biomaterial with chemically engineered surface for protein immobilization, **Materials Science: Materials in Medicine**, v.16, p. 333– 340, 2005.

MANSUR, H.S. et al, Protein immobilization in PVA hydrogel : A synchrotron SAXS and FTIR Study, **Diffusion and Defect Data Pt.B: Solid State Phenomena**, v.121-123, p. 1355-1358, 2007a.

MANSUR, H.S. et al., QCM and FT-IR study of phospholipid bilayers obtained by Langmuir-Blodgett method, **Diffusion and Defect Data Pt.B: Solid State Phenomena**, v.121-123, p. 863-866, 2007b.

MANSUR, H. S. e COSTA, H., S., Nanostructured poly(vinyl alcohol)/bioactive glass and poly (vinyl alcohol)/chitosan/bioactive glass hybrid scaffolds for biomedical applications, **Chemical Engineering Journal**, v. 137, p.72–83, 2008.

MARANGONI, A. G., **Enzyme Kinetics: a modern approach**, 1. ed. Wiley-Interscience, 2003, 229p.

MARCH, C., MANCLÚS, J. J., JIMÉNEZ, Y., ARNAU, A. e MONTOYA, A., A piezoelectric immunosensor for the determination of pesticide residues and metabolites in fruit juices, **Talanta**, v. 78, n.3, p. 827–833, 2009.

MARQUES, M. E., **Instalação, configuração, padronização e caracterização de equipamento de deposição de filmes moleculares de Langmuir-Blodgett**. Belo Horizonte: Escola de Engenharia da UFMG, 2002, 96p. (Dissertação, Mestrado em Engenharia Metalúrgica).

MARTIN, H. J., SCHULZ, K. H., BUNGARDNER, J. D. e WALTERS, K. B. et al. , XPS Study on the use of 3-aminopropyltriethoxysilane to bond chitosan to a titanium Surface, **Langmuir**, v. 23, p.6645-6651, 2007.

MARTIN, P. e SZABLEWSKY, M., **Langmuir-Blodgett Troughs**. 6.ed. Coventry: Nima Technology, 2001, 132p.

MASON, G. F. e LAI, J. C. K., Nonlinear determination of Michaelis-Menten kinetics with model evaluation through estimation of uncertainties, **Metabolic Brain Disease**, v. 15, n. 2, p.133-149, 2000.

MATEO, C., TORRES, R., FERNÁNDEZ-LORENTE, G., ORTIZ, C., FUENTES, M., HIDALGO, A. et al., Epoxy-amino groups: A new tool for improved immobilization of proteins by the epoxy method, **Biomacromolecules**, v. 4, n.3, p.772-777, 2003.

MATEO, C., PALOMO, J. M., FERNÁNDEZ-LORENTE, G, GUISAN, J. M. e FERNANDEZ-LAFUENTE R., Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques - Review, **Enzyme and Microbial Technology**, v.40, p. 1451–1463, 2007.

MATHLOUTHI, M. e LUU, D. V., Laser-raman spectra of d-fructose in aqueous solution, **Carbohydrate Research**, v. 78, p. 225-233, 1980.

MATINLINNA, J. P. e VALLITTU, P. K., Silane based concepts on bonding resin composite to metals, *Contemporary Dental Practice*, v.8, n.1, p. 1-8, 2007

MICHIGAN STATE UNIVERSITY, site <http://www2.chemistry.msu.edu/faculty>, acessado em fevereiro de 2012.

MILLER, A. e TANNER J., **Essentials of Chemical Biology**, 1. ed. John Wiley and Sons, 2008, 574p.

MOHANTY, S. P. e KOUGIANOS, E., Biosensors:a tutorial review, **IEEE Potentials**, v.25,n. 2, pp. 35-40, 2006.

MONSAN, P. and COMBES, D., Enzyme stabilization by immobilization, **Methods in Enzymology**, v. 137, p. 584-598, 1988.

MORRIN, A., NGAMMA, O., O'MALLEY, E., KENT N., MOULTON, S. E., WALLACE, G. G. et al., The fabrication and characterization of inkjet-printed polyaniline nanoparticle films, **Eletrochimica Acta**, v.53, p.5092-5099, 2008.

MOSSAVARALI, S., HOSSEINKHANI, S., RANIJBAR, B. e MIROLIAEI, M., Stepwise modification of lysine residues of glucose oxidase with citraconic anhydride, **International Journal of Biological Macromolecules**, v.39, p.192–196, 2006.

NAKAMURA, K., NAKAMOTO, T. e MORIIZUMI, T., Classification and evaluation of sensing films for QCM odor sensors by steady-state sensor response measurement, **Sensors and Actuators B**, v.69, n. 3, p. 295-301, 2000.

NAKÉDIA, M. F. C., PIRES, B. M., ANTUNES, O. A. C., FARIA, R. B., OSORIO, R. E. H. M. B., PIOVEZAN, C. e NEVES, A., Uso de equações lineares na determinação dos parâmetros de Michaelis_Menten, **Química Nova**, v.33, n.7, p.1607-1611, 2010.

NANCI, A., WUEST, J. D., PERU, L., BRUNET, P., SHARMA, V., ZALZAL, S. e MCKEE, M. D., Chemical modification of titanium surfaces for covalent attachment of biological molecules, **Biomedical Materials Research**, v.40, n.2, p. 324-335, 1998.

NAPOLI, A, BOERAKKER, M. J., TIRELLI, N., NOLTE, R. J. M., SOMMERDIJK, N. A. J. M. e HUBBELL, J. A. Glucose-oxidase self destructing polymeric vesicles, **Langmuir**, v.20, n. 9, p. 3487-3491, 2004.

NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION, site www.ncbi.nlm.nih.gov, acessado em março de 2012.

ODENDAAL, R., **A Biochemical and immunological study of horseradish peroxidase**, Stellenbosch, África do Sul: Universidade de Stellenbosh, 2009,108p. (Dissertação, Mestrado em Bioquímica).

OLIVEIRA, R. F., MORAES, M. L., OLIVEIRA-JR, O. N. e FERREIRA, M., Exploiting cascade reactions in bienzyme layer-by-layer films, **Physcal Chemistry C**, v.115, p.19136-19140, 2011.

OKAFOR, C., GROOMS, D., ALOCILJA, E. e BOLIN S., Fabrication of a novel conductometric biosensor for detecting mycobacterium avium subsp. paratuberculosis Antibodies, **Sensors**, n.8, , p. 6015-6025, 2008.

ORÉFICE, R. L., PEREIRA, M. M. e MANSUR, H. S., **Biomateriais fundamentos & aplicações**, 1. Ed., Cultura Médica, 2006, 538p.

OZYILMAZ, G., TUKEL, S. S., e ALPTEKIN, O. Activity and storage stability of immobilized glucose oxidase in magnesium silicate, **Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 35, n. 4-6, p. 154-160, 2005.

PAL, S., ALOCILJA, E. C. e DOWNES, F. P., Nanowire labeled direct-charge transfer biosensor for detecting Bacillus species, **Biosensors and Bioelectronics**, v.22, p. 2329–2336, 2007.

PANDEY, P., SINGH, S. P., ARYA, S. K., GUPTA, V. DATTA, M., SINGH, S. e MALHOTRA, B. D., Application of thiolated gold nanoparticles for the enhancement of glucose oxidase activity, **Langmuir**, v.23, p. 3333-3337, 2007.

PENG, G., ZHAO, C., LIU, B., Ye, F. e JIANG, H., Immobilized trypsin onto chitosan modified monodisperse microspheres: A different way for improving carrier's surface biocompatibility, **Applied Surface Science**, v. 258, n. 15, p. 5543-5552, 2012.

PESCADOR, P., KATAKIS, I., TOCA-HERRERA, J. L. e DONATH, E., Efficiency of a bienzyme sequential reaction system immobilized on polyelectrolyte multilayer-coated colloids, **Langmuir**, v. 24, p. 14108-14114, 2008.

PROTEIN DATA BANK, site **www.rcsb.org**, acessado em março de 2012.

RAHIMI, A., GHARAZI, S. ERSHAD-LANGROUDI, A. e GHASEMI, D., Synthesis and characterization of hydrophilic nanocomposite coating on glass substrate, **Applied Polymer Science**, 102, p. 5322–5329, 2006.

RATNER, B. D., HOFFMAN, A. S., SCHOEN, F. J. and LEMONS, J., **An introduction to materials medicine**, 2.ed., San Diego, Elsevier Inc, 2004, 851p.

REED, G. e NAGODAWITHANA, T.W., **Biotechnology: a multi volume comprehensive treatise**, vol. 9, 2. Ed., Verlagsgesellschaft, 804p, 1995.

RHEE, S. G., CHANG T.-S., JEONG, W. e KANG, D., Methods for detection and measurement of hydrogen peroxide inside and outside of cells, **Molecules and Cells**, v. 29, p. 539-549, 2010.

ROCHA, F. R. P. e TEIXEIRA, L. S. G., Strategies to increase sensitivity in UV-VIS spectrophotometry, **Química Nova**, v.25, n.5, p.807-812, 2004.

ROGER, K. R., Recent Advances in biosensor techniques for environmental monitoring, **Anal Quimica Ata**, p.223–231, 2006.

ROSTAMI, M., MOHSENI, M. e RANJBAR, Z., Investigating the effect of pH on the surface chemistry of an amino silane treated nano silica, **Pigment and Resin Technology**, v. 40, n. 6, p. 363 – 373, 2011

RUSMINI, F., ZHONG, Z. e FEIJEN, J., Protein immobilization strategies for protein biochips, **Biomacromolecules**, v.8, p.1775-1789, 2007.

SÁDECKÁ, J. e POLONSKÝ, J., Electrophoretic methods in the analysis of beverages, **Journal of Chromatography A**, v. 880, p. 243–279, 2000.

SAHOO, S. K., PARVEEN, S. e PANDA, J. J., The present and future of nanotechnology in human health care, **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, v.3, p. 20– 31, 2007.

SALEM, M., MAUGUEN, Y. e PRANGÉ, T., Revisiting glutaraldehyde cross-linking: the case of the Arg-Lys intermolecular doublet, **Acta Crystallographica**, v.66, p.225-228, 2010.

SANTOS, F. R., **Orientação de anticorpos em alumínio, empregando monocamadas auto-organizadas para produção de microsensores capacitivos**, Recife: Universidade Federal de Pernambuco, 2008, 58p. (Dissertação: Mestrado em Ciências Biológicas).

SASSOLAS, A., BLUM, L. J. e LECA-BOUVIER, B. D., Immobilization strategies to develop enzymatic biosensors, **Biotechnology Advances**, v. 30, n.3, p. 489-511, 2012.

SAWADA, H., SUZUKI, T., TAKASHIMA, H. e TAKISHITA, K., Preparation and properties of fluoroalkyl end-capped vinyltrimethoxysilane oligomeric nanoparticles— A new approach to facile creation of a completely superhydrophobic coating surface with these nanoparticles, **Colloid and Polymer Science**, v.286, p.1569–1574, 2008.

SHEFFIELD HALLAM UNIVERSITY, site [www:teaching.shu.ac.uk/hwb/chemistry](http://www.teaching.shu.ac.uk/hwb/chemistry), acessado em janeiro de 2012.

SCHOFFELEN, S. e HEST J. C. M. V., Multi-enzyme systems: bringing enzymes together in vitro, **Soft Matter**, v. 8, p 1736-1746, 2012.

SCHRAY. K.J, GERGITIS III, F., NIEDBALA, R. S., Improved biotinylation of glucose-6-phosphate dehydrogenase using active-site-blocking agents, **Analytical Biochemistry**, v.149, n.1, p. 225-228, 1985.

SCOPUS, site www.scopus.com, acessado em janeiro de 2012.

SHELDON, R. A., Enzyme immobilization: The quest for optimum performance, **Advanced Synthesis and Catalysis**, v. 349, p. 1289 – 1307, 2007.

SHENG, Y.-J., JIANG, S. e TSAO, H.-K. et al., Effects of geometrical characteristics of surface roughness on droplet wetting, **Chemical Physics**, v. 127, n.234704, p. 1-7, 2007.

SINGH, B. K. e HILLIER, A. C., Multicolor surface plasmon resonance imaging of ink jet-printed protein microarrays, **Analytical Chemistry**, v.79, n.4, p. 5124-5132, 2007.

SOLDATKIN, O. O., KUCHERENKO, I. S., PYESHKOVA, V. M., KUJLA, A. L., JAFFREZIC-RENAULT, N., EL'SKAYA A.V. et al, Novel conductometric biosensor based on three-enzyme system for selective determination of heavy metal ions, **Bioelectrochemistry**, v.83 p. 25–30, 2012.

SOLOMONS, G. e FRYHLE, C., **Química orgânica volume 2**, 7. ed., Livros Técnicos e Científicos Editora, 2002, 463p.

SONG, Y., QU, K., ZHAO, C., REN, J. e QU, X., Graphene Oxide: Intrinsic peroxidase catalytic activity and its application to glucose detection, **Advanced Materials**, v. 22, p. 2206–2210, 2010.

SØNDENGAARD, C. R., MCINTOSH, L. P., POLLASTRI, G. e NIELSEN, J. E., determination of eletrostatic interaction energies and protonation state populations in enzyme activity sites, **Molecular Biology**, v.376, p. 269-287, 2008

SU, Q e KLINMAN P. K., Nature of oxygen activation in glucose oxidase from *Aspergillus niger*: The importance of electrostatic stabilization in superoxide formation, **Biochemistry**, v. 38, p. 8572-8581, 1999.

SUBRAMANIAN A., KENNEL, S. J., ODEN, P. I., JACOBSON, K. B., WOODWARD, J. e DOKTYCZ, M. L., Comparison of techniques for enzyme immobilization on silicon supports, **Enzyme and Microbial Technology**, v. 24, p. 26–34, 1999.

SUN, J, ZHOU, H., JIN, Y., WANG, M., LI, Y. e GU, N., Magnetically Enhanced Dielectrophoretic assembly of horseradish peroxidase molecules: Chaining and molecular monolayers, **Chemical Physics and Physical Chemistry** , v. 8, p.1847–1850, 2008.

SUPPAKUL, P., MILTZ, J., SONNVELD, K. e BIGGER, S. W., Active Packaging Technologies with an Emphasis on Antimicrobial Packaging and its Applications, **Food Science**, v.68, n.2, p. 408-420, 2003.

SVOBODOVÁ, L., ŠNEJÁRKOVÁ, M. e HIANIK, T., Properties of glucose biosensors based on dendrimer layers.Effect of enzyme immobilization, **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v.373, pp.735–741, 2002.

SZILI. E. J., JANE, A., LOW, S. P., SWEETMAN, M., MACARDLE, P., KUMAR, S., SMART, R.S.C., e VOELCKER, N. H., Interferometric porous silicon transducers using enzymatically amplified optical signal, **Sensors and Actuators B**, v.160, p.341-348, 2011.

TABOADA-PUIG, R., JUNGHANNS, C., DEMARCHE, P., MOREIRA, M. T., FEIJOO, G., LEMA, J. M. e AGHATOS, S.N., Combined cross-linked enzyme aggregates from versatile peroxidase and glucose oxidase: Production, partial characterization and application for the elimination of endocrine disruptors, **Bioresourse Technology**, v.102, p. 6593-6599, 2011.

TEULON, J.-M., DELCUSE, Y., ODORICO, M., CHEN, S.-W. W., PAROT, P. e PELLEQUER, J.-L., Single and multiple bonds in (strep) avidin-biotin interactions, **Molecular Recognition**, v.24, p-490-502, 2011.

THÉVENOT, D. R., TOTH, K., DURST, R. A. e WILSON, G. S., Electrochemical biosensors: Recommended definitions and classification, **Biosensors and Bioelectronics**, v.16, p.121-131, 2001.

TISCHER, W. and KASCHE V. Immobilized enzymes: crystals or carriers?, **Trends in Biotechnology**, v. 17,n. 8, p. 326-335, 1999.

TOBISKA, P. e HOMOLA, J. Advanced data processing for SPR biosensors, **Sensors and Actuators B**, v. 107, n. 1, p-162-169, 2005.

TSOUTI, V., CHATZANDROULIS, S., GOUSTOURDIS, D., NORMAND, P. e TSOUKALAS, D., Design and fabrication of a Si micromechanical capacitive array for DNA sensing, **Microelectronic Engineering**, v.85, p.1359–1361, 2008.

TURNER, A. P. F, KARUBE, I., and WILSON, G.S., Biosensors Fundamentals and Applications, 1.ed., Oxford: Oxford University Press, 1987, 770p.

TZANOV, T., COSTA, S. A., GÜBITZ, M., e CAVACO_PAULO, A., Hydrogen peroxide generation with immobilized glucose oxidase for textile bleaching, **Biotechnology**, v. 93, p. 87–94, 2002.

UNICAMP, site www.fop.unicamp.br/microbiologia, acessado em dezembro de 2010.

UNIPROT, site www.uniprot.org, acessado em fevereiro de 2012.

UNIVERSITY OF COLORADO, site www.orgchem.colorado.edu/Spectroscopy, acessado em março de 2012

UKEDA, H., FUJITA, Y., OHIRA, M. e SAWAMURA, M., Immobilized enzyme-based microtiter plate assay for glucose in foods, **Agricultural Food Chemistry**, v. 44, p. 3858-3863, 1996.

UKEDA, H, OHIRA, M., SARKER, A. K. e SAWAMURA, M., Deposition of glucose oxidase on the surface of microtiter plate: its application to determination of glucose in foods, **Food Research International**, v. 31, n. 4, pp. 297-302, 1998.

VEITCH, N. C., Horseradish peroxidase: a modern view of a classic enzyme, **Phytochemistry**, v. 65, p. 249–259, 2004.

VERHAVERBEKE, S. e PARKER, J. W., The role of the peroxide anion as an oxidizer in SC-1 solutions. In: FIFTH INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON CLEANING TECHNOLOGY, 1997, Paris. **Proceedings of the fifth international symposium on cleaning technology**. Pennington, Electrochemical Society, 1997, p 184-192.

VISSER, S. P, SHAIK, S., SHARMA, P. K., KUMAR, D. e THIEL, W., Active Species of horseradish peroxidase (HRP) and cytochrome P450: Two electronic chameleons, **American Chemical Society**, v.125, p.15779-15788, 2003.

WANG, J., Glucose Biosensors: 40 Years of advances and challenges, **Electroanalysis**, v., 13, n. 12, p. 983-988, 2001.

WANG, T., TURHAN, M. e GUNASEKARAN, S., Selected properties of pH-sensitive, biodegradable chitosan–poly(vinyl alcohol) hydrogel, **Polymer International**, v.53, p. 911-918, 2004.

WANG, Z.-H. e JIN, G., Covalent immobilization of proteins for the biosensor based on imaging ellipsometry, **Immunological Methods**, v.285, p. 237– 243, 2004.

WILSON, R e TUNER, A. P. F., Glucose oxidase: An ideal enzyme, **Biosensors and Bioelectronics**, v.7, p. 165-185, 1992.

XIAO, S.-J., TEXTOR, M. e SPENCER, N. D., Covalent attachment of cell-adhesive, (Arg-Gly-Asp)-containing peptides to titanium surfaces, **Langmuir**, v.14, p. 5507-5516, 1998.

XIE, X. L., TANG, C.-Y., ZHOU, X.-P., LI, R. K.-Y., YU, Z.-Z., ZHANG, Q.-X. et al., Enhanced interfacial adhesion between PPO and glass beads in composites by surface modification of glass beads via in situ polymerization and copolymerization, **Chemistry of Materials**, v.16, p.133-138, 2004.

XU, R., DING, H. , LI, W, WANG, D. e XI, S., FTIR-ATR study of self-assembled thiol monolayers on gold, **Supramolecular Science**, v.5, p.607-609, 1998.

YAGAR, H., ERTAN, F. e BALKAN, B., Comparison of some properties of free and immobilized α -amylase by *Aspergillus Sclerotiorum* in calcium alginate gel beads, **Preparative Biochemistry & Biotechnology**, v.38, p. 13–23, 2008.

YUWONO, A. S. e LAMMERS, P. S., Odor pollution in the environment and the detection instrumentation- Invited Overview Paper, **Agricultural Engineering International: the CIGR Journal of Scientific Research and Development**, v. 6, p.1-33, 2004.

YOSHIDA, W., CASTRO, R. P., JOU, J.-D.e COHEN, Y., Multilayer alkoxy silane silylation of oxide surfaces, **Langmuir**, v. 17, p. 5882-5888, 2001.

YUK J. S., JIN, J-H., ALOCILJA, E. C., e ROSE, J. B., Performance enhancement of polyaniline-based polymeric wire biosensor, **Biosensors and Bioelectronics**, v.24, p. 1348-1352, 2009.

ZIEGLER, C., Cantilever-based biosensors, **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 379, p. 946–959, 2004.

10.ANEXOS

10.1.Trabalho Submetido ao Periódico Biosensors and Bioelectronics em abril de 2012

10.2.Trabalho Submetido ao Periódico Applied Surface Science em maio de 2012

**10.1 Trabalho Submetido ao Periódico Biosensors and Bioelectronics em
abril de 2012**

Engineering Enzymes Cascades: A Novel Approach for Building Nanostructured Biosensors

(Biosensors 2012 - Special Issue of Biosensors & Bioelectronics. Theme: Nanobiosensors, nanomaterials & nanoanalytical systems)

Marco E. Marques, A P Mansur, Herman S. Mansur*

Department of Metallurgical and Materials Engineering, Federal University of Minas Gerais, Brazil.

hmansur@demet.ufmg.br

This research reports for the first time a novel approach for developing nanostructured enzymatic systems with pre-designed 3D architectures using chemically functionalized supports. Silica glass slides were surface-modified by reacting with alkoxy silanes chemical groups using water hydrolysis at room temperature. The functionalization of the supports was characterized by contact angle measurements and FTIR spectroscopy. The first enzyme layer was covalently immobilized to the support by the bi-functional linker glutaraldehyde (GA). In the sequence, the second enzyme layer was assembled using the protein affinity method based on the strong “biotin-avidin” interactions. Each enzyme was previously submitted to the biotinylation procedure before being incorporated to the system, where the avidin was used as the intermediate linker between consecutive enzyme layers. The biochemical response was assayed at all steps in order to certify that the enzymatic bioactivity was retained throughout the layer-by-layer (LBL) process. Thus, the new model of building 3D-enzymatic systems was evaluated using two alternated enzymatic structures with glucose oxidase (GOx) and horseradish peroxidase (HRP): GOx-HRP and HRP-GOx. It was verified that amino-functionalized supports have presented the best results regarding to the bioactivity. Moreover, both bi-enzyme arrangements have demonstrated biochemical activity upon injecting the glucose substrate into the system. The intensity and overall kinetics of the enzymatic catalysis were dependent on the relative position of each enzyme on the designed 3D-nanostructures. Finally, as a proof of concept, the bi-enzyme systems were assayed using real samples of regular and sugar-free soft drinks where they successfully behaved as biosensors for glucose with the built-in 3D nanohybrid structure. These findings open an entire new class of promising nanomaterials to be investigated for a myriad of analytical and nanosensing applications.

KEYWORDS: Surface modification, Nanomaterials, Nanostructures, Nanocatalysis, Biosensor, Bioconjugates.

GRAPHICAL ABSTRACT

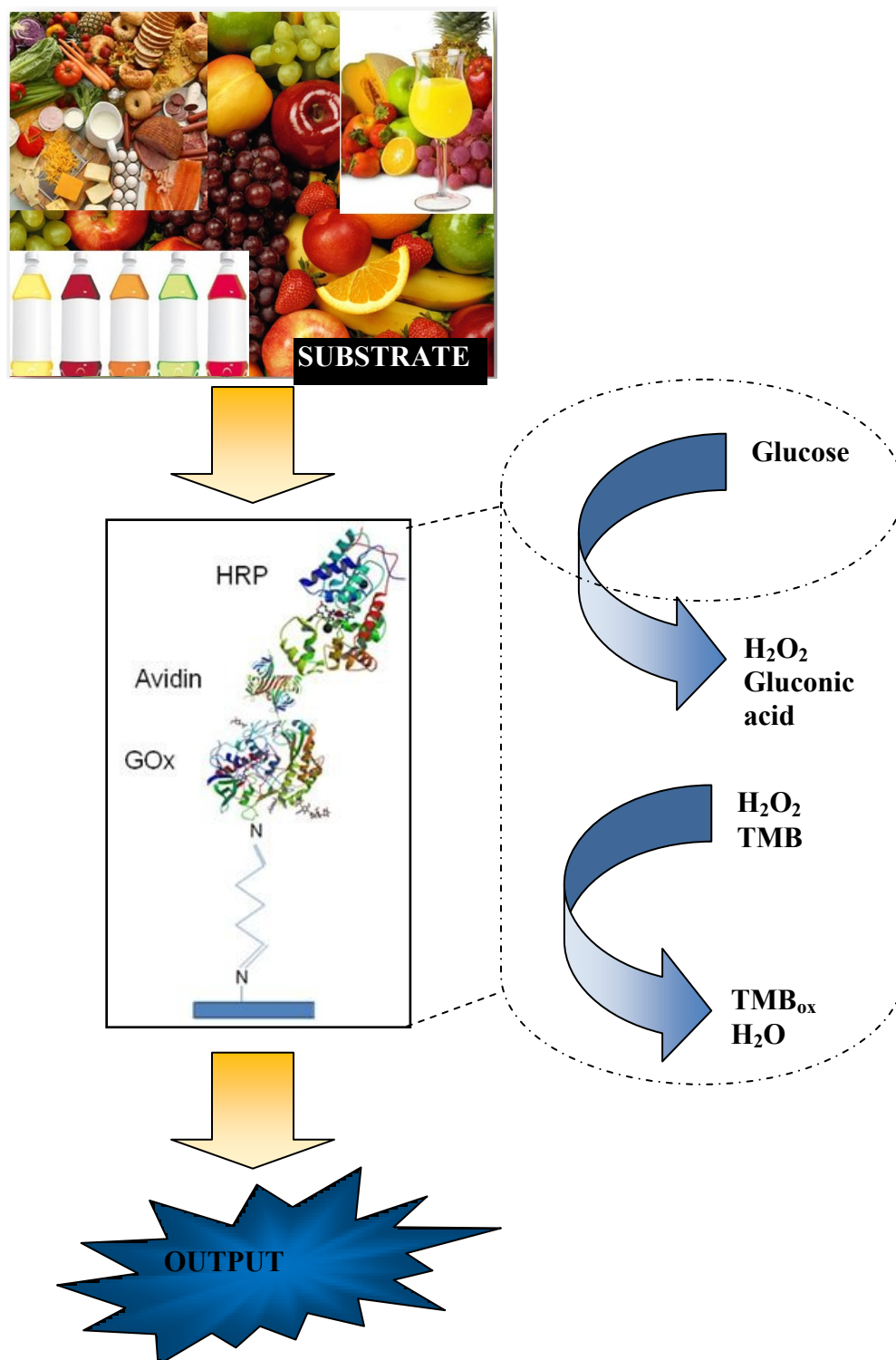


Figure. Schematic representation of food nanobiosensor.

1. Introduction

The new properties and functionalities that emerge from three-dimensional (3D) nanostructures built by combining materials and molecules from different classes, inorganic and organic, natural and synthetic, controlled at the nano-order size are a relatively unexplored realm of science. Moreover, the integration of biology, materials science and engineering creates the rather promising field of research referred as bionanotechnology. In that sense, biosensors are typical outcomes of the bionanotechnology study, and although a great deal of publications have been reported, the subject is very far from being entirely understood and much effort are still required to accomplish the enormous demands of the contemporary society.

As a consequence, research of new biosensors as well as the development of the existent designs has literally experienced drastic advances in the last years. The main driving force for this activity is the increasing necessity for miniaturized biosensors, particularly for biomedical applications (Delvaux et al., 2005). Thus, the use of physics and chemistry associated with nanotechnology is revolutionizing the perspectives in the biosensor construction and potential applications (Chen et al., 2012; Jeykumary and Narayanan, 2008; Jianrong et al., 2004). The actual control of systems at extremely low dimension brings the possibility of designing complex 3D-nanostructures, sometimes foreseeing the best possible overall performance. The development of biosensors through the application of successive organized layers in a controlled procedure has been a dynamic area of research. Especially layer-by-layer (LBL) technology has demonstrated to be a versatile technique for organizing the structures and tailoring the properties of the nanomaterials at molecular level (Kin et al., 2010; Pescador et al., 2008). Amongst various alternatives of detecting molecules, since the second half of the 20th century especial attention has been given to the immobilization of enzymes in biosensors due to the series of advantages of this approach in comparison with the early methods of free enzyme sensing (Cao, 2005; Peng et al., 2012). Immobilization of enzymes by their covalent coupling to insoluble matrices has called the interest of scientists for decades. The strength of binding is very strong and usually quite low amount desorption of the enzyme from the support

occurs. The relative effectiveness of various chemical groups found in enzymes for making the covalent link with the solid support depends upon several factors, such as their availability and chemical reactivity, the last associated with the nucleophilicity. The reactivity of the protein side-chain nucleophiles is determined by their state of protonation (i.e. polarization and charges) which depends on the presence of ionizing moieties in the molecule and the pH of the solution medium (Andrade et al., 2006; Mansur et al. 2005; Hermanson, 2008; Sondengaard et al., 2008, Su and Klinman, 1999; .

On the other side, the chemical functionalization of the insoluble matrices has been intensively investigated by our group (Andrade et al., 2006, 2008; Costa et al, 2008; Mansur, A.A.P. et al., 2008; Mansur and Mansur, 2011; Mansur, H.S. et al., 2000, 2001, 2002) aiming at tailoring the surfaces of materials to a broad range of purposes, mostly focused on biomedical and bio-sensing applications. Thus, the organosilanes, such as trialkoxysilanes, have been the most frequent choice for surface modification due to their versatility and relative facile use for coupling reactive or relatively inert materials with biomolecules, like proteins, enzymes, carbohydrates, and nucleic acids. For that reason, the systematic use of immobilization of organofunctional groups has increased in the past decades, mainly on silica, because this support offers pronounced advantages over other organic/inorganic supports. Among the many available reagents for linking biomacromolecules, glutaraldehyde (GA) has undoubtedly found the widest application in diverse fields, including for enzymes immobilization. Glutaraldehyde can react with several functional groups of enzymes, such as amine, thiol, because the most reactive amino acid side-chains are nucleophiles. The reaction of aldehydes with primary amines forms chemically stable imine derivatives, also known as “Schiff bases”, (compounds having a C=N function). Similarly, other reactive groups like hydroxyls react with GA leading to the formation of acetal bonds. Therefore, the covalent immobilization of the chemically functional molecule offers the relative stability most often required for the development of reliable biosensors.

Bionanotechnology in food industry is a relatively novel area of research, offering attractive perspectives for developing innovative sensing and analytical systems. For instance, the detection of fruit odors (“electronic nose”), beverages taste (“electronic tongue”), potential toxicity of contaminants, “shelf-life” stability of food for consumers at

the point-of-sale (PoS), among innumerable other opportunities are yet to be explored by the scientists and industries. Traditionally, the sensing of carbohydrates (i.e. sugars) and its derivatives have been the common choice for developing/testing and expand the theme of biosensors and biochemical analysis. The detection of sugars through the use of enzymatic biosensors is particularly important (Campuzano et al., 2004). Consequently, biosensing systems based on the enzymatic reaction of β -D-glucose with glucose oxidase (GOx) have been often utilized as a model that could be extended and applied in more bioanalytical methods and different substrates (Mansur, A.A.P. et al, 2011). Nevertheless, that should not be considered a restriction of the research, but a conceptual approach for comparison with other similar systems. Moreover, in the field of food research and industrial needs, the comprehensive analysis using sensing method based on sugar detection is of paramount importance.

The main goal of this research was to build 3D-nanostructured enzymatic multilayers for biosensing, and the concept modeled by using two enzymes: glucose oxidase from *Aspergillus Niger* (GOx) and horseradish peroxidase (HRP). The insoluble support was chemically functionalized for covalent immobilization of the enzymes aiming at more stability of the system. The double-layered enzymatic systems were assayed as food biosensor using two alternated assemblies with glucose as the primary substrate. To the best of our knowledge, this is the first study to report such complex bi-enzymatic architectures with the overall behavior determined at the molecular scale.

2. Materials and Methods

2.1 Materials

Hydrogen peroxide (33% v/v), ammonium hydroxide (30%) and hydrochloric acid (>96%) were supplied by Vetec, Brazil. Nitric acid (65%), methanol (99,8%) and ethanol (95%) were supplied by Synth, Brazil. 3-aminopropyl-trimethoxysilane (APTMS, 97%), 3-mercaptopropyl-trimethoxysilane (MPTMS, 95%), 1,5-pentane-dial, (glutaraldehyde, GA, 25% aqueous solution), glucose oxidase from *Aspergillus Niger* (GOx), β -D-glucose (99.5%), horseradish peroxidase (HRP), 3,3',5,5' tetramethylbenzidine (TMB), biotin N-hydroxysuccinimide ester (NHS-biotin, \geq 98% HPLC), avidin from white egg (\geq 98%), dimethyl sulfoxide (DMSO), tween 20, sodium phosphate dibasic (>99%), sodium chloride

(>99.5%), potassium chloride (>99%), and potassium phosphate monobasic (>99%) were purchased from Sigma-Aldrich, USA. DI water was obtained from Milli-Q water system.

Insoluble supports for immobilization of enzymes were microscope glass slides and aminated modified polystyrene microplates (Corning® 96 Well Clear Polystyrene Amine Surface Stripwell™ Microplate, Product #2388). Soda-lime glass is a readily available and inexpensive support with homogeneous chemical composition, $\text{SiO}_2=(75\pm 5)$ wt%; $\text{Na}_2\text{O}=(15\pm 2)$ wt%; $\text{CaO}+\text{MgO}=(10\pm 2)$ wt%. Besides, it is amenable to surface chemical modification using silanization chemistry (Guo et al, 1994). Commercial polystyrene (PS) plates modified to possess positively charged amine groups (2×10^{13} reactive sites/cm²) that replace benzene ring at the surface can be used for covalent immobilization of biomolecules offering an appropriate functional amine or carboxyl groups via bifunctional crosslinkers.

2.2 Chemical Functionalization of insoluble support

2.2.1 Method of Surface functionalization

Glass tile surfaces were prepared with two silane coupling agents (Fig. 1a), each with specific functionality (R_n): thiol (R_1 : -SH) (Fig. 1b) and amino (R_2 : -NH₂) (Fig. 1c). Glass slides without any chemical modification (“as-supplied”) were used as reference for the enzyme adsorption and compared with chemically immobilized systems. Prior to silane reaction, glass surface impurities were fully removed by immersion in 20% nitric acid at (25±3)°C for 24h, followed by deionized (DI) water rinse. Hydroxylation (-OH) was conducted by soaking glass slides in a 70:30 mixture of DI water:30% hydrogen peroxide (H₂O₂) at (75±5)°C for 45min. Then, 5 mL of NH₄OH (conc.) was added for each 100mL of the H₂O:H₂O₂ solution. After cooling, glass slides were copiously rinsed in DI water and dried in methanol. The increase in the hydroxyl groups is usually recommended before performing silane reactions on the surfaces. This process enhances the density of available sites for silane reaction, improving the efficiency and repeatability of the surface modification process. The hydroxyl functionalization of glasses leads to the formation of silanol groups (Si-OH) at solid surface related to the reaction of silicon incomplete bonds minimizing free energy. The effect of this hydrophilic chemical functionalization with silanol groups in enzyme immobilization and activity was also evaluated (Fig. 1d).

INSERT FIGURE 1

Surface modification procedure with organosilanes was conducted using the sol-gel deposition process from aqueous alcohol solution. A 25% methanol:75% distilled water solution was adjusted to pH (4.5 ± 0.2) with acetic acid. Then, silane was added to yield a 2% (v/v) final concentration and 10 minutes were allowed for hydrolysis and silanol formation. Glass slides were immersed in this solution for 30 min and, after that, they were rinsed with ethanol to remove from glass surface unbounded silane and cured at $(110\pm 10)^\circ\text{C}$ for 30 min.

2.2.2 Characterization of Surface functionalization

The influence of surface functionalization on the hydrophilic/hydrophobic behavior of glass slide was estimated via contact angle measurements that were carried out by depositing 50 μL DI water ($18.0\text{M}\Omega$) droplets on the glass slides. The apparatus used for measurements was a digital camera DSC-W70 (Sony) with digital image analysis software.

FTIR was used to characterize the presence of organic chemical groups at the surface of inorganic glass slides, reflecting the effectiveness of the developed procedure for chemical functionalization. Transmission technique was used (Nicolet 6700, Thermo Electron Corp.) within the range between 4000 and 2400cm^{-1} . This range was chosen because it contains most important peaks of $-\text{CH}$ stretching and functional groups without overlapping with glass characteristic peaks. Each spectrum was recorded with resolution of 2 cm^{-1} with a total of 32 scans.

2.3 Enzyme biotinylation for affinity conjugation

Enzyme biotinylation was carried out with NHS-biotin. The chemical group NHS reacts with amines from proteins that are present in lysine aminoacids and in a lower proportion on NH_2 located in terminal peptidic chains to form an amide bond. NHS-biotin (3.0 mg) was dissolved in DMSO (200 μL) and the solution volume was brought to 500 μL with phosphate buffer saline (PBS, pH = 7.4). Enzymes GOx (1.8 mg) or HRP (1.7 mg) were dissolved in a volume of 250 μL of this solution and incubated at $(23\pm 3)^\circ\text{C}$ for 4h. The

biotinylated enzyme was purified and concentrated using ultra-centrifugal device with 30,000 M_w cutoff cellulose membrane (Amicon filter, Millipore). Centrifugation was conducted for 20 min (4 cycles x 5 min per cycle, at 12,000 r.p.m., 4°C) using a Hettich Mikro 200R centrifuge. After the first cycle, it was washed 3 times with PBS. The resulting biotinylated enzyme (GOx-biot or HRP-biot) was resuspended in PBS and stored at (-16°C±2)°C until further use.

2.4 Immobilization of enzyme to the insoluble support

Enzyme was immobilized onto functionalized supports using glutaraldehyde (GA) as bi-functional crosslinking agent (Fig. 2). First of all, the immobilization of the linker onto the glass slide was conducted. Hydroxyl-modified and thiol-modified substrates were immersed into a solution of glutaraldehyde (10% v/v) adjusted to pH= (3.0±0.1) using HCl solution (0.1 mol.L⁻¹). Amino-modified supports were also immersed into 10% GA solution, but without pH correction (5.2±0.1). The solid supports were kept in the solution for about 10 min at room temperature, (25 ± 3)°C. After that, they were rinsed successively with PBS (4 times) in order to remove all remaining excess of unreacted glutaraldehyde. After that, the chemically functionalized solid supports were submerged into a GOx solution (5 U.mL⁻¹ in PBS) at (6±2)°C for 24 h (overnight incubation). Under these conditions, glutaraldehyde groups react preferably with the amino-group of the enzymes. After the immobilization, the supports were cleaned with 0.05% Tween-20 in phosphate buffered saline (PBS-T). Lastly, the systems were dipped for at least 30 min at (6±2)°C in PBS media for removing some possibly non-specific adsorbed enzymes.

INSERT FIGURE 2

2.5 Bi-enzymatic structures

3D-nanostructured multilayer enzyme assembly was built on the surface of aminated modified polystyrene microplates. The first enzyme layer was covalently bonded to the amino group by the bi-functional linker glutaraldehyde (GA). In the sequence, the second enzyme layer was assembled using the protein affinity method based on the strong

“biotin-avidin” interactions. Figure 3 shows the schematic diagram of the multilayer enzyme assemblies with two different architectures.

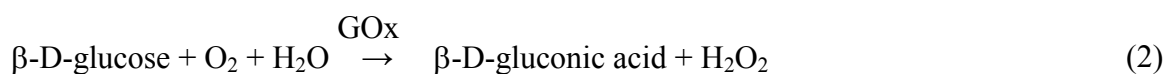
INSERT FIGURE 3

Figure 4 presents the flowchart of the entire process for the multilayer biotin-labeled enzyme assembly. The microplate cavities were filled with GA, protein, and enzyme solutions following the volumes, concentrations, and incubation periods specified in Figure 4 at $(25 \pm 3)^\circ\text{C}$.

INSERT FIGURE 4

2.6 Sensor Activity of GOx structures for Glucose Detection

A biochemical method was utilized for characterizing the activity of enzymes. The detection of glucose was based on the widely reported protocols using the enzymes reactions in cascade, i.e. GOx and HRP (Davidsson et al., 2004; Josephy et al., 1992; Mansur, A.A.P. et al. 2011). In short, the activities of mono-enzymatic (GOx immobilized onto glass slides) and in the bi-enzymatic structures were tested by sensing β -D-glucose with the horseradish peroxidase mediated oxidation of 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine hydrochloride (TMB) by H_2O_2 . The GOx catalyzed oxidation process of glucose produces gluconic acid and H_2O_2 . HRP was used to analyze hydrogen peroxide via the biocatalyzed oxidation of TMB (TMB_{ox}). The oxidized specie TMB_{ox} can be detected by UV-vis measurements at different wavelengths (210-215 nm; 290-295; 360-370 nm and 645-655nm). The representation of the overall reaction is shown in Equation 1 and Equation 2.



2.6.1 Activity of GOx in solution (“free”)

The activity of GOx and GOx-biot dissolved in phosphate saline buffer (PBS, pH 7.4, $0.25 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$) was measured as follows: TMB was dissolved in DI water (1 mg/mL). β -

D-glucose (50 mmol.L⁻¹) and HRP were dissolved in PBS (85 U.mL⁻¹). The assay of peroxidase activity, which is an indirect assay of glucose oxidase activity, was prepared by adding DI water (1200 μL), PBS (variable to compensate substrate solution volume), GOx (120 μL, final concentration in cuvette ~ 0.01 U.mL⁻¹), HRP (60μL, final concentration in cuvette ~ 5 U.mL⁻¹), and TMB (300μL, final concentration in cuvette = 0.1 mg/mL) into the quartz cuvette ($V_{\text{total}} = 3\text{mL}$). The experiment was initiated by injecting different amounts of glucose (substrate) into the mixture of TMB, GOx, HRP, water, and PBS at room temperature aiming at the following final concentrations of glucose in the cuvette: 1.0 mmol.L⁻¹, 2.5 mmol.L⁻¹, 5.0 mmol.L⁻¹, 10.0 mmol.L⁻¹, 15.0 mmol.L⁻¹, and 20.0 mmol.L⁻¹. The increase in the UV-vis absorbance at 650 nm (Li et al., 2009; Song et al., 2010) was monitored as a function of time (Perkin-Elmer, Lambda EZ-210, wavelength from 800 nm to 500 nm, transmission mode). Control samples were prepared and subtracted from the measured absorbance using at least two replicates ($n \geq 2$).

2.6.2 Activity of Monoenzymatic Nanostructured Biosensor - GOx

The activity of GOx immobilized onto functionalized glass slides was detected using a method similar to that used to “free” GOx in solution. However, in the first case, the GOx solution was not added. Instead, the glass slide sample with GOx immobilized was introduced into the quartz cuvette containing ~ 5 U.mL⁻¹ HRP, 0.1 mg.mL⁻¹ TMB, and glucose (1.0 mmol.L⁻¹, 2.5 mmol.L⁻¹, 5.0 mmol.L⁻¹, 10.0 mmol.L⁻¹, 15.0 mmol.L⁻¹, or 20.0 mmol.L⁻¹) in a water/PBS solution ($V_{\text{total}} = 3\text{mL}$). Control samples were prepared and subtracted from the measured absorbance using at least two replicates ($n \geq 2$).

Saturation curves for immobilized GOx onto the hydroxyl and silane-modified solid phases were obtained plotting the initial rate of the reaction (v_o) over the range of substrate concentrations tested, glucose [S]. The [Michaelis–Menten \(M-M\) kinetic model](#) (Equation 3) was fitted to the data (Origin 8.0 Microcal software) and the constants K_m , the Michaelis Constant, and V_{max} , enzyme maximum rate, were obtained. For comparison, curves of v_o x [S] were also obtained for dissolved GOx solution and GOx adsorbed onto glass slides.

$$v_o = (V_{\text{max}} \times [S]) / (K_m + [S]) \quad (3)$$

2.6.3 Activity of bi-enzymatic nanostructures

The enzymatic cascade reaction shown in Equations 1 and 2 was also applied for evaluating the activity of GOx-HRP enzymes immobilized onto aminated polystyrene microplates (PS-NH₂). In this case, each microplate cavity (“well”) was filled ($V_{\text{total}} = 100\mu\text{L}$) with a water/PBS solution containing TMB ($0.1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) and β -D-Glucose ($1.0 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ or $15.0 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$). The absorbance associated with the oxidized specie TMB_{ox} in each well was recorded at $\lambda=655\text{nm}$ in a microplate reader (iMarkTM, Bio-Rad Lab. Inc.). The relative bioactivity was calculated by subtracting control absorbance using a minimum of six replicates ($n\geq 6$).

3. Results and Discussion

3.1. Chemical Functionalization of insoluble support

At this point, before presenting the results, it is important to make clear the choices made for developing the multi-enzymatic biosensors in this research. Briefly, enzymes, also referred as biocatalyst, can be usually “temporally” or “permanently” immobilized on insoluble supports. A biomolecule is termed “immobilized” if its mobility has been restricted by chemical or physical means. This relative restraint of mobility may be achieved by several different methods, for instance by covalent bonding or by adsorption to the support. Both methods have positive and negative aspects regarding to their potential use for building sensing systems. So, in this study, the covalent immobilization procedure was chosen because the major focus was to build well-organized complex nanostructures where the chemical stability of the overall system would be the critical. Thus, the insoluble supports were submitted to chemical functionalization aiming at developing more suitable surfaces for posterior enzyme attachment.

3.1.1 Contact angle evaluation

The contact angle has been used quite often as a relatively simple method for accessing the preliminary properties of surfaces as a result of their chemical or physical modifications. In Fig. 5 it is shown the dependence of the contact angle with the different insoluble supports due to the chemical functionalization of the surfaces. As a general trend, the contact angle was significantly affected by the introduction of hydrophilic/hydrophobic species. That means, based on the results,

the hydrophobicity of the surfaces increased in the following sequence of chemical groups: hydroxyls < “as-supplied glass slide” < amines < thiols. So, the results for contact angles (mean \pm error) as a function of chemical groups added to the surfaces are summarized in Table.1. These values were coherent with the published reports dealing with alkylsilanes as modifiers for surfaces, networks and matrices (Chauhan et al., 2008; Howarter and Youngblood et al., 2006; Mansur, H.S. et al. 2000, 2005; Mansur and Costa, 2008).

Therefore, it can be stated that the developed procedure for altering the surface properties based on chemically changing the surfaces of glass slides was successful. That can be attributed to the effective behavior of the organosilane modifiers (amine, APTMS and thiol, MPTMS) to reacting with the silanol groups on the surface of the glass slides under the appropriate processing conditions (pH, incubation time, buffer, temperature, and others). Essentially, the organosilanes would undergo a double-step process of hydrolysis and condensation allowing the formation of stable covalent bonds with the insoluble support. In the first step, the hydrolysis of alkoxides with water leads to the formation of hydroxyl groups (silanol) and alcohol. In the second phase, silanols are metastable units which undergo self-condensation to thermodynamically more stable units with Si–O–Si siloxane bonds (“oxygen bridging”) by elimination of water (Bisticic et al., 2007; Mansur, H.S. et al, 2000). Prior to this reaction, the glass slides were chemically etched with strong acid oxidizing medium ($\text{HNO}_3/\text{H}_2\text{O}_2$) to significantly increase the density of available hydroxyl sites on the surface for the later reaction. The organic chemical groups (i.e. amine or thiol) are not hydrolysable and will remain unreacted throughout the procedure for future coupling with the enzymes. A more in-depth analysis of the functionalization reactions taking place is beyond the scope of this study and similar chemical modification of insoluble supports has previously reported by our group (Mansur, A.A.P. et al., 2008; Mansur, H.S. et al., 2000).

INSERT FIGURE 5

INSERT TABLE 1

3.1.2 FTIR spectroscopy

Figure 6 shows the FTIR spectra of glass slides “as-supplied” and modified with trialkoxysilanes. It can be observed the presence of the –CH stretching vibration bands ($2850\text{--}3000\text{cm}^{-1}$) mainly associated with the propyl spacer group introduced by the organic functionalization of the glass surfaces. Another important broad peak from $3500\text{--}3200\text{ cm}^{-1}$ is attributed to the amine (-NH_2) symmetrical vibration (Costa-Júnior et al., 2009) from organofunctional group of APTMS. Therefore, the proposed procedures have proven to be effective on producing chemically modified surfaces with different functionalities on the inorganic substrates. Silanes have masked the glass slide hydroxyl groups and imposed their own surface properties. These findings are of paramount importance considering that the covalent bond between the modified support and the enzyme will occur at these sites through the bi-functional GA linker.

INSERT FIGURE 6

3.2. Immobilization of enzyme to the insoluble support

The enzyme glucose oxidase was immobilized to the previously chemically functionalized supports using glutaraldehyde. Based on spectroscopic results (FTIR, UV-visible, not shown) and endorsed by the literature (Costa-Júnior et al., 2009; Migneault et al., 2004, 790-802; Okuda et al., 1991) glutaraldehyde has acted as the bi-functional linker, forming stable covalent bonds between the chemical groups from the insoluble supports with the amine group of the enzyme. That means, under the appropriate processing conditions (pH, incubation time, buffer, temperature, etc) depending on the different chemical groups, amine, hydroxyl and thiol, the reactions with GA have formed covalent bonds, imines, acetals, thioacetals, respectively (Andrade et al., 2006, 2008; Costa-Júnior et al., 2009; Migneault et al., 2004, Okuda et al., 1991). The schematic representation of mono-enzymatic nanostructure is shown in Figure 7.

INSERT FIGURE 7

3.3. Activity of Monoenzymatic Nanostructured Biosensor - GOx

The biosensor activity of the monoenzymatic nanostructures was evaluated and the results of GOx immobilized onto amine-modified solid support are shown in Fig. 8a over reaction time (β -D-glucose concentration of 15mmol.L^{-1}). The assay is based upon the injection of specific substrate for the enzyme (GOx), i.e. the glucose solution in the system and measuring the spectrometric biochemical response as the reaction time evolved. The monitoring mechanism utilized the cascade of chemical reactions (Equation 1 and Equation 2), related to the oxidation of the reagent (TMB, catalyzed by the enzyme horseradish peroxidase, HRP) with the by-product (hydrogen peroxide) resulting from the enzymatic oxidation of glucose (Fig. 8b). In Fig. 8a (insert) is also presented the hydrogen peroxide concentration increase with the time as a consequence of the reaction taking place catalyzed by the enzyme (GOx), assuming the molar extinction coefficient ($\text{L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$) of TMB_{ox} equal to $3.0 \times 10^4 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ (Josephy et al., 1982; Rhee et al., 2010). It should be said that these results are very relevant as far as the enzyme activity is concerned, because the immobilization process could have caused denaturation or hindered the enzyme catalytic site. Hence, the proposed immobilization process in the present study may have altered the 3D conformation of the enzyme due to the chemical covalent bond with the functionalized insoluble support but has retained its main biochemical activity.

INSERT FIGURE 8

In order to compare the effect of the different surface modifiers (hydroxyl, amine, and thiol) in the biosensor activity, Fig. 9a presents the UV-vis curves (from 800 nm to 500 nm) obtained 9 min after the injection of the substrate β -D-glucose (15.0 mmol.L^{-1}). The biosensor response upon concentration of substrate of 5.0 mmol.L^{-1} and 15 mmol.L^{-1} is summarized in Fig. 9b. In Fig. 9a it is also displayed the results from GOx adsorbed on glass slides un-treated (“as-supplied”) for comparison with the covalently immobilized systems. The chemical functionalization process of the insoluble support surfaces has shown a dramatic effect on the response of the biosensor. It is noteworthy that the system with GOx immobilized on the amine-modified support has provided the highest enzymatic activity to both enzyme concentrations tested. Next, the biosensor with the GOx covalently bonded to thiol-glass slide. The use of amine-modified solid phase has shown a remarkable

increase in the absorbance of 500% compared to the hydroxylated-supports or adsorbed systems. Furthermore, the sensing response (absorbance) of the monoenzymatic systems was clearly proportional to the concentration of the glucose when it was raised by three times (i.e. from 5.0 to 15.0 mmol.L⁻¹).

INSERT FIGURE 9

Kinetics studies were conducted by plotting the reaction rate versus substrate concentration (Fig. 10 insert). In all cases, there is an almost linear initial rise in the reaction velocity, but as the concentration increases, the enzyme saturation could be seen as an asymptotic flattening of the curve. This relationship is an indicative of hyperbolic Michaelis-Menten behavior and plotted data (glucose conversion rate x β -D-glucose substrate concentration) were fitted to the M-M equation (Fig. 10). The curves were found to follow the M-M model and the obtained K_m (Michaelis constant for free enzymes) or K_m' (apparent Michaelis constant for immobilized enzymes) and V_{max} are shown in Table 2.

INSERT FIGURE 10

INSERT TABLE 2

The Michaelis constant, K_m , measured for “free” GOx, (18.3±3.9) mmol.L⁻¹, is coherent with the reported value by Ukeda et al. (1998), (19±2.2) mmol.L⁻¹, that evaluated the GOx enzyme activity in a medium (PBS, pH=7.2) similar to our experiments. On the other hand, dissimilar values were also reported in literature (Elcin and Akbulut, 1982; Ozyilmaz et al., 2004) due to the fact that enzyme activity is highly pH-dependent. The K_m' values for the enzymatic systems permanently immobilized on the solid-phases may be attributed to the combination of a number of effects taking place. In that sense, it could be similar (Li et al., 2001; Wang et al., 2005), higher (Bladino et al., 2001; Bulmus et al., 1997; Le et al., 1998; Ozyilmaz et al., 2004; Redinha et al., 1989; Suve et al., 1998), or lower (Pandey et al., 2007; Svobodová et al., 2002; Yagar et al., 2008) than the values measured from “free” enzymes. As shown in Table 2, K_m' value of thiol-immobilized GOx was more than three times higher and V_{max} was three times lower than those of “free”

enzyme in buffer medium. In general, according to Ozyilmaz et al. (2004) it is expected that K_m' values of immobilized enzymes were higher and V_{max} values were lower than free enzymes, mainly due to diffusion limitations and steric hindrances in the immobilized forms. Tukul et al. (2004) considers the migration of substrate from the solution to the microenvironment of an immobilized enzyme the major factor that cause an increase in apparent Michaelis constant value. In the case of thiol-modified supports, the increase of K_m' may also be associated with the formation and exchange of disulfide covalent bonds. GOx from *Aspergillus niger* is a dimer that contains two disulfide bonds (-S-S-), two free sulfhydryl groups (-SH) (Tsuge et al., 1975) and two tightly bound flavine adenine dinucleotide (FAD) cofactors (Swoboda, 1965) that are the active sites of the enzyme (Redinha et al., 1989). It is well established that the stability of enzymes is significantly affected by different types of interactions including disulfide bonds, hydrophobic forces, hydrogen bonds, ionic interactions and van der Waals forces (Gulla et al., 2004; Tsuge et al., 1975). Besides that, Costantino et al. (1998) reported that proteins with both disulfide (-S-S-) bonds and free thiols (-SH) may aggregate via thiol-disulfide exchange. Hence, it is reasonable to assume the formation of disulfide bonds between thiol groups from the modified solid support and cysteine residues of GOx. That would lead to some conformational rearrangement of the enzyme altering its biological activity (Sela and Lifson, 1959). Moreover, the formation of disulfide bonds may have inactivated some GOx molecules by blocking the active site of the enzyme. Besides that, a higher density of bonding sites between the enzyme and the insoluble support may slow down substrate diffusion causing a decrease of enzyme activity (Emregul et al., 2005). Thiol-disulfide exchange is not expected during enzyme immobilization or testing because it is necessary the presence of deprotonated thiolate form and the pKa of thiol group is about 8.3.

On the other hand, the K_m' obtained for GOx immobilized onto amine-modified insoluble support was almost three-fold lower than that for constant (K_m) for “free” GOx in aqueous medium. The observed low value of K_m' reflects the high affinity and the enhanced activity of the immobilized GOx on amine-modified solid support, indicating that enzymes conformational changes, interaction between enzymes, microenvironment and/or surface chemical and physical properties have facilitated substrate access to active enzyme sites (Pandey et al., 2007; Svobodová et al., 2002). It has been reported that surface

properties of support can have substantial influence on the distribution of the substrate (Svobodová et al., 2002) with hydrophilic character helping the diffusion of the substrate from the bulk to the support (Wang et al., 1998). In our case, despite the overall hydrophobic feature of surface (Section 3.1.1), attributed to propyl groups of silane, the organofunctional specie $-NH_2$ is predominantly hydrophilic which may have favored the diffusion of β -D-glucose to surface.

The obtained K_m' is lower than some glucose biosensors reported in literature based on GOx immobilized onto several dissimilar solid supports: ZnO:Co nanoclusters (21 mmol.L⁻¹) (Zhao et al., 2007), polypyrrole films (37.6 mmol.L⁻¹) (Uang et al., 2003), nano-CaCO₃ (21.4 mmol.L⁻¹) (Shan et al., 2007), prussian blue/MWCNT nanocomposites (18 mmol.L⁻¹) (Zhu et al., 2006), colloidal gold-MWCNT/Teflon (14.9 mmol.L⁻¹), MWCNT/Teflon composite electrodes (30 mmol.L⁻¹) (Manso et al., 2007), PMMA-MWCNT(PDDA) composite nanofibrous electrodes (10.1 mmol.L⁻¹) (Manesh et al., 2008), composite ceramic-carbon (20 mmol.L⁻¹) (Sampath et al., 1996), and ZnO nanotubes (19 mmol.L⁻¹) (Kong et al., 2009). Consequently, despite some differences of the sensing systems, based on the results, it can be affirmed that the GOx covalently bonded to amine-modified support developed in this research possesses a higher affinity to glucose (substrate) than other glucose biosensors published in the literature.

In addition, the apparent Michaelis constant for hydroxyl-immobilized GOx system was statistically equivalent to that for “free” enzyme, $K_m' = (13.6 \pm 7.6)$ mmol.L⁻¹ and $K_m' = (18.3 \pm 3.9)$ mmol.L⁻¹, respectively, suggesting that the overall kinetics behavior was not limited by substrate mass transfer (Wang et al., 2005; Svobodová et al., 2002).

Based on the saturation curves (absorbance at 650 nm x time) for all glucose concentrations (1.0 mmol.L⁻¹, 2.5 mmol.L⁻¹, 5.0 mmol.L⁻¹, 10.0 mmol.L⁻¹, 15.0 mmol.L⁻¹, or 20.0 mmol.L⁻¹) and different immobilized systems, calibration curves for glucose detection were obtained (Fig. 11). The absorbance at 3 min was chosen (linear range of absorbance x time curve) for classifying this sensor of glucose into a kinetic assay (Ukeda et al., 1998). For GOx immobilized on amine-modified support (Fig. 11a), the linear response range of calibration curves was 1-15 mmol.L⁻¹ ($R^2=0.96$); for thiol-modified (Fig. 11b) is 1-20 mmol.L⁻¹ ($R^2=0.98$) and hydroxyl- modified (Figure 11c) is 1-5 mmol.L⁻¹ ($R^2=0.99$). The linear regression equations are shown in the graphs (Fig. 11). In order to

guarantee a sensitive assay for the substrate, its concentration in the sample to be measured should be below K_m' .

INSERT FIGURE 11

3.4. Activity of bi-enzymatic structure

In the construction of enzyme sensors, it is desirable to obtain the highest V_{max} (fastest rate) and lowest K_m' (greatest affinity) possible values (Bradley and Rechnitz, 1984). From the results of Section 3.3, it was not possible to match both requirements and amine functionalized support would be the best choice for the construction of an immobilized enzyme structure involving GOx from the point of view of apparent K_m' value. In order to acquire several replicates simultaneously, leading to a more statistical representative results with seconds, functionalized amine glass slides were replaced by aminated modified polystyrene microplates (PS-NH₂). Moreover, such system would be easier to be moved to the industrial scale with automated process. K_m' and V_{max} for GOx immobilized on surface modified microplates were evaluated (data not shown). Apparent Michaelis constant value has not presented any significant difference from GOx immobilized onto amine-glass slides and V_{max} was improved reaching the desired fastest rate.

First of all, GOx and HRP enzymes were biotin-labeled because the multilayer of bi-enzymatic structure was assembled using the “biotin-avidin” affinity interactions. After biotinylation procedure, both enzymes (GOx-biot and HRP-biot) remained active but with some reduction of its activity (less than 30%). The reduction of activity and even inactivation after attaching biotin to enzyme has been reported by several authors (Schray et al., 1985).

The 3D-nanostructured multilayer enzyme with two different architectures (Structure 1 and Structure 2) were built on the surface of aminated microplates and tested by adding β -D-glucose solutions (1 mmol.L⁻¹ or 15 mmol.L⁻¹). Figure 12 shows the cascade reactions involved in the detection of biochemical activity upon injecting the glucose substrate into the system. Also, it presents the position of each substrate relative to its specific catalyst. Glucose is added in bulk solution and has to diffuse to reach the GOx active site where, in the presence of O₂ dissolved in the aqueous medium, is converted into

gluconic acid and hydrogen peroxide. H_2O_2 product is the substrate for peroxidase. It needs to diffuse across interenzyme solution reaching HRP where, in presence of the chromogenic substrate, produces oxygen radicals that oxidize TMB to TMB_{ox} yielding a blue color detected at 655 nm.

INSERT FIGURE 12

Biosensor responses of the 3D bi-enzymatic structures were evaluated and the results are shown in Figure 13 (β -D-glucose concentrations of 1.0 mmol.L^{-1} and 15.0 mmol.L^{-1} after 50 min of substrate introduction in the media). Both bi-enzyme arrangements have demonstrated biochemical activity upon injecting the glucose substrate into the system indicating that immobilization and assembling processes did not result in inactivation of catalytic sites. The absorbances of the bi-enzymatic structures were influenced by the concentration of the glucose and, in each structure, sensing response for control and 1 mmol.L^{-1} and 15 mmol.L^{-1} substrate concentrations were significantly different.

It could also be observed that the intensity and the kinetics of the enzymatic catalysis were dependent on the relative position of each enzyme on the designed 3D-nanostructures. Structure 1 (GOx-biot/HRP-biot) has presented a response at least 1.5 times higher than the measured for Structure 2 (HRP-biot/GOx-biot). This behavior is the overall result of diffusion pathways across solution and interenzymes, cross-linker agent and pH of immobilization, pH of activity tests and its effects in enzymes and solid support (microenvironment), concentration of immobilized enzymes and protein (avidin), among others (Elcin and Akbulut, 1982; Fu et al., 2012; Gulla et al., 2004; Hermanson, 2008; Ozyilmaz et al., 2004; Sondengaard et al., 2008, Su and Klinman, 1999; Svobodová et al., 2002; Tsuge et al., 1975; Ukeda et al. 1998; Wang et al., 1998). It should be highlighted that the difference in the biochemical response between the two alternated well-defined nanostructures has proven the topographical dependence of the active site in multi-enzymatic cascades systems. This opens a realm of opportunities to be explored and investigated based on the combination of different enzymes with alternated layered sequences for novel sensing methods and devices in innumerable areas of analysis.

INSERT FIGURE 13

As a proof of concept, the bi-enzyme systems built in this study were assayed using real samples of regular and “sugar-free” soft drinks. In brief, the food and beverage industry is a very broad and highly profitable market. Among the long list of products, the area of non-alcoholic beverages, like “soft drinks” and “energy drinks”, has been very attractive but also has called the attention and concern due to the increasing number of health problems in the population associated with obesity and weight-related diseases, promoting diabetes in children and adults, dental decay, hypertension and a host of other problems. A soft drink (also called soda, or carbonated beverage) is a beverage that typically contains water (often, but not always carbonated water), a sweetener, and a flavoring agent. Regular soft drinks are sweetened with cane (Latin America, Africa) or beet sugar (Europe), high-fructose corn syrup (HFCS, USA), or blends of these sweeteners. These sugars result in a mixture of sucrose and/or fructose and glucose in the final product. Most diet soft drinks are sweetened with aspartame. The typical total sugar content of regular soft drink (1 can of 355 mL or 12 oz in the United States) is approximately of 39g or ~11,5 wt% on average, with the sugar in the form of HFCS (~45% glucose and 55% fructose) (Sadecka and Polonsky, 2000; Malik et al., 2006).

For the reasons previously mentioned, one soft drink (Sprite™, Coca Cola Company) was selected as the “real” sample used for testing the multi-enzymatic systems with different nanostructures built in this research.

The results are presented in Figure 14. It can be observed the development of the blue color in the cavities with the sugar-sweetened soft drink (Figure 14, left) compared to the unchanged color of the cavities with sugar-free samples (Figure 14, right). The results were equivalent for both bi-enzymatic nanostructures tested, GOx-biot/HRP-biot (Structure 1) and HRP-biot/GOx-biot (Structure 2). These findings are very significant as far as the food/beverage nanotechnology research is concerned because the nano-scale highly integrated system developed in this study was validated using commercial samples with the presence of all interferents in the medium without compromising the bioactivity response. It should be said that the quantitative analysis was not the goal but a proof of the feasibility

of building a novel nano-biosensor using 3D nanohybrid structure with “bottom-up” approach.

INSERT FIGURE 14

4. Conclusion

In this study, a novel approach for engineering multi-enzymatic nanostructured biosensors was developed. The systems were pre-designed and built using covalent immobilization of enzymes onto chemically functionalized insoluble supports. In addition, a sequence of enzyme layers was assembled by LBL method using “avidin-biotin” affinity interactions. The intensity and kinetics of the multi-enzymatic catalysis were dependent on the relative position of each enzyme on the designed 3D-nanostructures. The difference can be attributed to multifactorial aspects like steric hindrance, conformational restriction of the active sites of enzymes, diffusion of substrate to the reaction sites, pathways and mechanisms of the enzymatic cascade events occurring at the nano-environment scale. As a proof of concept, the bi-enzyme systems were assayed using commercially available samples of sugar-sweetened and “sugar-free” soft drinks. They successfully performed as glucose biosensors with the complex built-in 3D hybrid architectures. Finally, based on the results, it can be stated that a whole new class of promising nanomaterials may be explored for innumerable analytical and nano-sensing purposes, such as in food and beverages industries, detection of allergenic species, screening-tests for toxic components and contamination, and many others.

Acknowledgments

The authors gratefully acknowledge the financial support from the Brazilian Research funding agencies, CAPES, FAPEMIG and CNPq.

References

- Andrade, G.I., Mansur, A.A.P., Stancioli, E.F.B., Vasconcelos, W.L., Mansur, H.S., 2006. *Biomedical Materials* 1, 221-234.
- Andrade, G.I., Stancioli, E.F.B., Mansur, A.A.P., Mansur, H.S. 2008. *Journal of Materials Science* 43, 450-463.
- Blandino, A., Macias, M., Cantero, D., 2001. *Process Biochem.* 36, 601–606.
- Bisticic, L., Volovšek, V., Dananić, V., 2007. *Journal of Molecular Structure* 834–836, 355–363.
- Bradley, C.R., Rechnitz, G.A., 1984. *Anal. Chem.* 56, 664-667.
- Bulmus, V., Ayhan, H., Piskin E., 1997. *Chem. Eng. J.* 65, 71–76.
- Campuzano, S., Loaiza O.A., Pedrero, M., Villena, J.M., Pingarrón, J.P., 2004. *Bioelectrochemistry* 63, 199– 206.
- Cao, L. 2005. *Current Opinion in Chemical Biology* 9, 217-226.
- Chauhan, A. K., Aswal, D. K., Koiry, S. P., Gupta, S. K., Yakhmi, J. V., Sürgers, Guerin, D., Lenfant, S., Vuillaume, D., 2008. *Applied Physics A* 90, 581–589.
- Chen, X., Zhu, J., Tian, R., Yao, C., 2012. *Sensors and Actuators B* 163, 272-280.
- Costantino, H.R., Schwendeman, S.P., Langer, R., Klibanov, A.M., 1998. *Biochemistry (Moscow)* 63, 357–422.
- Costa, H.S., Andrade, G.I., Stancioli, E.F.B., Pereira, M.M., Oréface, R.L., Mansur, H.S., 2008. *Journal of Materials Science* 43, 494-502.
- Costa-Junior, E.S., Barbosa-Stancioli, E.F., Mansur, A.A.P., Vasconcelos, W.L., Mansur, H.S., 2009. *Carbohydrate Polymer* 76, 472-481.
- Davidsson, R., Genin, F., Bengtsson, M., Laurell, T., Emnéus, J., 2004. *Lab Chip* 4, 481-487.
- Delvaux, M., Walcarius, A. and Demoustier-Champagne, S., 2005. *Biosens. Bioelectron.* 20, 1587- 1594.
- Elcin, Y.M., Akbulut, U., 1992. *Biomaterials* 13, 156-161.
- Emregul, E., Sungur, S., Akbulut, U., 2005. *J. Biomater. Sci. Polymer Edn.* 16, 505-519.
- Fu, J., Liu, M., Liu, Y., Woodbury, N.W., Yan, H., 2012. *J. Am. Chem. Soc.* 134, 5516-5519

- Gulla, K.C., Gouda, M.D., Thakur, M.S., Karanth, N.G., 2004. *Biosens. Bioelectron.* 19, 621-625.
- Guo, Z., Guilfoyle, R.A., Thiel, A.J., Wang, R., Smith, L.M., 1994. *Nucleic Acids Res.* 22, 5456-5465.
- Hermanson, G.T., 2008. *Bioconjugate Techniques*, 2nd. ed. Elsevier, Amsterdam.
- Howarter, J., Youngblood, J.P., 2006. *Langmuir* 22, 11142-11147.
- Jeykumary, D.R.S., Narayanan, S.S., 2008. *Biosens. Bioelectron.* 23, 1686-1693.
- Jianrong, C., Yuqing, M., Nongyue, H., Xiaohua, W., Sijiao, L., 2004. *Biotechnology Advances* 2, 505-518.
- Josephy, P.D., Eling, T., Mason, R., 1982. *J. Biol. Chem.* 257, 3669 -3675.
- Kong, T., Chen, Y., Ye, Y., Zhang, K., Wang, Z., Wang, X., 2009. *Sensors and Actuators B* 138, 344-350.
- Li, Z.F., Kang, E.T., Neoh, K.G., Tan, K.L., 1998. *Biomaterials* 19, 45-53.
- Li, Q., Luo, G., Feng, J., Zhou, Q., Zhang, L., Zhu, Y., *Electroanalysis* 2001, 13, 413-416
- Li, B., Du, Y., Li, T., Dong, S., 2009. *Analytica Chimica Acta* 651, 234-240.
- Malik, V.V., Schulze, M.B., Hu, F.B., 2006. *American Journal of Clinical Nutrition* 84, 274-288.
- Manesh, K.M., Kim, H.T., Santhosh, P., Gopalan, A.I., Lee, K.-P., 2008. *Biosens. Bioelectron.* 23, 771-779.
- Manso, J., Mena, M.L., Sedenó, P.Y., Pingarrón, J., 2007. *J. Electroanal. Chem.* 603, 1-7.
- Mansur, A.A.P., Nascimento, O.L., Vasconcelos, W.L., Mansur, H.S., 2008. *Materials Research* 11, 293-302.
- Mansur, A.A.P., Mansur, H.S., 2011. *Cement & Concrete Composites* 33, 742-748.
- Mansur, A., Mansur, H., González, J., 2011. *Sensors* 11, 9951-9972.
- Mansur, H.S., Oréfice, R.L., Vasconcelos, W.L., Machado, L.J.C., 2000. *Biomacromolecules* 1, 789-797.
- Mansur, H.S., Oréfice, R.L., Vasconcelos, W.L., Lobato, Z.I.P., Machado, L.J.C., 2001, *Adsorption* 7, 105-116.
- Mansur, H.S., Machado, L.J.C., Vasconcelos, W.L., Lobato, Z.I.P., 2002. *Spectroscopy* 16, 351-360.

- Mansur, H.S., Oréface, R.L., Vasconcelos, W.L., Lobato, Z.P., Machado, L.J.C., 2005. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 16, 333–340.
- Mansur, H.S., Costa, H.S., 2008. *Chemical Engineering Journal* 137, 72–83.
- Migneault, I., Dartiguenave, C., Bertrand, M.J., Waldron, K.C., 2004. *BioTechniques* 7, 790-802.
- Okuda, K., Urabe, I., Yamanda, Y., Okada, H., 1991. *Journal of Fermentation and Bioengineering* 71, 100–105.
- Ozyilmaz, G., Tukul, S.S., Alptekin, O., 2005. *Journal of Molecular Catalysis: Enzymatic* 35,154-160.
- Pandey, P., Singh, S. P., Arya, S. K., Gupta, V. Datta, M., Singh, S. and Malhotra, B. D., 2007. *Langmuir* 23, 3333-3337.
- Peng, G., Zhao, C., Liu, B., Ye, F., Jiang, H., 2012. *Applied Surface Science* 258, 5543-5552.
- Pescador, P., Katakis, I., Toca-Herrera, J.L., Donath, E., 2008. *Langmuir* 24, 14108-14114
- Redinha, J.S., Brett, A.M.O., Pereira, J.L.C., da Silva, M.A., Gil, M.H., 1989. *Bioelectrochemistry and Bioenergetics* 22, 379-390.
- Rhee, S.G., Chang T.-S., Jeong, W., Kang, D., 2010. *Molecules and Cells* 29, 539-549.
- Sadecka, J., Polonsky, J., 2000. *Journal of Chromatography A* 880, 243–279.
- Sampath, S., Lev, O., 1996. *Anal. Chem.* 68, 2015-2021.
- Schray, K.J., Gergits, F., Niedbala, R.S., 1985. *Anal. Biochem.* 149, 225-228.
- Sela, M., Lifson, S., 1959. *Biochimica et Biophysica Acta* 26, 471-478.
- Shan, D., Zhu, M., Xue, H., Cosnier, S., 2007. *Biosens. Bioelectron.* 22, 1612–1617.
- Sondengaard, C.R., McIntosh, L.P., Pollastri, G., Nielsen, J.E., 2008. *Journal of Molecular Biology* 376, 269-287.
- Song, Y., Qu, K., Zhao, C., Ren, J., Qu, X., 2010. *Advanced Materials* 22, 2206–2210.
- Su, Q., Klinman P. K., 1999, *Biochemistry* 38, 8572-8581.
- Suye, S., Kumon, Y., Ishigaki, A., 1998. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 27, 245–248.
- Svobodová, L., Šnejárková, M., Hianik, T., 2002. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 373, 735–741.
- Swoboda, B.E.P., 1965. *Biochim. Biophys. Acta* 175, 365–369.
- Tukul, S.S., Alptekin, O., 2004. *Process Biochem.* 39, 2149–2155.

- Ukeda, H, Ohira, M., Sarker, A. K., Sawamura, M., 1998, *Food Research International* 31, 297-302.
- Wang, B., Li, B., Deng, Q., Dong, S., 1998. *Anal. Chem.* 70, 3170-3174.
- Wang, J., Myung, N.V., Yun, M., Monbouquette, H.G., 2005. *Journal of Electroanalytical Chemistry* 575, 139-146.
- Yagar, H., Ertan, F., Balkan, B., 2008. *Preparative Biochemistry & Biotechnology* 38, 13–23.
- Tsuge, H., Natsuakai, O., Ohashi, K., 1975. *J. Biochem.* 78, 835–843.
- Uang, Y.M., Chou, T.C., 2003. *Biosens. Bioelectron.* 19, 141–147.
- Zhao, Z.W., Chen, X.J., Tay, B.K., Chen, J.S., Han, Z.J., Khor, K.A., 2007. *Biosens. Bioelectron.* 23, 135–139.
- Zhu, L., Zhai, J., Guo, Y., Tian, C., Yang, R., 2006. *Electroanalysis* 18, 1842–1846.

Figure captions

Figure 1 - Chemical functionalization of silica-derived solid supports: (a) general formula for a silane coupling agent; (b) thiol-modified support; (c) amine-modified support; (d) Hydroxyl-modified support.

Figure 2 – Schematic representation of enzyme immobilization onto silane-functionalized supports using glutaraldehyde (GA) as bi-functional crosslinking agent.

Figure 3 - Schematic diagram of the multilayer enzyme assemblies with two different structures: (a) **Structure 1**: GOx-biot/HRP-biot and (b) **Structure 2**: HRP-biot/GOx-biot.

Figure 4 – Flowchart of multilayer enzyme assembly process.

Figure 5 - Evolution of contact angle measurements for surface modified samples.

Figure 6 – FTIR spectra of surface modified glass slides. (a) glass slide “as supplied”; (b) amino-modified glass slide and (c) thiol-modified glass slide.

Figure 7 – Schematic view of the immobilization of glucose oxidase using glutaraldehyde on solid supports with surface chemical functional groups: hydroxyl (a), amine (b), and thiol (c) (GOx sphere model obtained at RCSB- Protein Data Bank).

Figure 8 - (a) UV-vis absorption spectra from GOx immobilized onto amine-modified support showing time dependent change in the absorption at 650 nm due to TMB_{ox} specie formation. Insert: H₂O₂ formation with time (β -D-glucose concentration = 15.0 mmol.L⁻¹). (b) Schematic representation of GOx catalyzed oxidation of glucose to gluconic acid, with the formation of hydrogen peroxide.

Figure 9 – (a) UV-vis absorption spectra from GOx immobilized onto amine-, thiol- and hydroxyl-modified glass support and adsorbed GOx 9 min after glucose injection. (b) Summary of relative absorbance for 5.0 mmol.L⁻¹ and 15.0 mmol.L⁻¹ (9 min).

Figure 10 – Glucose conversion rate versus β -D-glucose substrate concentration for free GOx (a) and immobilized GOx onto amino- (b), thiol- (c), and hydroxyl-modified supports (d) obtained from M-M equation fitting. Insert: Measured values up to 20 mmol.L⁻¹.

Figure 11 – Biosensors calibration curves of immobilized GOx onto amino- (a), thiol- (b), and hydroxyl-modified supports (c).

Figure 12 – Schematic representation of the cascade reactions for analyzing the biochemical activity of the cascade structures (HRP, GOx, and Avidin three dimensional views obtained from RCSB - Protein Data Bank).

Figure 13 – Biosensor responses of 3D bi-enzymatic Structure 1 (GOx-biot/HRP-biot) and Structure 2 (HRP-biot/GOx-biot) with β -D-glucose concentrations of 1.0 mmol.L⁻¹ e 15.0 mmol.L⁻¹ (50 min).

Figure 14 – Proof of concept of 3D bi-enzymatic Structure 1 (a) and Structure 2 (b) assayed using real samples of regular and sugar-free soft drinks.

Table captions

Table 1 – Contact angle measurements for different chemical functionalities.

Table 2 – Michaelis-Menten parameters obtained for free (in solution) and immobilized GOx.

Table 1.

Surface functional group	Thiol	Amine	As supplied	Hydroxyl
Contact angle (°)	67.2 ± 2.8	62.9 ± 2.4	30.8 ± 2.3	11.1 ± 1.8

Table 2.

Sample		R ²	V _{max} (mmol.L ⁻¹ .min ⁻¹)	K _m or K _m ' (mmol.L ⁻¹)
GOx in solution		0.99	2600 ± 300	18.3 ± 3.9
Immobilized GOx	Amine-modified support	0.99	540 ± 40	6.6 ± 1.4
	Thiol-modified support	0.97	890 ± 600	61 ± 48
	Hydroxyl-modified support	0.92	110 ± 40	13.6 ± 7.6

Figures

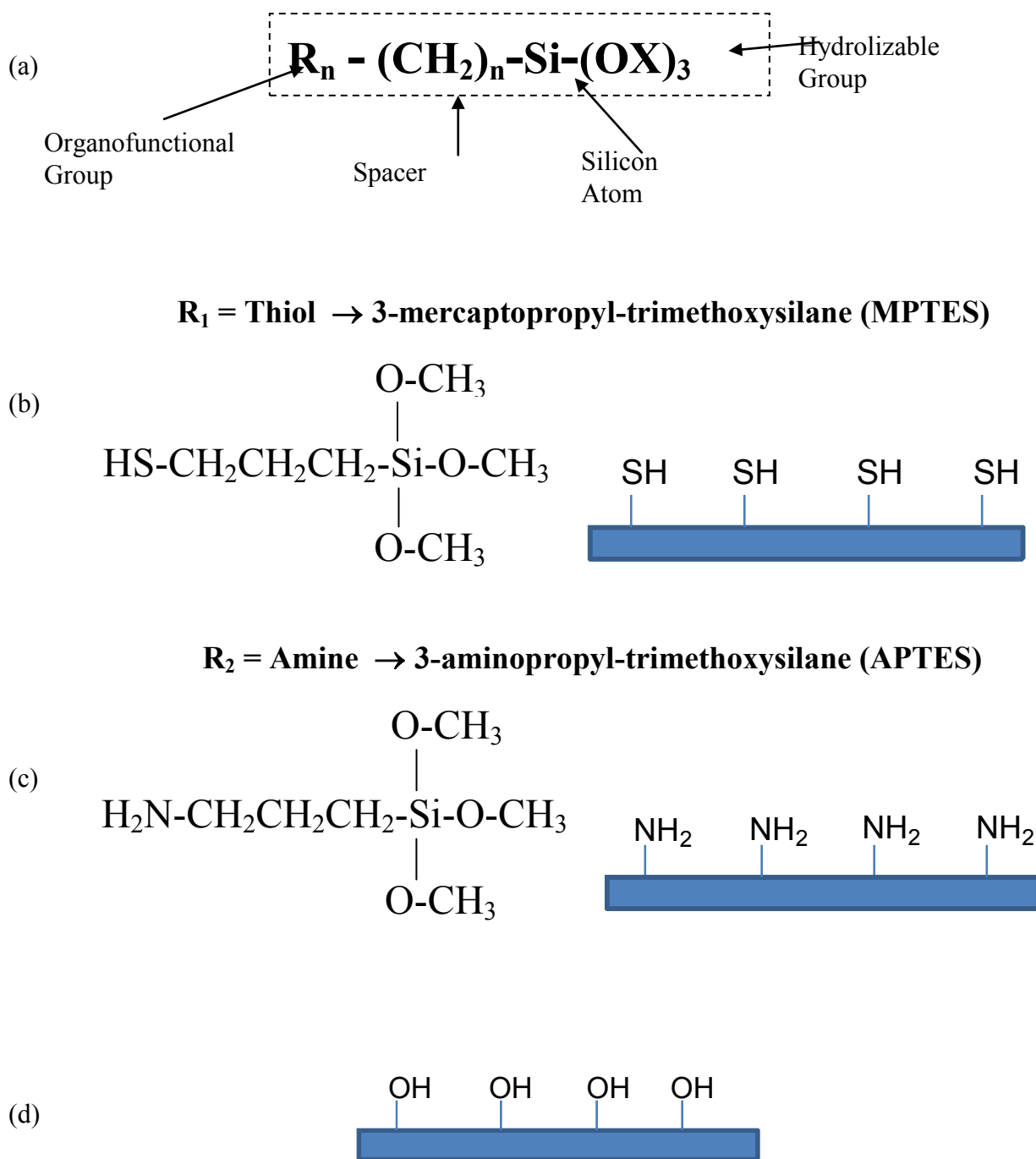


Figure 1.

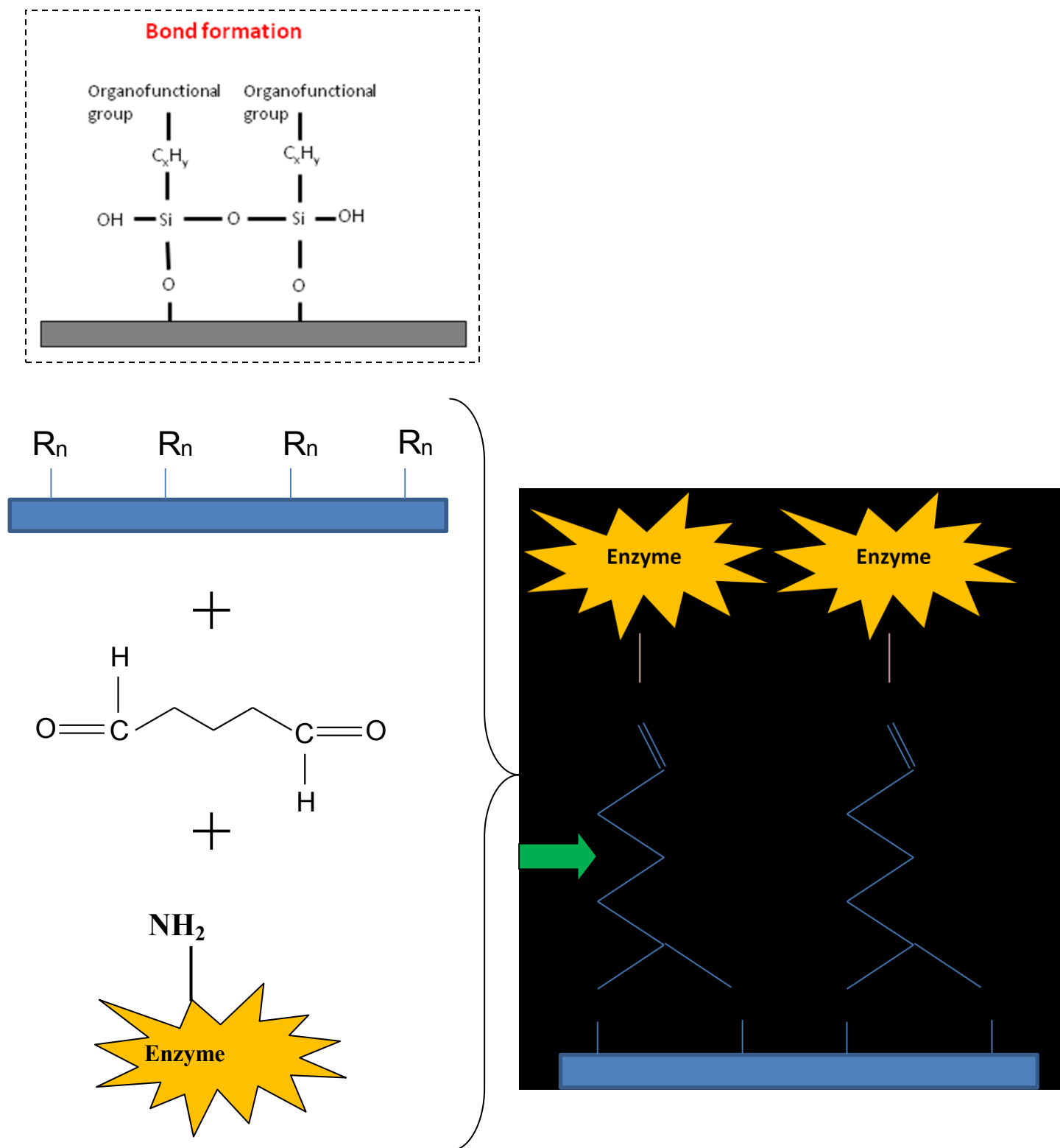
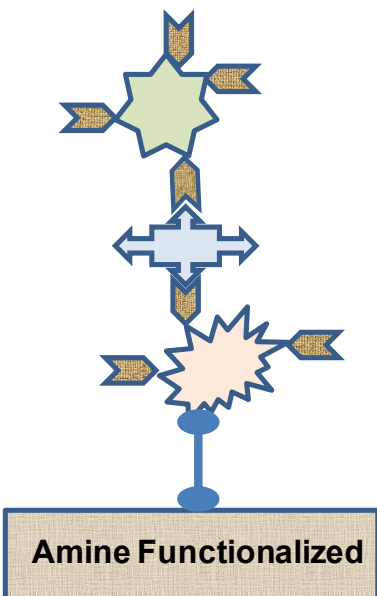


Figure 2.

(a) Structure 1

Legend



HRP



GOx



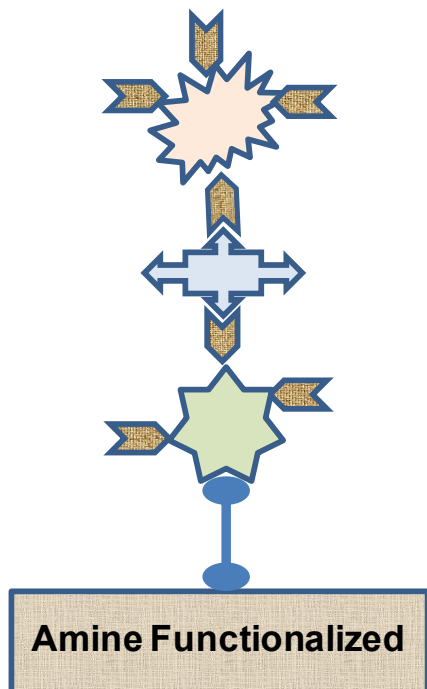
Avidin



Biotin



Glutaraldehyde

(b) Structure 2**Figure 3.**

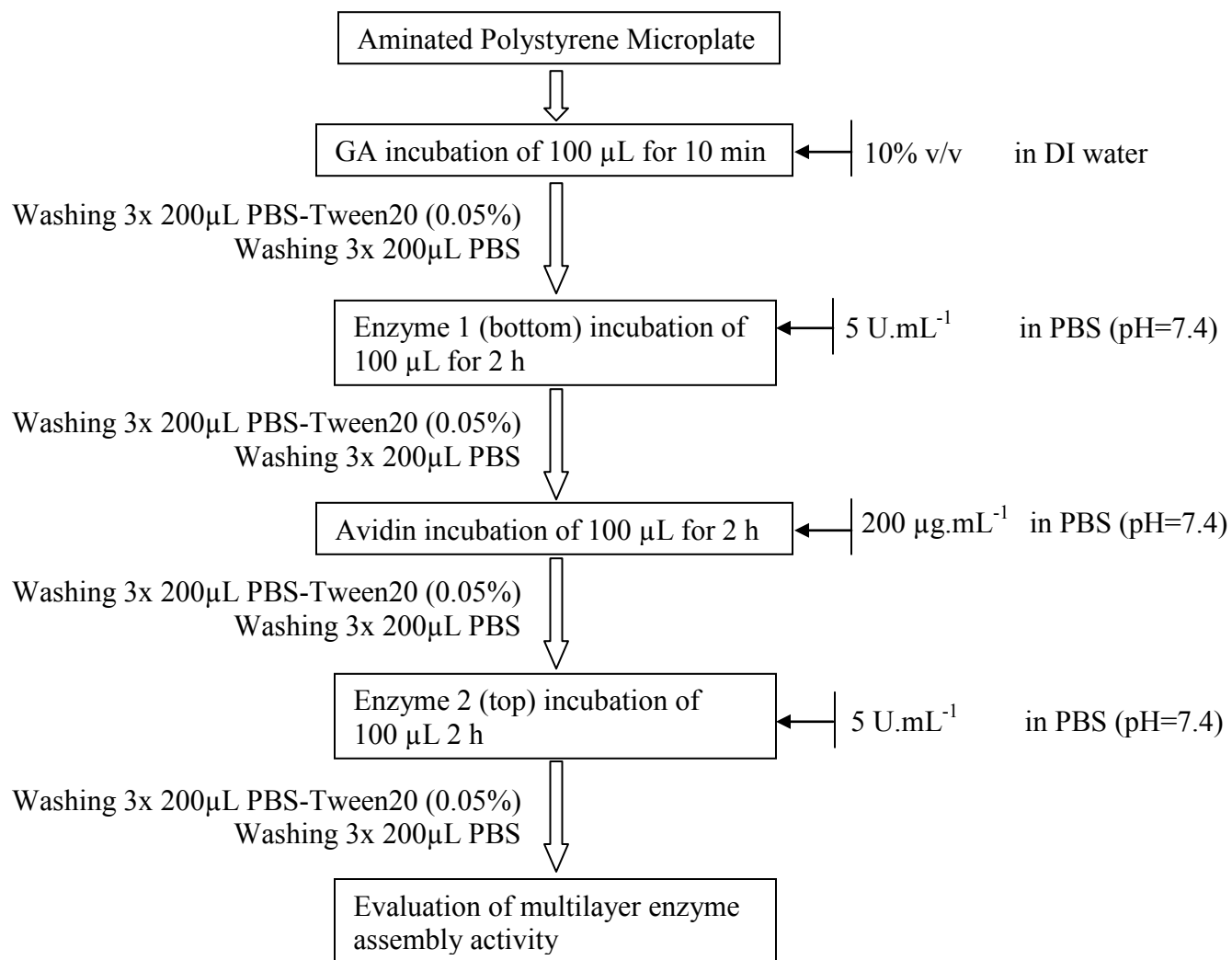


Figure 4.

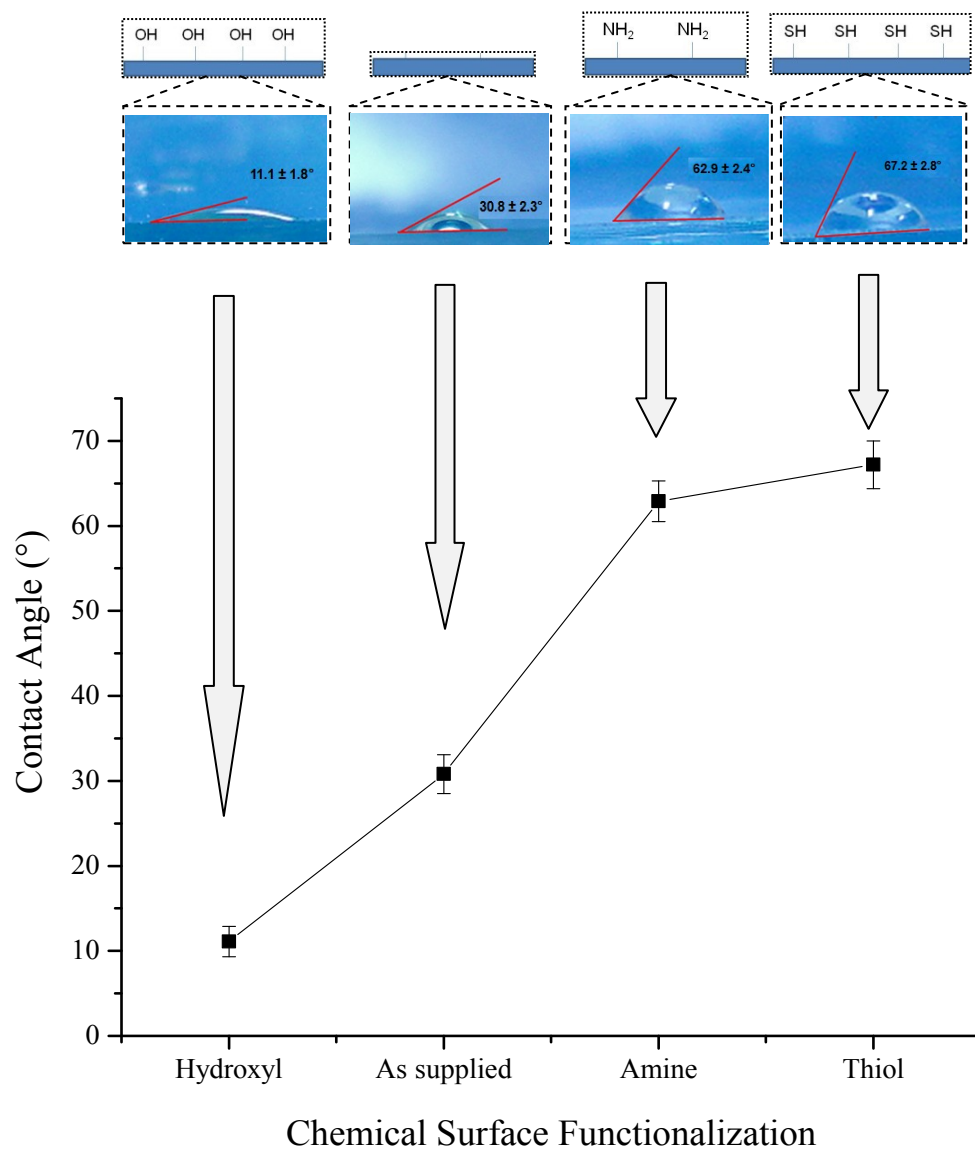
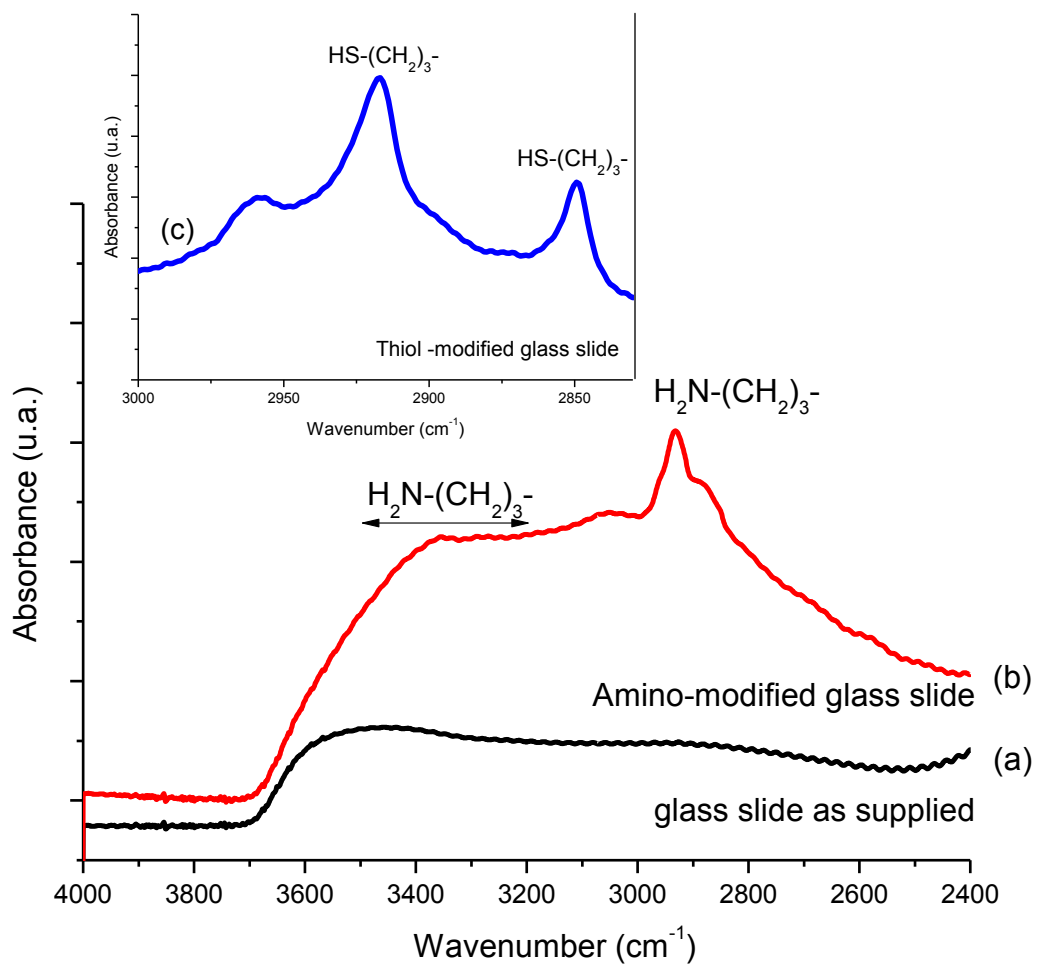


Figure 5.

**Figure 6.**

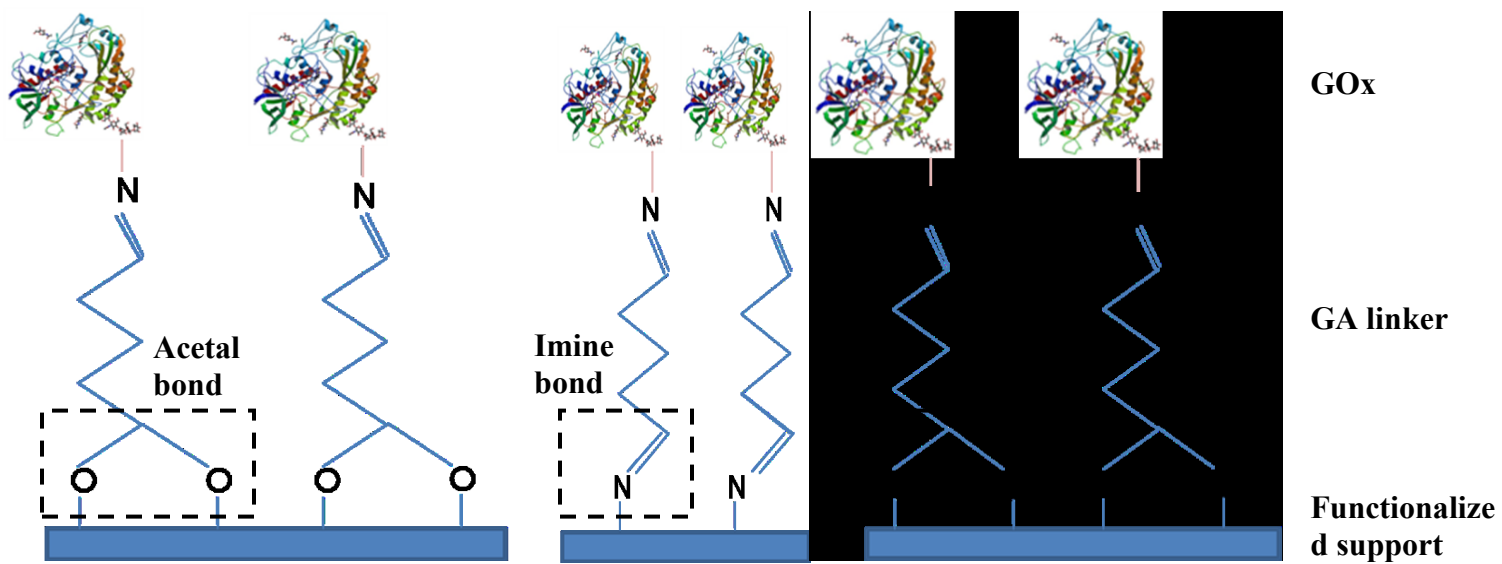


Figure 7.

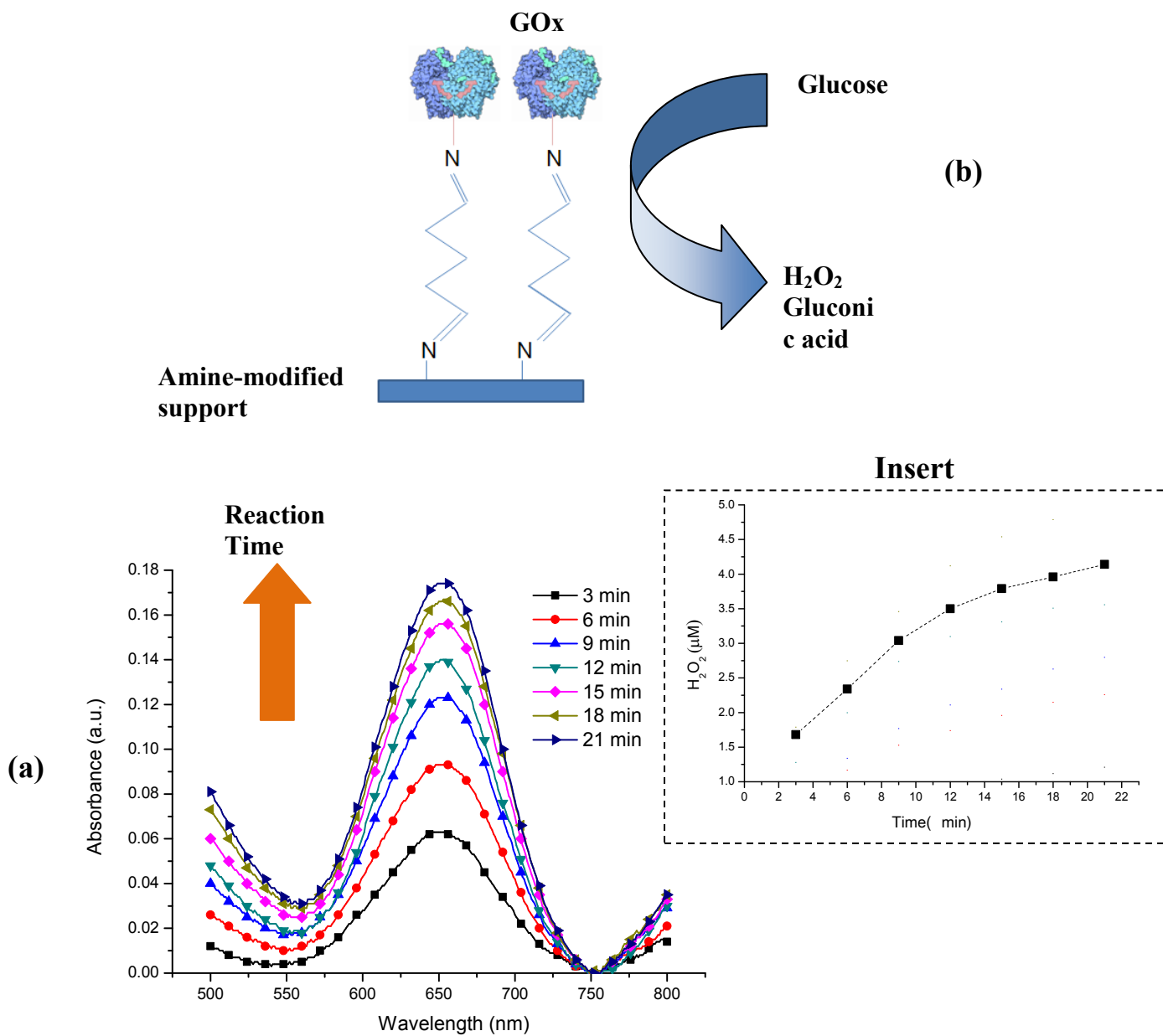
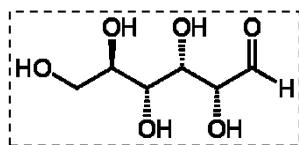
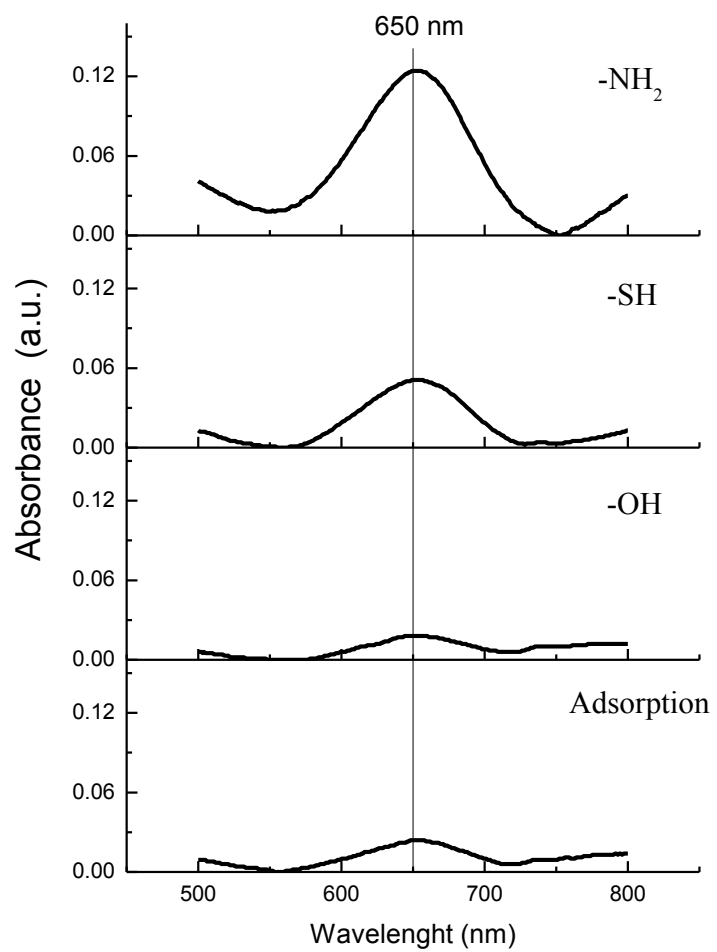


Figure 8.

(a)

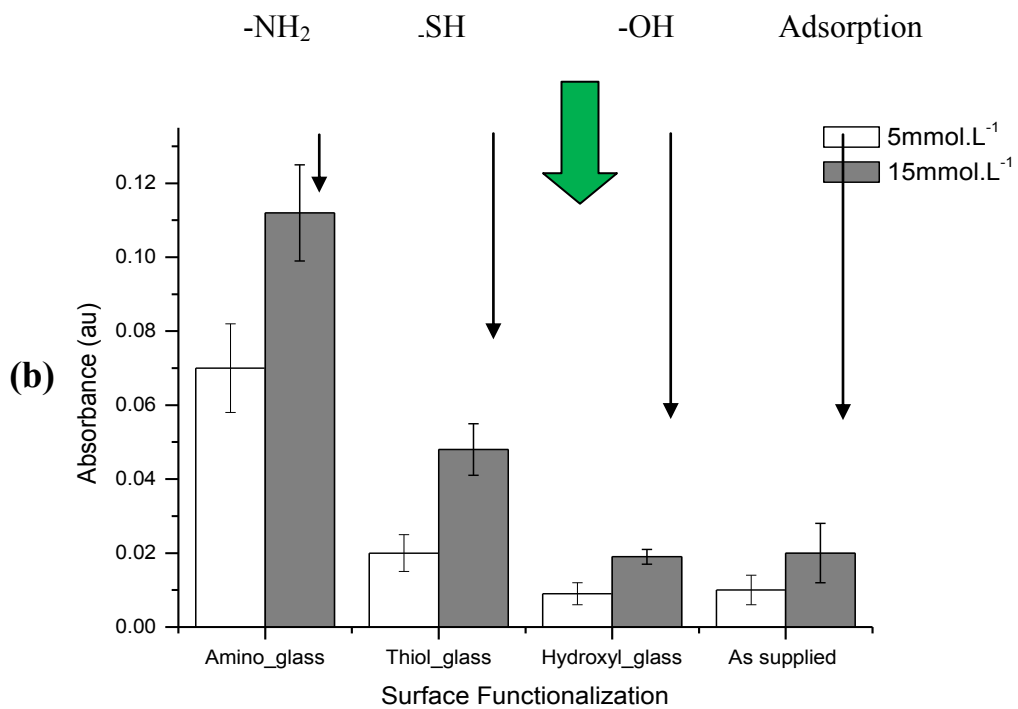


Figure 9.

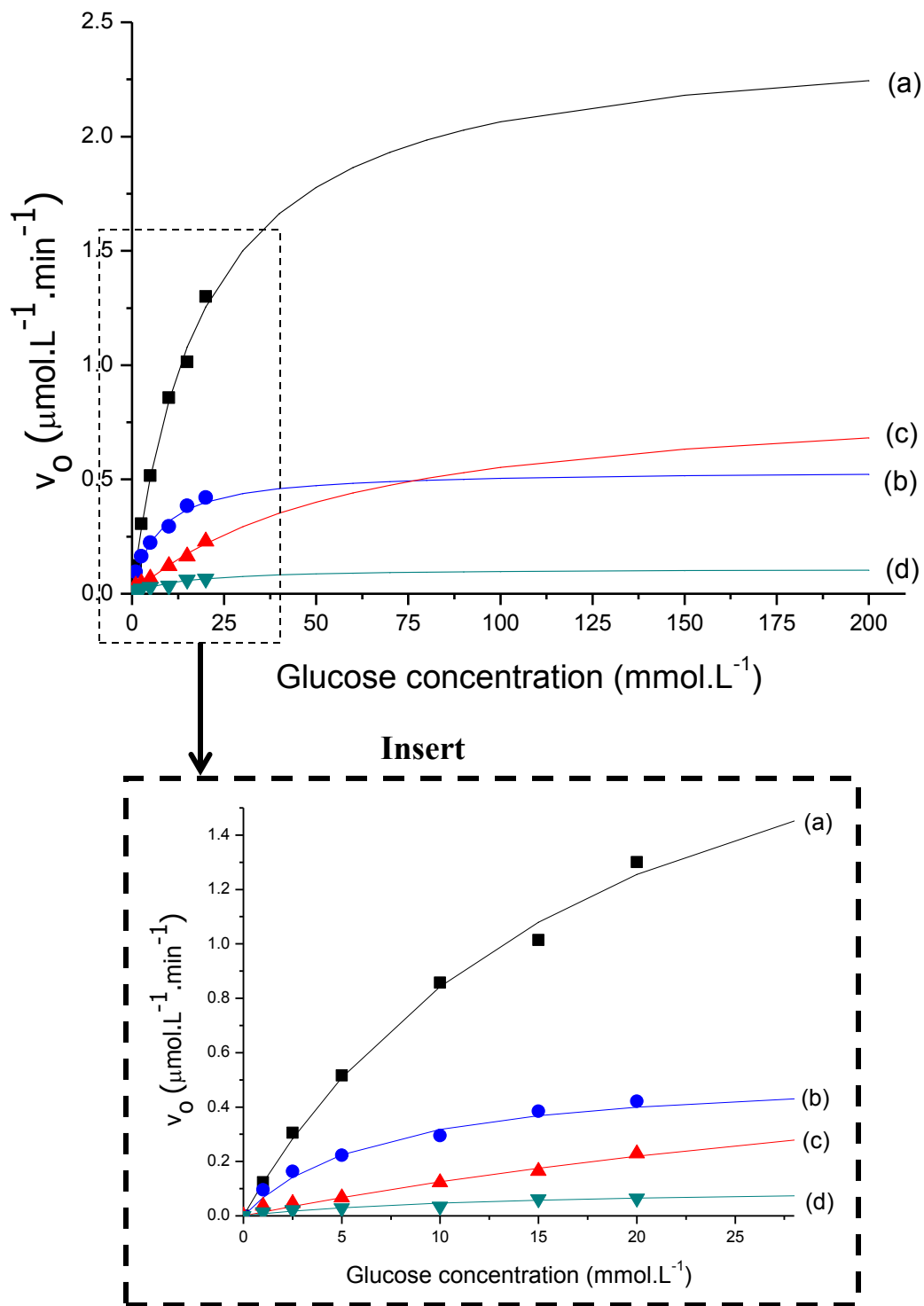


Figure 10.

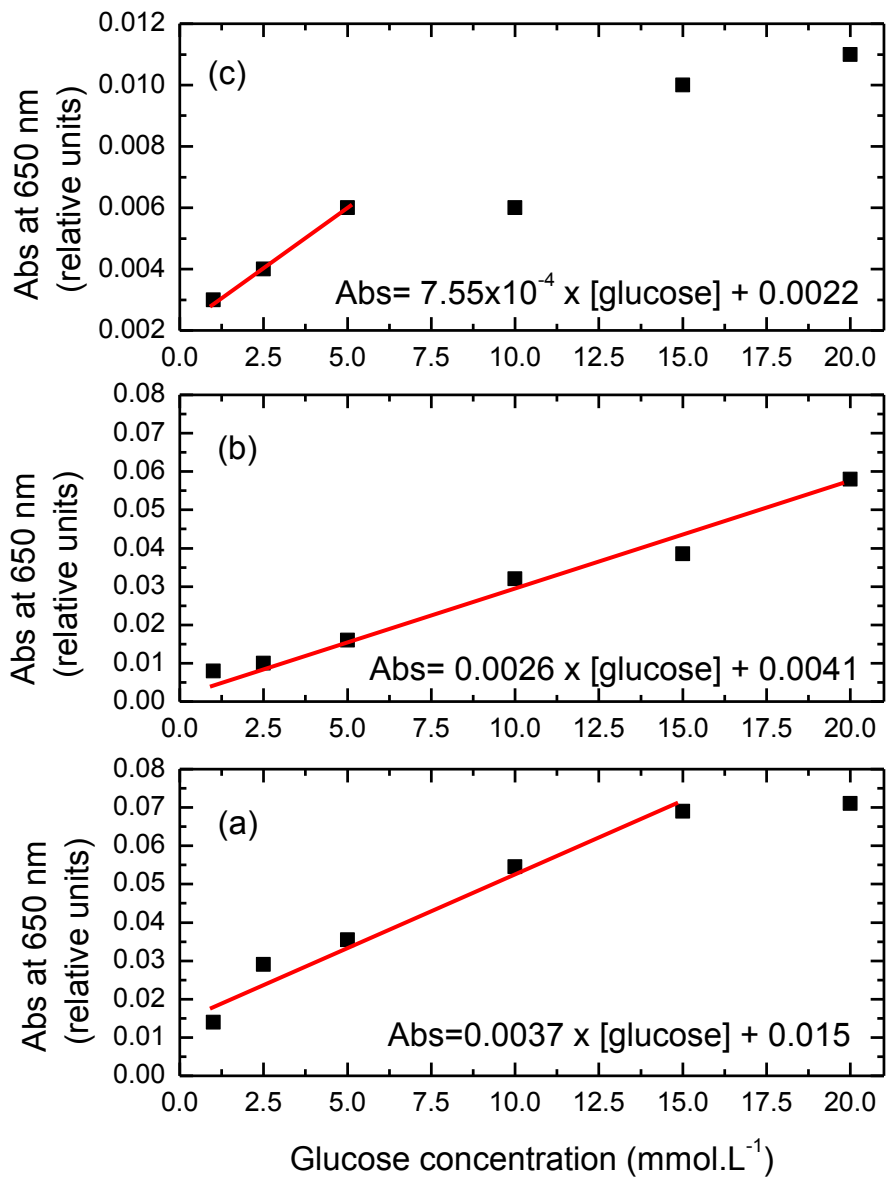
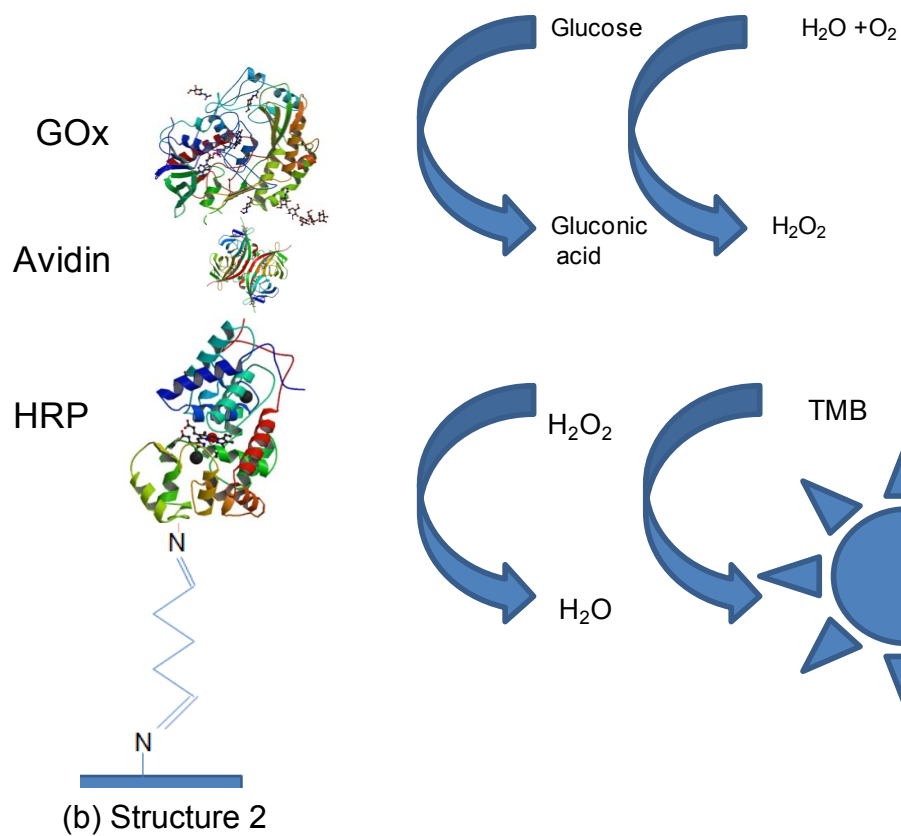
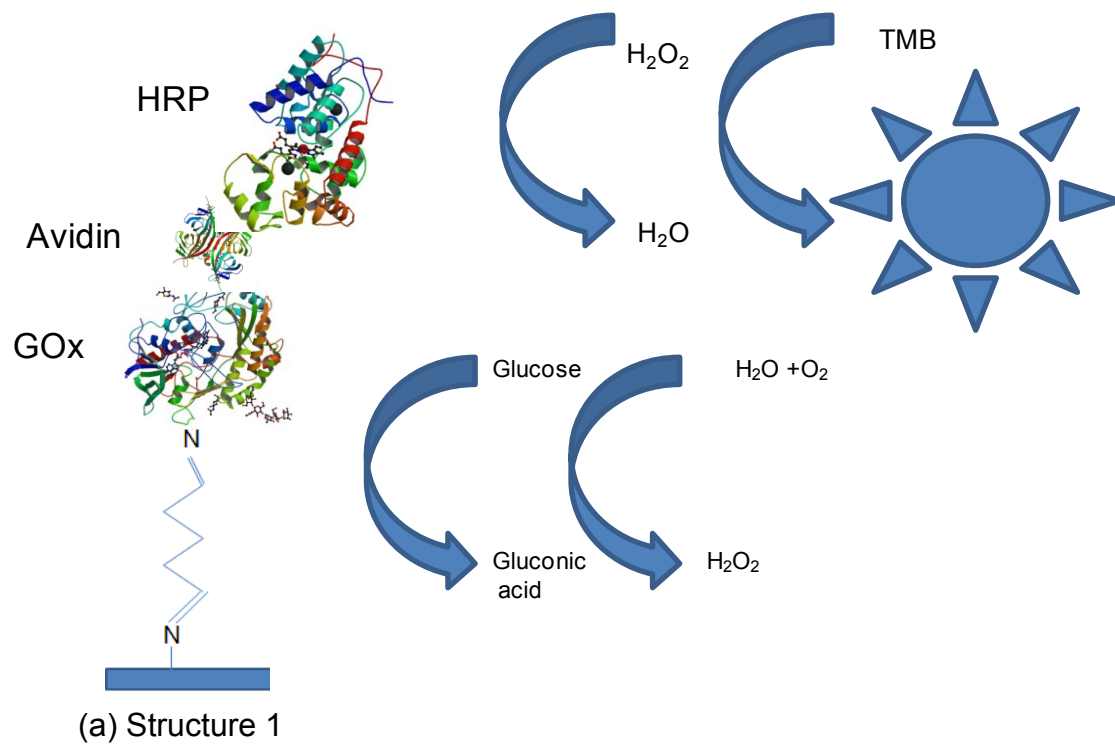


Figure 11.

**Figure 12.**

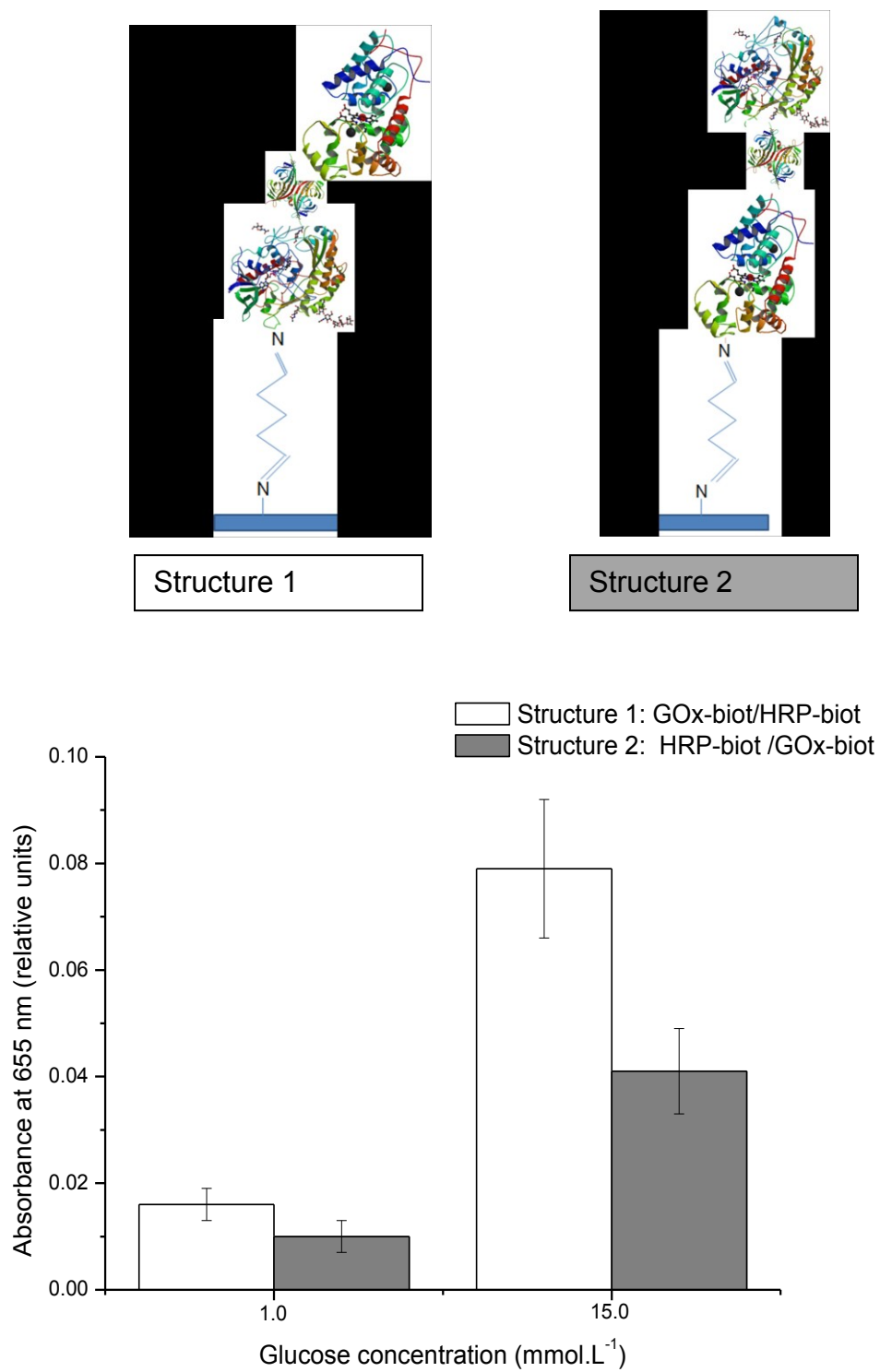
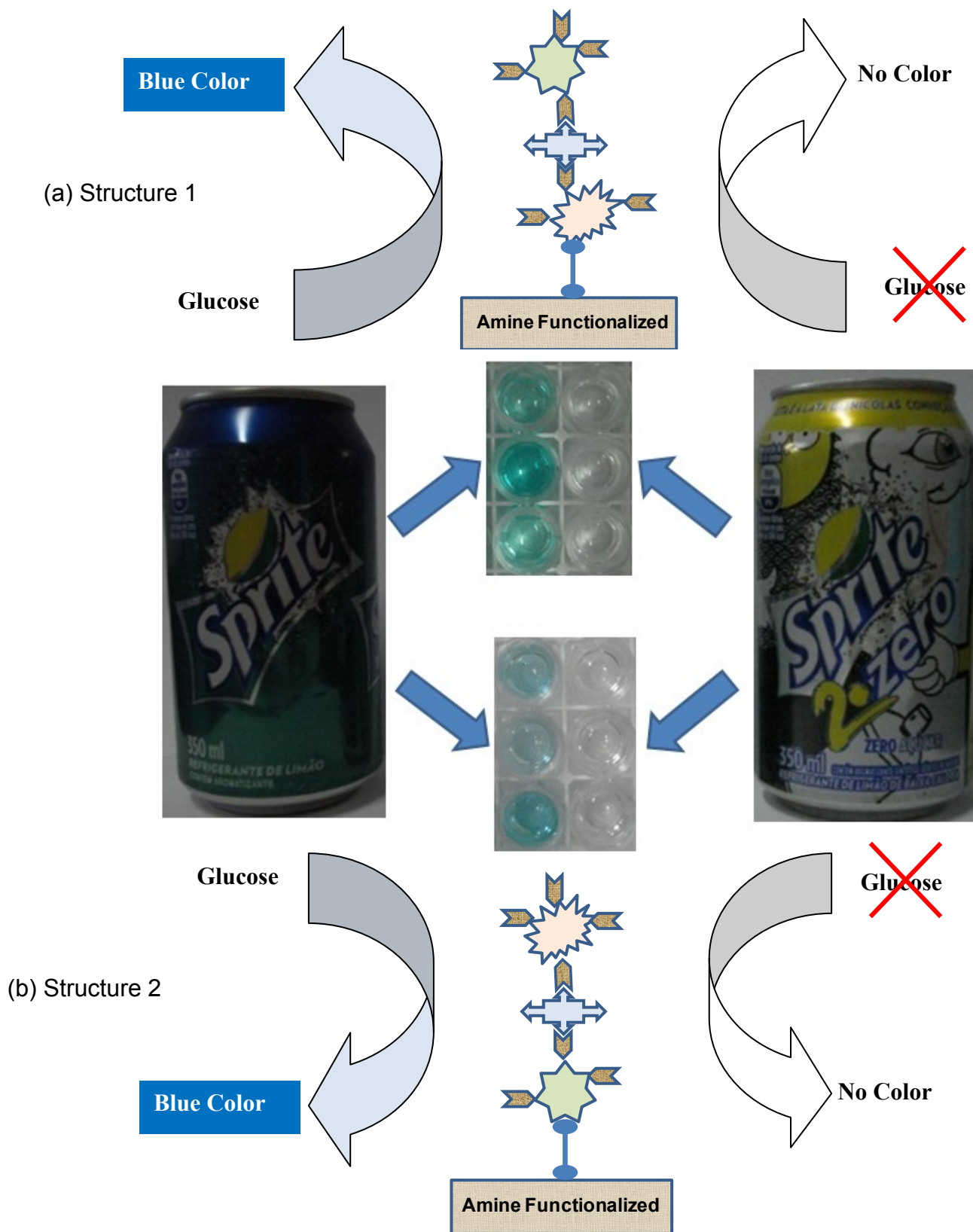


Figure 13.



10.2 Trabalho Submetido ao Periódico Applied Surface Science em maio de 2012

Chemical Functionalization of Surfaces for Building Three-dimensional Engineered Nanosensors

(NANOSMAT2012 USA- Applied Surface Science - Special issue "Nanomaterials: Surface Science, Engineering and Technology"

*Marco E. Marques, Alexandra A.P. Mansur, Herman S. Mansur **

Department of Metallurgical and Materials Engineering, Federal University of Minas Gerais, Brazil.

hmansur@demet.ufmg.br

This study presents a new approach for developing nanosensors based on enzymatic systems with designed three dimensional structures. Essentially, silica glass slides were chemically functionalized at surfaces by reacting with organosilanes, 3-mercaptopropyltriethoxysilane (MPTES), and 3-aminopropyltriethoxysilane (APTES), using sol-gel process at room temperature. The functionalization of the supports was characterized by contact angle measurements and FTIR spectroscopy. The first enzyme layer was covalently immobilized to the support by the bi-functional linker glutaraldehyde (GA). The second enzyme layer was deposited using the protein conjugation method based on the high affinity “avidin-biotin” interactions. Each enzyme was biotinylated before being added to the nanostructured system and avidin was used as the binder between consecutive enzyme layers. The biochemical response was assayed at all stages to certify that the enzymatic bioactivity was retained throughout the entire layer-by-layer (LBL) process. Thus, the model of building 3D-enzymatic systems was evaluated using the enzymatic structure with glucose oxidase (GOx) and horseradish peroxidase (HRP). It was verified that the amino-modified support presented the highest bioactivity response compared to the other chemical functionalities. Moreover, the bi-enzyme nanostructure demonstrated relevant biochemical activity upon injecting the glucose substrate into the system. Finally, as a proof of concept, the bi-enzyme systems were assayed using real samples of regular and sugar-free soft drinks where they successfully behaved as nano-biosensor for glucose with the built-in 3D hybrid structure. These findings open an entire new class of promising nanomaterials to be investigated for a myriad of analytical and nanosensing applications.

KEYWORDS: Surface modification, Enzyme Biosensor, Nanostructure, Biocatalysis, Biosensor, Bioconjugate.

* To whom correspondence should be addressed: Federal University of Minas Gerais, Av. Antônio Carlos, 6627 – Escola de Engenharia, Bloco 2 – Sala 2233, 31.270-901, Belo Horizonte/MG, Brazil; Tel: +55-31-34091843; Fax: +55-31-34091843; E-mail: hmansur@demet.ufmg.br (H. Mansur)

GRAPHICAL ABSTRACT

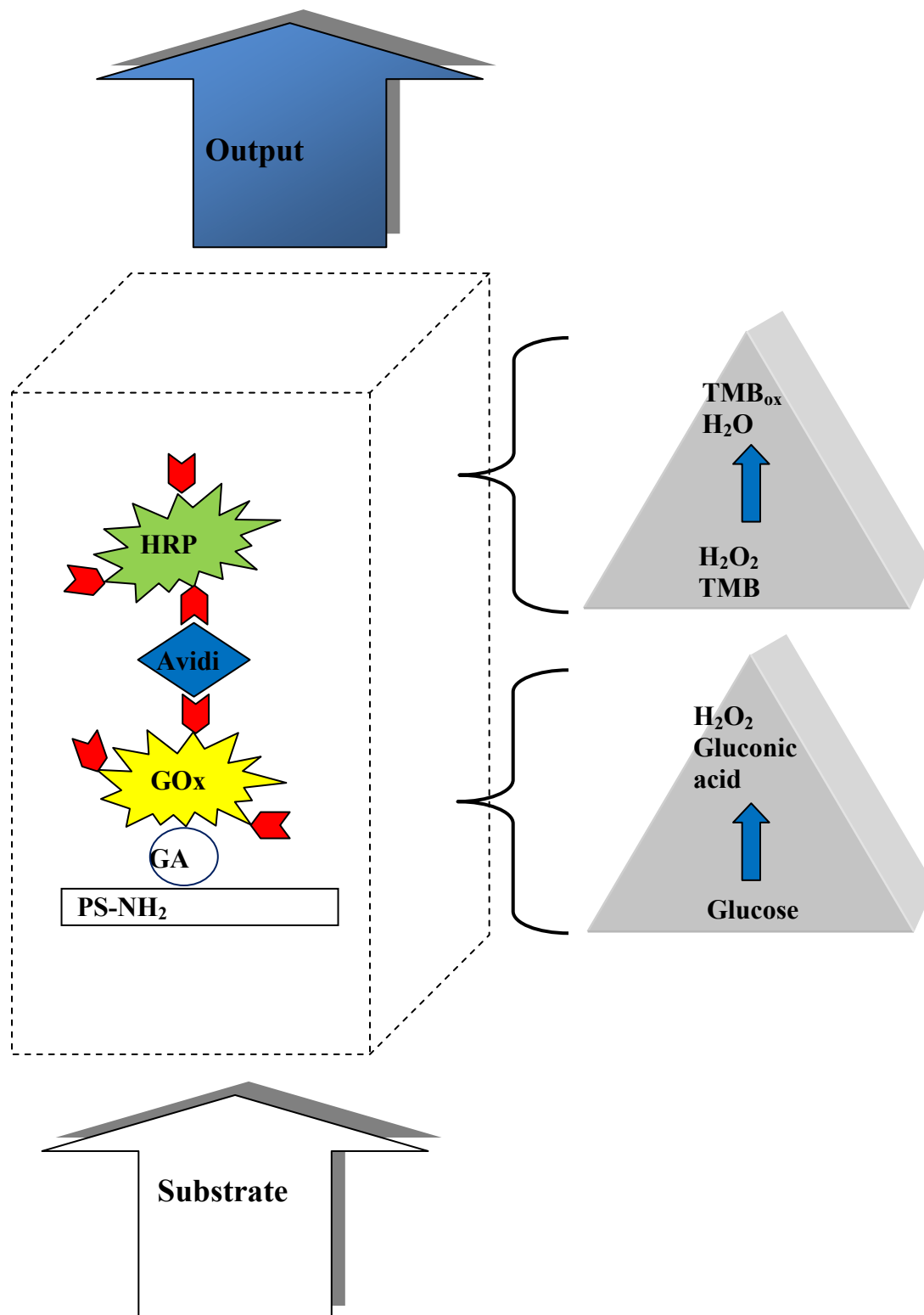


Figure. Schematic Representation of Nano-biosensor.

1. Introduction

The ongoing worldwide nanotechnology revolution is predicted to impact most areas of science and engineering. Research in nanotechnology began with discoveries of novel physical and chemical properties of various materials that only appear for structures at nanometer-sized dimensions. Nature has wisely designed biomolecules for performing very specific functions in innumerable living organisms. Each of them is intrinsically related to the others in complex cascade sequences and pathways, frequently with multiple reactions occurring in parallel. In the fields of nanobiotechnology and nanoengineering, increasing demands are created every day searching for new sensing tools and devices for biomedical applications. One of the most frequent strategies adopted by the researchers is mimicking nature using biomolecules such as proteins and polysaccharides that are selective in their functions and therefore interesting candidates to be associated with different classes of materials (Chauhan et al., 2012; Mansur and Mansur, 2012; Mansur et al., 2011; Jeykumary and Narayanan, 2008; Delvaux et al., 2005; Jianrong et al., 2004).

Among several alternatives of biomolecules, enzymes have been often chosen as active biosensing molecules due to their specificity, affinity, limit of detection, responsiveness, relative chemical and thermal stability, availability, at reasonable cost compared to other options (Si et al., 2011; Rahman et al., 2010; Periasamy et al., 2009; Pickupa et al., 2005). Enzymes, also referred as biocatalyst, can be usually “temporally” or “permanently” immobilized on insoluble supports. A biomolecule is termed “immobilized” if its mobility has been restricted by chemical or physical means. This relative restraint of mobility may be achieved by several different methods, for instance by covalent bonding or by adsorption to the support. Both methods have positive and negative aspects regarding to their potential use for building sensing systems. In addition, immobilization of an enzyme results in a considerable change in the microenvironment of the enzyme and may affect its bioactivity, as well as changes in the physical and kinetic properties.

Surface functionalization by organic molecules provides several perspectives for the immobilization of enzymes. These surfaces can be effectively used to build up interesting nano-level architectures. In the last decades, increasing effort has been directed towards potential applications of silane as surface modifiers like terminal amine groups which have the capability of attaching a large number of molecules (Mansur et al., 2005; Mansur et al.,

2002; Mansur et al., 2000). Furthermore, flexibility with respect to terminal functionalities of the organic molecules allows control of the hydrophobicity or hydrophilicity of surfaces. In this sense, silanization with organosilane compounds has been used as a process for modification of siliceous surfaces such as glass. The attachment is typically mediated by first silylating the surface followed by immobilization of biomolecules of interest. Aminosilanes such as (3-Aminopropyl)-triethoxysilane (APTES) are attractive for such applications, due in part to significant advances in the understanding of this class of surface modification agents (Jang and Liu, 2009; Pasternack et al., 2008). Remarkably, aminosilanes have the advantage of catalytic activity by the amine group that facilitates formation of siloxane bonds with surface silanols. So, the formation of covalent bonds between enzyme and an insoluble support is the most frequently used techniques. This technique consists of forming a covalent bond between one or more of the enzyme's amino acid residues and a functional group on the insoluble support (Fukui and Tanaka, 1990). The strength of binding is very strong and very little leakage of enzyme from the support occurs.

Layered construction of enzymes into organized systems has attracted considerable attention in recent years due to its potential application in the areas of bio-electronic and biosensors, etc. There have been a number of approaches for constructing multilayer protein films on the surface of solid matrices, including a layer-by-layer deposition of proteins on the surface of an electrode through a coupling reagent and consecutive adsorption of charged biomolecules on a solid surface through attractive electrostatic forces. However, these procedures are complex and commonly not stable enough (Zhang et al, 2004). As a consequence, research of new biosensors as well as the development of the existent designs has experienced drastic advances in the last years. The main driving force for this activity is the increasing necessity for miniaturized biosensors, particularly for biomedical applications (Delvaux et al., 2005).

Since the pioneering work from Clark and collaborators (Clark and Lyons, 1962) reporting the glucose biosensor, innumerable papers have been published for the detection of a very large number of analytes. Nevertheless, glucose biosensors are the most important because the metabolism of sugar is crucial for human life and several diseases may be directly or indirectly caused by some unbalance or mal-function of the endocrine system. Hundreds of

millions people worldwide suffer from diabetes mellitus, a group of metabolic diseases characterized by high blood glucose levels, which result from defects in insulin secretion, or action, or both. Patients suffering from diabetes mellitus must monitor and control their blood glucose levels to avoid long term complications and damage to organs, coma or death. Monitoring of glycemic status, as performed by patients and health care providers, is considered a cornerstone of diabetes care. In that sense, the tight control of blood glucose level by the diabetic sufferer is of paramount importance and biosensing devices comes to play a key role (LeRoith et al., 2005; Pickup et al., 2005; Goldstein and Little, 1997). However, the glucose level in blood is one way of controlling the diseases but not actually a response for solving the problem and that also can negatively affect the quality of the patient's life. One of the main sources of the sugar intake in the body is associated with the dietary of food and beverages as a consequence of cultural, social, habits. In general, the nutrition can be a valuable supporting tool for controlling or minimizing the drawback effects of sugar level in diabetes patients. That means, the tight control in all sources of food and alternatives can be used as a way for improving the quality of life, reduce the possibility of glycemia shock. Besides, many industrial food and beverage products can be deliberately adulterated for economical reasons such as lowering manufacturing costs and other malicious reasons (bio-threats, negligence, etc.). Additionally, industrial food products may be unintentionally altered by contamination, by accident caused during the processing, changes in the supplier chain and several other possible factors. Nevertheless, as a consequence, it may cause severe consequences to highly sensitive people due to the ingestion of inappropriate food, such as allergic response, sickness, or it may be fatal. Thus, analysis of compounds or substances could be applied in quality control of beverages and food or to monitor for adulteration or contamination of aliments. Hence, by means of using rapid accurate biosensor to glucose at the "point-of-care" (PoC) can prevent or significantly reduce the risk of ingesting or drinking food or beverages with substances that can cause some kind of harm to the person. Consequently, biosensing systems based on the bioenzymatic reaction of glucose oxidase (GOx) may be utilized as a model for detecting glucose ("sugar") that could be extended and applied in more bioanalytical methods and different substrates (Mansur et al., 2011).

The main goal of this research was to build 3D-nanostructured enzymatic multilayers for biosensing, and the concept modeled by using two enzymes: glucose oxidase (GOx) and horseradish peroxidase (HRP). The insoluble support was chemically functionalized for covalent immobilization of the enzymes aiming at more stability of the system. The double-layered enzymatic systems were assayed as food biosensor using glucose as the primary substrate. To the best of our knowledge, this is the first study to report such complex bi-enzymatic architectures with the overall behavior determined at the molecular scale.

2. Materials and Methods

2.1 Materials

Hydrogen peroxide (33% v/v), ammonium hydroxide (30%) and hydrochloric acid (>96%) were supplied by Vetec, Brazil. Nitric acid (65%), methanol (99,8%) and ethanol (95%) were supplied by Synth, Brazil. 3-aminopropyl-trimethoxysilane (APTMS, 97%), 3-mercaptopropyl-trimethoxysilane (MPTMS, 95%), 1,5-pentane-dial, (glutaraldehyde, GA, 25% aqueous solution), glucose oxidase from *Aspergillus Niger* (GOx), glucose (99.5%), horseradish peroxidase (HRP), 3,3',5,5' tetramethylbenzidine (TMB), biotin N-hydroxysuccinimide ester (NHS-biotin, $\geq 98\%$ HPLC), avidin from white egg ($\geq 98\%$), dimethyl sulfoxide (DMSO), tween 20, sodium phosphate dibasic (>99%), sodium chloride (>99.5%), potassium chloride (>99%), and potassium phosphate monobasic (>99%) were purchased from Sigma-Aldrich, USA. DI water was obtained from Milli-Q water system.

Insoluble supports for immobilization of enzymes were microscope glass slides and aminated modified polystyrene microplates (Corning® 96 Well Clear Polystyrene Amine Surface Stripwell™ Microplate, Product #2388). Soda-lime glass is a readily available and inexpensive support with homogeneous chemical composition, $\text{SiO}_2=(75\pm 5)$ wt%; $\text{Na}_2\text{O}=(15\pm 2)$ wt%; $\text{CaO}+\text{MgO}=(10\pm 2)$ wt%. Besides, it is amenable to surface chemical modification using silanization chemistry (Guo et al, 1994). Commercial polystyrene (PS) plates modified to possess positively charged amine groups (2×10^{13} reactive sites/cm²) that replace benzene ring at the surface can be used for covalent immobilization of biomolecules via bifunctional crosslinkers.

2.2 Chemical Functionalization of insoluble support

2.2.1 Method of Surface functionalization

Glass tile surfaces were prepared with two silane coupling agents (Fig. 1a), each with specific functionality (R_n): thiol (R_1 : -SH) (Fig. 1b) and amino (R_2 : -NH₂) (Fig. 1c). Glass slides without any chemical modification (“as-supplied”) were used as reference for the enzyme adsorption and compared with chemically immobilized systems. Prior to silane reaction, glass surface impurities were fully removed by immersion in 20% nitric acid at (25±3)°C for 24h, followed by deionized (DI) water rinse. Hydroxylation (-OH) was conducted by soaking glass slides in a 70:30 mixture of DI water:30% hydrogen peroxide (H₂O₂) at (75±5)°C for 45min. Then, 5 mL of NH₄OH (conc.) was added for each 100mL of the H₂O:H₂O₂ solution. After cooling, glass slides were copiously rinsed in DI water and dried in methanol. The increase in the hydroxyl groups is usually recommended before performing silane reactions on the surfaces. This process enhances the density of available sites for silane reaction, improving the efficiency and repeatability of the surface modification process. The hydroxyl functionalization of glasses leads to the formation of silanol groups (Si-OH) at solid surface related to the reaction of silicon incomplete bonds minimizing free energy. The effect of this hydrophilic chemical functionalization with silanol groups in enzyme immobilization and activity was also evaluated (Fig. 1d).

INSERT FIGURE 1

Surface modification procedure with organosilanes was conducted using the sol-gel deposition process from aqueous alcohol solution. A 25% methanol:75% distilled water solution was adjusted to pH (4.5±0.2) with acetic acid. Then, silane was added to yield a 2% (v/v) final concentration and 10 minutes were allowed for hydrolysis and silanol formation. Glass slides were immersed in this solution for 30 min and, after that, they were rinsed with ethanol to remove from glass surface unbounded silane and cured at (110±10)°C for 30 min for condensation reactions.

2.2.2 Characterization of Surface functionalization

The influence of surface functionalization on the hydrophilic/hydrophobic behavior of glass slide was estimated via contact angle measurements that were carried out by depositing 50

μL DI water ($18.0\text{M}\Omega$) droplets on the glass slides. The apparatus used for measurements was a digital camera DSC-W70 (Sony) with digital image analysis software.

Fourier Transform Infrared spectroscopy (FTIR) was used to characterize the presence of organic chemical groups at the surface of inorganic glass slides, reflecting the effectiveness of the developed procedure for chemical functionalization. Transmission technique was used (Nicolet 6700, Thermo Electron Corp.) within the range between 4000 and 1400cm^{-1} . This range was chosen because it contains most important peaks of $-\text{CH}$ stretching and functional groups without overlapping with glass characteristic peaks. Each spectrum was recorded with resolution of 2 cm^{-1} with a total of 32 scans.

2.3 Enzyme biotinylation for affinity conjugation

Enzyme biotinylation was carried out with NHS-biotin. The chemical group NHS reacts with amines from proteins that are present in lysine aminoacids and in a lower proportion on NH_2 located in terminal peptidic chains to form an amide bond (Diamandis and Christopoulos, 1991). NHS-biotin (3.0 mg) was dissolved in DMSO ($200\ \mu\text{L}$) and the solution volume was brought to $500\ \mu\text{L}$ with phosphate buffer saline (PBS, $\text{pH} = 7.4$). Enzymes GOx (1.8 mg) or HRP (1.7 mg) were dissolved in a volume of $250\ \mu\text{L}$ of this solution and incubated at $(25\pm 3)^\circ\text{C}$ for 4h. The biotinylated enzyme was purified and concentrated using ultra-centrifugal device with $30,000\text{ M}_w$ cutoff cellulose membrane (Amicon filter, Millipore). Centrifugation was conducted for 20 min (4 cycles x 5 min per cycle, at $12,000\text{ r.p.m.}$, 4°C) using a Hettich Mikro 200R centrifuge. After the first cycle, it was washed 3 times with PBS. The resulting biotinylated enzyme (GOx-biot or HRP-biot) was resuspended in PBS and stored at $(-16^\circ\text{C}\pm 2)^\circ\text{C}$ until further use.

2.4 Immobilization of enzyme to the insoluble support – Monoenzymatic Nanostructure

Enzyme was immobilized onto functionalized supports using glutaraldehyde (GA) as bi-functional crosslinking agent (Fig. 2). First of all, the immobilization of the linker onto the insoluble support was conducted, activating the surface. Hydroxyl-modified and thiol-modified glass slides were immersed into a solution of glutaraldehyde ($10\% \text{ v/v}$) adjusted to $\text{pH} = (3.0\pm 0.1)$ using HCl solution (0.1 mol.L^{-1}). Amine-modified supports (glass slides

and PS microplates) were also activated with 10% GA solution, but without pH correction (5.2 ± 0.1). The solid supports were kept in contact with the solution for about 10 min at room temperature, (25 ± 3)°C. After that, they were rinsed successively with PBS (4 times) in order to remove all remaining excess of unreacted glutaraldehyde. After that, the chemically functionalized solid supports were submerged into a GOx solution (5 U.mL^{-1} in PBS) at (6 ± 2)°C for 24 h (overnight incubation). In the case of microplates, the cavities were filled with 100 μL of the same enzyme solution. Under these conditions, glutaraldehyde groups react preferably with the amine-group of the enzymes. After the immobilization, the supports were cleaned with 0.05% Tween-20 in phosphate buffered saline (PBS-T). Lastly, the systems were dipped (or filled) for at least 30 min at (6 ± 2)°C in PBS media for removing some possibly non-specific adsorbed enzymes. FTIR spectra were also obtained after GA activation of silane-modified solid support following the procedures described in Section 2.2.2.

INSERT FIGURE 2

2.5 Bi-enzymatic Nanostructures

3D-nanostructured multilayer enzyme assembly was built on the surface of aminated modified polystyrene microplates. The first enzyme layer was covalently bonded to the amine group by the bi-functional linker glutaraldehyde (GA). In the sequence, the second enzyme layer was assembled using the protein affinity method based on the strong “biotin-avidin” interactions. Figure 3 shows the schematic diagram of the bi-enzymatic assembly.

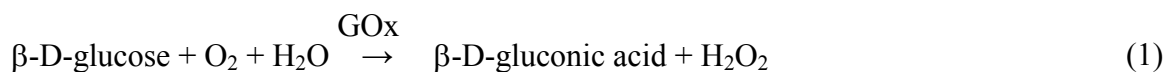
INSERT FIGURE 3

Figure 4 presents the flowchart of the entire process for the multilayer biotin-labeled enzyme assembly. The microplate cavities were filled with GA, protein, and enzyme solutions following the volumes, concentrations, and incubation periods specified in Figure 4 at (25 ± 3)°C.

INSERT FIGURE 4

2.6 Sensor Activity of GOx structures for Glucose Detection

A biochemical method was utilized for characterizing the activity of enzymes. The detection of glucose was based on the widely reported protocols using the enzymes reactions in cascade, i.e. GOx and HRP (Davidsson et al., 2004; Josephy et al., 1992; Mansur et al. 2011). Briefly, the biocatalytic activities of mono-enzymatic (GOx immobilized onto glass slides and amine-modified PS microplates) and in the bi-enzymatic structures were assayed by sensing β -D-glucose with the horseradish peroxidase mediated oxidation of 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine hydrochloride (TMB) by H_2O_2 . The GOx catalyzed oxidation process of glucose produces gluconic acid and H_2O_2 . HRP was used to analyze hydrogen peroxide via the catalyzed oxidation of TMB (TMB_{ox}). The oxidized specie TMB_{ox} was detected by UV-vis measurements at the wavelength $\lambda=645-655nm$. The representation of the overall reaction is shown in Equation 1 and Equation 2.



2.6.1 Activity of GOx in solution (“free”- not immobilized)

The activity of GOx and GOx-biot dissolved in phosphate saline buffer (PBS, pH 7.4, 0.25 U.mL⁻¹) was measured as follows. The assay of peroxidase activity, which is an indirect assay of glucose oxidase activity, was prepared by adding DI water (1200 μ L), PBS (variable to compensate substrate solution volume), GOx (~ 0.01 U.mL⁻¹), HRP (~ 5 U.mL⁻¹), and TMB (0.1 mg/mL) into the quartz cuvette ($V_{total}= 3mL$). The experiment was initiated by injecting different amounts of glucose (substrate) into the mixture of TMB, GOx, HRP, water, and PBS at room temperature aiming at the following final concentrations of glucose in the cuvette: 1.0 mmol.L⁻¹, 2.5 mmol.L⁻¹, 5.0 mmol.L⁻¹, 10.0 mmol.L⁻¹, 15.0 mmol.L⁻¹, and 20.0 mmol.L⁻¹. The increase in the UV-vis absorbance at 650 nm (Li et al., 2009; Song et al., 2010) was monitored as a function of time (Perkin-Elmer, Lambda EZ-210, wavelength from 800 nm to 500 nm, transmission mode). Control samples were prepared and subtracted from the measured absorbance using at least two replicates ($n \geq 2$).

2.6.2 Activity of Monoenzymatic Nanostructured Biosensor - GOx

The activity of GOx immobilized onto functionalized glass slides was detected using a method similar to that used to “free” GOx in solution. However, in the first case, the GOx solution was not added. Instead, the glass slide sample with GOx immobilized was introduced into the quartz cuvette containing $\sim 5 \text{ U.mL}^{-1}$ HRP, 0.1 mg.mL^{-1} TMB, and glucose (1.0 mmol.L^{-1} , 2.5 mmol.L^{-1} , 5.0 mmol.L^{-1} , 10.0 mmol.L^{-1} , 15.0 mmol.L^{-1} , or 20.0 mmol.L^{-1}) in a water/PBS solution ($V_{\text{total}} = 3\text{mL}$). Control samples were prepared and subtracted from the measured absorbance using at least two replicates ($n \geq 2$).

Kinetics parameters were calculated measuring initial velocity (Bolivar et al, 2008). Concentration of hydrogen peroxide over time, as a consequence of the reaction catalyzed by the enzyme (GOx), was determined assuming that the molar extinction coefficient of TMB_{ox} is equal to $3.9 \times 10^4 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ (Josephy et al., 1982; Rhee et al., 2010). Activity was also expressed by the efficiency coefficient or effectiveness factor (η) (Equation 3) (Grazú et al., 2003; Tischer and Wedekind, 1999).

$$\eta = (v'/v) * 100\% \quad (3)$$

where v' is the substrate conversion rate of immobilized enzyme and v is the substrate conversion rate of free enzyme.

Saturation curves for free GOx and immobilized GOx were obtained plotting the initial rate of the reaction (v_0) over the range of substrate concentrations tested, glucose [S]. The [Michaelis–Menten \(M-M\) kinetic model](#) (Equation 4) was fitted to the data (Origin 8.0 Microcal software) and the constants K_m , the Michaelis Constant, and V_{max} , enzyme maximum rate, were obtained.

$$v_0 = (V_{\text{max}} \times [S]) / (K_m + [S]) \quad (4)$$

In this case, as enzyme was immobilized in amine-modified polystyrene microplates, the absorbance associated with the oxidized specie TMB_{ox} in each well was recorded at $\lambda=655\text{nm}$ in a microplate reader (iMark™, Bio-Rad Lab. Inc.) ($\sim 5 \text{ U.mL}^{-1}$ HRP; 0.1

mg.mL⁻¹ TMB; and glucose: 1.0 mmol.L⁻¹, 2.5 mmol.L⁻¹, 5.0 mmol.L⁻¹, 10.0 mmol.L⁻¹, 15.0 mmol.L⁻¹, or 20.0 mmol.L⁻¹; water/PBS solution; V_{total} = 100μL).

2.6.3 Activity of bi-enzymatic nanostructures

The enzymatic cascade reaction shown in Equations 1 and 2 was also applied for evaluating the activity of GOx-HRP enzymes immobilized onto aminated polystyrene microplates (PS-NH₂). In this case, each microplate cavity (“well”) was filled (V_{total} = 100μL) with a water/PBS solution containing TMB (0.1 mg.mL⁻¹) and glucose (1.0 mmol.L⁻¹ or 15.0 mmol.L⁻¹). The absorbance was recorded in a microplate reader (λ=655nm). The relative bioactivity was calculated by subtracting control absorbance using a minimum of six replicates (n≥6).

3. Results and Discussion

3.1. Chemical Functionalization of insoluble support

3.1.1 Contact angle evaluation

The contact angle has been used quite often as a relatively simple method for accessing the preliminary properties of surfaces as a result of their chemical or physical modifications. In Fig. 5 it is shown the dependence of the contact angle with the different insoluble supports due to the chemical functionalization of the surfaces. As a general trend, the contact angle was significantly affected by the introduction of hydrophilic/hydrophobic species. That means, based on the results, the hydrophobicity of the surfaces increased in the following sequence of chemical groups: hydroxyls<“as-supplied glass slide”<amines<thiols. So, the results for contact angles (mean ± error) as a function of chemical groups added to the surfaces are summarized in Fig. 5. These values were coherent with the published reports dealing with alkylsilanes as modifiers for surfaces, networks and matrices (Chauhan et al., 2008; Howarter and Youngblood, 2006; Mansur et al. 2000, 2005; Mansur and Costa, 2008).

INSERT FIGURE 5

3.1.2 FTIR spectroscopy

Figure 6 and Figure 7 show the FTIR spectra of glass slides “as-supplied” (a) and modified with trialkoxysilanes (b). For the unmodified glass slide (Fig. 6(a) and Fig.7(a)), the broad band between $3700\text{-}3200\text{ cm}^{-1}$ corresponds to the fundamental stretching vibrations associated with different types of silanol groups. The stretching modes appear at 3660 cm^{-1} for vicinal silanols and 3440 cm^{-1} for internal silanols (Hernandez et al., 2005). For silane-modified glass slides (Fig. 6(b) and Fig.7(b)), it can be observed the presence of the antisymmetric (ν_{as}) and symmetric (ν_{as}) -CH_2 stretching vibration bands at $2930\text{-}2920\text{ cm}^{-1}$ and $2870\text{-}2860\text{ cm}^{-1}$ (Xu et al., 1998), respectively, mainly related to the propyl spacer group introduced by the organic functionalization of the glass surfaces. Besides that, some changes in the range from $3600\text{-}3200\text{ cm}^{-1}$ may be assigned to the incomplete condensation of Si-OH of the coupling agent formed during hydrolysis and development of intermolecular hydrogen bonds between the organofunctional groups and silanols on silica surface or of other silane molecule (Figure 8) (Chiang et al., 1981). FTIR from thiol-modified support (Fig. 7(b)) also presented weak peaks related to -CH_3 methyl groups at approximately 2956 cm^{-1} (ν_{as}) and 2886 cm^{-1} (ν_{as}) (Xu et al., 1998) from Si-OCH₃ bonds. It may be an indicative that the mercaptosilane was not fully hydrolyzed (Figure 8) (Hernandez et al., 2005).

Moreover, characteristic peaks from organofunctional groups of silanes were detected. In the 3-aminopropyl modified support (Fig. 6(b)), an important broad peak from $3500\text{-}3200\text{ cm}^{-1}$ is attributed to stretching symmetrical vibrations from N-H groups and the bands in the $1650\text{-}1550\text{ cm}^{-1}$ are assigned to primary amines (-NH_2) from in-plane scissoring bending absorptions (Costa-Júnior et al., 2009; Mansur et al., 2009). In the same way, MPTMS-modified glass slide spectra (Fig. 7(b)) shows a peak at 2550 cm^{-1} that is characteristic of 3-mercaptopropyl-trimethoxysilane associated with the thiol (-SH) vibration band (Bondarenco et al., 2010; Andrade et al., 2006; Hernandez et al., 2005).

Therefore, it can be stated that the developed procedure for altering the surface properties based on chemically changing the surfaces of glass slides was successful. Silanes have masked the glass slide hydroxyl groups and imposed their own surface properties. Essentially, the organosilanes would undergo a double-step process of hydrolysis and condensation allowing the formation of stable covalent bonds with the insoluble support. In

the first step, the hydrolysis of alkoxides with water leads to the formation of hydroxyl groups (silanol) and alcohol. In the second phase, silanols are metastable units which undergo self-condensation to thermodynamically more stable units with Si–O–Si siloxane bonds (“oxygen bridging”) by elimination of water (Bisticic et al., 2007; Mansur et al., 2000). Prior to this reaction, the glass slides were chemically etched with strong acid oxidizing medium ($\text{HNO}_3/\text{H}_2\text{O}_2$) to significantly increase the density of available hydroxyl sites on the surface for the later reaction. The organic chemical groups (i.e. amine or thiol) are not hydrolysable and will remain unreacted throughout the procedure for future coupling with the enzymes. A more in-depth analysis of the functionalization reactions taking place is beyond the scope of this study and similar chemical modification of insoluble supports has previously reported by our group (Mansur et al., 2008; Mansur et al., 2000).

INSERT FIGURE 6

INSERT FIGURE 7

INSERT FIGURE 8

3.2. Immobilization of enzyme to the insoluble support

The enzyme glucose oxidase (GOx) was immobilized to the previously chemically functionalized supports using glutaraldehyde. Based on literature (Costa-Júnior et al., 2009; Migneault et al., 2004; Okuda et al., 1991) glutaraldehyde acts as the bi-functional linker, forming stable covalent bonds between the chemical groups from the insoluble supports with the amine group of the enzyme. That means, under the appropriate processing conditions (pH, incubation time, buffer, temperature, etc) depending on the different chemical groups, amine, hydroxyl, and thiol, the reactions with GA have formed covalent bonds, imines (Fig. 9(f)), acetals (Fig. 9(b)), and thioacetals (Fig. 9(d)), respectively (Andrade et al., 2006, 2008; Costa-Júnior et al., 2009; Migneault et al., 2004, Okuda et al., 1991).

FTIR results have indicated the occurrence of reaction between GA and silane organofunctional groups. Amine-modified glass slides (Fig. 6(c)) have shown a relative increase on their imine ($-\text{C}=\text{N}-$) band ($\nu = 1634 \text{ cm}^{-1}$) and simultaneous drop on the amine

(-NH₂) band at 1580 cm⁻¹ after chemical crosslinking with glutaraldehyde. The imine group was formed by the nucleophilic reaction of the amine from modifier with the aldehyde (Schiff base formation) (Costa-Jr et al., 2009). Also, a vibration band at 1720 cm⁻¹ was detected. It is characteristic of stretching of C=O groups remaining from GA after reaction with APTMS-modified support once this crosslinker agent is a di-aldehyde (Mansur et al., 2008).

Comparison of the spectra of thiol-modified support before (Fig.7(b)) and after reaction with GA (Fig.7(c)) showed the disappearance of the -SH band (2550 cm⁻¹) that is consumed during the formation of thioacetal bonds (Figure 8) (Bondarenko et al., 2010). Also, the thiol reaction with GA resulted in significant alterations in the bands regarding to hydroxyls (-OH) and hydrogen bonds (3700-3000 cm⁻¹). It may be associated with several features like the formation of hydroxyl containing hemi-thioacetal product (CHO-(CH₂)₃-CH(OH)S-insoluble support), GA molecules association through hydrogen bonds to proton-donating species (such as silanol groups from glass slide), and -CH stretching vibrations of cyclic structures (shifted to higher frequency in comparison to aliphatic chains) (Mansur et al., 2008). Some of these features are shown in Figure 8 that presents the three-dimensional branched silane layer (Matinlina et al., 2007; Chiang et al., 1981) and its interactions with GA.

Hence, FTIR spectroscopy has given evidence that the experimental procedure developed in this work was successful on the activation of silane-modified solid supports with GA for permanent immobilization of enzymes.

3.3. Activity of Monoenzymatic Nanostructured Biosensor - GOx

Figure 9 shows the activity of the monoenzymatic nanostructures for GOx immobilized onto hydroxyl- (a,b), thiol- (c,d) and amine-modified (e,f) solid supports (glucose concentration of 15.0 mmol.L⁻¹). The assay is based upon the injection of specific substrate for the enzyme (GOx), i.e. the glucose solution in the system and measuring the spectrometric biochemical response as the reaction time evolved. The monitoring mechanism utilized the cascade of chemical reactions (Equation 1 and Equation 2), related to the oxidation of the reagent (TMB, catalyzed by the enzyme horseradish peroxidase,

HRP) with the by-product (hydrogen peroxide) resulting from the enzymatic oxidation of glucose. It should be said that these results are very relevant as far as the enzyme activity is concerned, because the immobilization process could have caused denaturation or hindered the enzyme catalytic site. Hence, the proposed immobilization process in the present study may have altered the 3D conformation of the enzyme due to the chemical covalent bond with the functionalized insoluble support but has retained its main biochemical activity.

INSERT FIGURE 9

In Fig. 10A it is presented the absorbance (at 650 nm) increase with the time obtained from GOx immobilized onto amine-modified slide for several glucose concentrations (1.0 mmol.L⁻¹, 2.5 mmol.L⁻¹, 5.0 mmol.L⁻¹, 10.0 mmol.L⁻¹, 15.0 mmol.L⁻¹, or 20.0 mmol.L⁻¹) as a consequence of the reaction taking place catalyzed by the enzyme. Therefore, the optical response (absorbance) was proportional to the analyte (glucose) concentration, indicating that the system has behaved as a biosensor device.

In order to compare the effect of the different surface modifiers (hydroxyl, amine, and thiol) and glucose concentration in the biosensor activity, Fig. 10B presents the biosensor response upon concentration of substrate of 5.0 mmol.L⁻¹ and 15.0 mmol.L⁻¹. In Fig. 10B it is also displayed the results from GOx adsorbed on glass slides un-treated (“as-supplied”) and free enzyme for comparison with the covalently immobilized systems. The chemical functionalization process of the insoluble support surfaces has shown a dramatic effect on the response of the biosensor. It is noteworthy that the system with GOx immobilized on the amine-modified support has provided the highest enzymatic activity to both enzyme concentrations tested. Next, the biosensor with the GOx covalently bonded to thiol-glass slide. The use of amine-modified solid phase has shown a remarkable increase in the absorbance of 500% compared to the hydroxylated-supports or adsorbed systems. From the data shown in Fig.10B, efficiency coefficients were also calculated and the results are shown in the insert. As in the construction of enzyme sensors it is desirable to obtain fastest conversion rate, the amino-modified solid support would be the best choice for the construction of an immobilized enzyme structure involving GOx from the point of view of efficiency coefficients.

Furthermore, the sensing response (absorbance) of the monoenzymatic systems was clearly proportional to the concentration of the glucose when it was raised by three times (i.e. from 5.0 to 15.0 mmol.L⁻¹). Based on the saturation curves (absorbance at 650 nm x time) for all glucose concentrations (1.0 mmol.L⁻¹, 2.5 mmol.L⁻¹, 5.0 mmol.L⁻¹, 10.0 mmol.L⁻¹, 15.0 mmol.L⁻¹, or 20.0 mmol.L⁻¹) and different immobilized systems, calibration curves for glucose detection were obtained (Fig. 10C). The absorbance at 3 min was chosen (linear range of absorbance x time curve) for classifying this sensor of glucose into a kinetic assay (Ukeda et al., 1998). For GOx immobilized on amine-modified support (Fig. 10C(a)), the linear response range of calibration curves was 1-15 mmol.L⁻¹ (R²=0.96); for thiol-modified (Fig. 10C(b)) is 1-20 mmol.L⁻¹ (R²=0.98) and hydroxyl-modified (Figure 10C(c)) is 1-5 mmol.L⁻¹ (R²=0.99). The linear regression equations are as follows (Equation 5, 6, and 7).

$$\text{For amine-modified support: Abs} = 0.0037 \times [\text{glucose}] + 0.015 \quad (5)$$

$$\text{For thiol-modified support: Abs} = 0.0026 \times [\text{glucose}] + 0.0041 \quad (6)$$

$$\text{For hydroxyl-modified support: Abs} = 7.55 \times 10^{-4} \times [\text{glucose}] + 0.0022 \quad (7)$$

INSERT FIGURE 10

Based on efficiency coefficient and in order to acquire several replicates simultaneously, leading to a more statistical representative results with seconds, functionalized amine glass slides were replaced by aminated modified polystyrene microplates (PS-NH₂). Moreover, such system would be easier to be moved to the industrial scale with automated process. Kinetics studies were conducted by plotting the reaction rate versus substrate concentration (Fig. 11). In all cases, there is an almost linear initial rise in the reaction velocity, but as the concentration increases, the enzyme saturation could be seen as an asymptotic flattening of the curve. This relationship is an indicative of hyperbolic Michaelis-Menten behavior and plotted data (glucose conversion rate x glucose substrate concentration) were fitted to the M-M equation. The curves were found to follow the M-M model and the obtained K_m (Michaelis constant for free enzymes) or K_m' (apparent Michaelis constant for immobilized enzyme) and V_{max} are shown in Figure 11.

INSERT FIGURE 11

The Michaelis constant, K_m , measured for “free” GOx, (18.3 ± 3.8) mmol.L^{-1} , is coherent with the reported value by Ukeda et al. (1998), (19 ± 2.2) mmol.L^{-1} , that evaluated the GOx enzyme activity in a medium (PBS, pH=7.2) similar to our experiments. On the other hand, dissimilar values were also reported in literature (Elcin and Akbulut, 1982; Ozyilmaz et al., 2004) due to the fact that enzyme activity is highly pH-dependent. The K_m' values for the enzymatic systems permanently immobilized on the solid-phases may be attributed to the combination of a number of effects taking place. In that sense, it could be similar (Li et al., 2001; Wang et al., 2005), higher (Bladino et al., 2001; Bulmus et al., 1997; Le et al., 1998; Ozyilmaz et al., 2004; Redinha et al., 1989; Suve et al., 1998), or lower (Pandey et al., 2007; Svobodová et al., 2002; Yagar et al., 2008) than the values measured from “free” enzymes. The K_m' obtained for GOx immobilized onto amine-modified polystyrene microplates was about three-fold lower than that for constant (K_m) for “free” GOx. The observed low value of K_m' reflects the high affinity and the enhanced activity of the immobilized GOx on amine-modified solid support, indicating that enzymes conformational changes, interaction between enzymes, microenvironment and/or surface chemical and physical properties have facilitated substrate access to active enzyme sites (Pandey et al., 2007; Svobodová et al., 2002). It has been reported that surface properties of support can have substantial influence on the distribution of the substrate (Svobodová et al., 2002) with hydrophilic character helping the diffusion of the substrate from the bulk to the support (Wang et al., 1998). In our case, despite the overall hydrophobic feature of surface (Section 3.1.1), attributed to propyl groups of silane, the organofunctional specie $-\text{NH}_2$ is predominantly hydrophilic which may have favored the diffusion of glucose to surface.

3.4. Activity of bi-enzymatic structure

First of all, GOx and HRP enzymes were biotin-labeled because the multilayer of bi-enzymatic structure was assembled using the “biotin-avidin” affinity interactions. After biotinylation procedure, both enzymes (GOx-biot and HRP-biot) remained active but with some reduction of its activity (less than 30%). The reduction of activity and even

inactivation after attaching biotin to enzyme has been reported by several authors (Schray et al., 1985).

The 3D-nanostructured multilayer enzyme was built on the surface of aminated microplates and tested by adding glucose solutions (1.0 mmol.L^{-1} or 15.0 mmol.L^{-1}). Figure 12 shows the cascade reactions involved in the detection of biochemical activity upon injecting the glucose substrate into the system. Also, it presents the position of each substrate relative to its specific catalyst. Glucose is added in bulk solution and has to diffuse to reach the GOx active site where, in the presence of O_2 dissolved in the aqueous medium, is converted into gluconic acid and hydrogen peroxide. H_2O_2 product is the substrate for peroxidase. It needs to diffuse across interenzyme solution reaching HRP where, in presence of the chromogenic substrate, produces oxygen radicals that oxidize TMB to TMB_{ox} yielding a blue color detected at 655 nm.

INSERT FIGURE 12

Biosensor response of the 3D bi-enzymatic nanostructure was evaluated and the result is shown in Figure 13 (glucose concentrations of 1.0 mmol.L^{-1} and 15.0 mmol.L^{-1} after 50 min of substrate introduction in the media). Bi-enzyme arrangement has demonstrated biochemical activity upon injecting the glucose substrate into the system indicating that immobilization and assembling processes did not result in inactivation of catalytic sites. The absorbances of the bi-enzymatic structures were influenced by the concentration of the glucose and, in each structure, sensing response for control and 1.0 mmol.L^{-1} and 15.0 mmol.L^{-1} substrate concentrations were significantly different.

INSERT FIGURE 13

As a proof of concept, the bi-enzyme system built in this study was assayed using real samples of regular and “sugar-free” soft drinks. In brief, the food and beverage industry is a very broad and highly profitable market. Among the long list of products, the area of non-alcoholic beverages, like “soft drinks” and “energy drinks”, has been very attractive but also has called the attention and concern due to the increasing number of health problems in

the population associated with obesity and weight-related diseases, promoting diabetes in children and adults, dental decay, hypertension and a host of other problems. A soft drink (also called soda, or carbonated beverage) is a beverage that typically contains water (often, but not always carbonated water), a sweetener, and a flavoring agent. Regular soft drinks are sweetened with cane (Latin America, Africa) or beet sugar (Europe), high-fructose corn syrup (HFCS, USA), or blends of these sweeteners. These sugars result in a mixture of sucrose and/or fructose and glucose in the final product. Most diet soft drinks are sweetened with aspartame. The typical total sugar content of regular soft drink (1 can of 355 mL or 12 oz in the United States) is approximately of 39g or ~11,5 wt% on average, with the sugar in the form of HFCS (~45% glucose and 55% fructose) (Sadecka and Polonsky, 2000; Malik et al., 2006).

For the reasons previously mentioned, one soft drink (Sprite™, Coca Cola Company) was selected as the “real” sample used for testing the multi-enzymatic system.

The result is presented in Figure 14. It can be observed the development of the blue color in the cavities with the sugar-sweetened soft drink (Figure 14, left) compared to the unchanged color of the cavities with sugar-free samples (Figure 14, right). These findings are very significant as far as the food/beverage nanotechnology research is concerned because the nano-scale highly integrated system developed in this study was validated using commercial samples with the presence of all interferents in the medium without compromising the bioactivity response. It should be said that the quantitative analysis was not the goal but a proof of the feasibility of building a novel nano-biosensor using 3D nanohybrid structure with “bottom-up” approach.

INSERT FIGURE 14

4. Conclusion

In this study, a new bi-enzymatic nanostructured biosensor was developed. The system was designed using the layer-by-layer method with the covalent immobilization of the first enzyme on chemically functionalized solid supports followed by the conjugation of the second enzyme based on the “avidin-biotin” interaction. The bi-enzyme systems were assayed using commercially available soft drinks, one sugar-sweetened and the other

“sugar-free”. They have behaved as glucose nanosensors with the complex built-in 3D architectures. Based on the results, it can be foreseen that these new promising nanomaterials may be explored in relative facile methods for food and beverages analyses by diabetes patients, health-care professionals, food industries and others. That can be very valuable on preventing accidents caused by ingestion of incompatible food or beverages, detection of allergenic species, screening-tests for toxic components and contamination, and many others.

Acknowledgments

The authors gratefully acknowledge the financial support from the Brazilian Research funding agencies, CAPES, FAPEMIG and CNPq.

References

- Andrade, G.I., Mansur, A.A.P., Stancioli, E.F.B., Vasconcelos, W.L., Mansur, H.S., 2006. *Biomedical Materials* 1, 221-234.
- Andrade, G.I., Stancioli, E.F.B., Mansur, A.A.P., Mansur, H.S. 2008. *Journal of Materials Science* 43, 450-463.
- Blandino, A., Macias, M., Cantero, D., 2001. *Process Biochem.* 36, 601–606.
- Bisticic, L., Volovšek, V., Dananić, V., 2007. *Journal of Molecular Structure* 834–836, 355–363.
- Bradley, C.R., Rechnitz, G.A., 1984. *Anal. Chem.* 56, 664-667.
- Bulmus, V., Ayhan, H., Piskin E., 1997. *Chem. Eng. J.* 65, 71–76.
- Campuzano, S., Loaiza O.A., Pedrero, M., Villena, J.M., Pingarrón, J.P., 2004. *Bioelectrochemistry* 63, 199– 206.
- Cao, L. 2005. *Current Opinion in Chemical Biology* 9, 217-226.
- Chauhan, A. K., Aswal, D. K., Koiry, S. P., Gupta, S. K., Yakhmi, J. V., Sürgers, Guerin, D., Lenfant, S., Vuillaume, D., 2008. *Applied Physics A* 90, 581–589.
- Chen, X., Zhu, J., Tian, R., Yao, C., 2012. *Sensors and Actuators B* 163, 272-280.
- Costantino, H.R., Schwendeman, S.P., Langer, R., Klibanov, A.M., 1998. *Biochemistry (Moscow)* 63, 357–422.

- Costa, H.S., Andrade, G.I., Stancioli, E.F.B., Pereira, M.M., Oréface, R.L., Mansur, H.S., 2008. *Journal of Materials Science* 43, 494-502.
- Costa-Junior, E.S., Barbosa-Stancioli, E.F., Mansur, A.A.P., Vasconcelos, W.L., Mansur, H.S., 2009. *Carbohydrate Polymer* 76, 472-481.
- Davidsson, R., Genin, F., Bengtsson, M., Laurell, T., Emnéus, J., 2004. *Lab Chip* 4, 481-487.
- Delvaux, M., Walcarius, A. and Demoustier-Champagne, S., 2005. *Biosens. Bioelectron.* 20, 1587- 1594.
- Elcin, Y.M., Akbulut, U., 1992. *Biomaterials* 13, 156-161.
- Emregul, E., Sungur, S., Akbulut, U., 2005. *J. Biomater. Sci. Polymer Edn.* 16, 505-519.
- Fu, J., Liu, M., Liu, Y., Woodbury, N.W., Yan, H., 2012. *J. Am. Chem. Soc.* 134, 5516-5519
- Gulla, K.C., Gouda, M.D., Thakur, M.S., Karanth, N.G., 2004. *Biosens. Bioelectron.* 19, 621-625.
- Guo, Z., Guilfoyle, R.A., Thiel, A.J., Wang, R., Smith, L.M., 1994. *Nucleic Acids Res.* 22 , 5456-5465.
- Hermanson, G.T., 2008. *Bioconjugate Techniques*, 2nd. ed. Elsevier, Amsterdam.
- Howarter, J., Youngblood, J.P., 2006. *Langmuir* 22, 11142-11147.
- Jeykumary, D.R.S., Narayanan, S.S., 2008. *Biosens. Bioelectron.* 23, 1686–1693.
- Jianrong, C., Yuqing, M., Nongyue, H., Xiaohua, W., Sijiao, L., 2004. *Biotechnology Advances* 2, 505-518.
- Josephy, P.D., Eling, T., Mason, R., 1982. *J. Biol. Chem.* 257, 3669 -3675.
- Kong, T., Chen, Y., Ye, Y., Zhang, K., Wang, Z., Wang, X., 2009. *Sensors and Actuators B* 138, 344-350.
- Li, Z.F., Kang, E.T., Neoh, K.G., Tan, K.L., 1998. *Biomaterials* 19, 45–53.
- Li, Q., Luo, G., Feng, J., Zhou, Q., Zhang, L., Zhu, Y., *Electroanalysis* 2001, 13, 413-416
- Li, B., Du, Y., Li, T., Dong, S., 2009. *Analytica Chimica Acta* 651, 234-240.
- Malik, V.V., Schulze, M.B., Hu, F.B., 2006. *American Journal of Clinical Nutrition* 84, 274-288.
- Manesh, K.M., Kim, H.T., Santhosh, P., Gopalan, A.I., Lee, K.-P., 2008. *Biosens. Bioelectron.* 23, 771-779.

- Manso, J., Mena, M.L., Sedeno, P.Y., Pingarrón, J., 2007. *J. Electroanal. Chem.* 603, 1-7.
- Mansur, A.A.P., Nascimento, O.L., Vasconcelos, W.L., Mansur, H.S., 2008. *Materials Research* 11, 293-302.
- Mansur, A.A.P., Mansur, H.S., 2011. *Cement & Concrete Composites* 33, 742-748.
- Mansur, A., Mansur, H., González, J., 2011. *Sensors* 11, 9951-9972.
- Mansur, H.S., Oréface, R.L., Vasconcelos, W.L., Machado, L.J.C., 2000. *Biomacromolecules* 1, 789-797.
- Mansur, H.S., Oréface, R.L., Vasconcelos, W.L., Lobato, Z.I.P., Machado, L.J.C., 2001, *Adsorption* 7, 105-116.
- Mansur, H.S., Machado, L.J.C., Vasconcelos, W.L., Lobato, Z.I.P., 2002. *Spectroscopy* 16, 351-360.
- Mansur, H.S., Oréface, R.L., Vasconcelos, W.L., Lobato, Z.P., Machado, L.J.C., 2005. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 16, 333– 340.
- Mansur, H.S., Costa, H.S., 2008. *Chemical Engineering Journal* 137, 72–83.
- Migneault, I., Dartiguenave, C., Bertrand, M.J., Waldron, K.C., 2004. *BioTechniques* 7, 790-802.
- Okuda, K., Urabe, I., Yamanda, Y., Okada, H., 1991. *Journal of Fermentation and Bioengineering* 71, 100–105.
- Ozyilmaz, G., Tukul, S.S., Alptekin, O., 2005. *Journal of Molecular Catalysis: Enzymatic* 35,154-160.
- Pandey, P., Singh, S. P., Arya, S. K., Gupta, V. Datta, M., Singh, S. and Malhotra, B. D., 2007. *Langmuir* 23, 3333-3337.
- Peng, G., Zhao, C., Liu, B., Ye, F., Jiang, H., 2012. *Applied Surface Science* 258, 5543-5552.
- Pescador, P., Katakis, I., Toca-Herrera, J.L., Donath, E., 2008. *Langmuir* 24, 14108-14114
- Redinha, J.S., Brett, A.M.O., Pereira, J.L.C., da Silva, M.A., Gil, M.H., 1989. *Bioelectrochemistry and Bioenergetics* 22, 379-390.
- Rhee, S.G., Chang T.-S., Jeong, W., Kang, D., 2010. *Molecules and Cells* 29, 539-549.
- Sadecka, J., Polonsky, J., 2000. *Journal of Chromatography A* 880, 243–279.
- Sampath, S., Lev, O., 1996. *Anal. Chem.* 68, 2015-2021.
- Schray, K.J., Gergits, F., Niedbala, R.S., 1985. *Anal. Biochem.* 149, 225-228.

- Sela, M., Lifson, S., 1959. *Biochimica et Biophysica Acta* 26, 471-478.
- Shan, D., Zhu, M., Xue, H., Cosnier, S., 2007. *Biosens. Bioelectron.* 22, 1612–1617.
- Sondengaard, C.R., Mcintosh, L.P., Pollastri, G., Nielsen, J.E., 2008. *Journal of Molecular Biology* 376, 269-287.
- Song, Y., Qu, K., Zhao, C., Ren, J., Qu, X., 2010. *Advanced Materials* 22, 2206–2210.
- Su, Q., Klinman P. K., 1999, *Biochemistry* 38, 8572-8581.
- Suye, S., Kumon, Y., Ishigaki, A., 1998. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 27, 245–248.
- Svobodová, L., Šnejárková, M., Hianik, T., 2002. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 373, 735–741.
- Swoboda, B.E.P., 1965. *Biochim. Biophys. Acta* 175, 365–369.
- Tukel, S.S., Alptekin, O., 2004. *Process Biochem.* 39, 2149–2155.
- Ukeda, H., Ohira, M., Sarker, A. K., Sawamura, M., 1998, *Food Research International* 31, 297-302.
- Wang, B., Li, B., Deng, Q., Dong, S., 1998. *Anal. Chem.* 70, 3170-3174.
- Wang, J., Myung, N.V., Yun, M., Monbouquette, H.G., 2005. *Journal of Electroanalytical Chemistry* 575, 139-146.
- Yagar, H., Ertan, F., Balkan, B., 2008. *Preparative Biochemistry & Biotechnology* 38, 13–23.
- Tsuge, H., Natsuakai, O., Ohashi, K., 1975. *J. Biochem.* 78, 835–843.
- Uang, Y.M., Chou, T.C., 2003. *Biosens. Bioelectron.* 19, 141–147.
- Zhao, Z.W., Chen, X.J., Tay, B.K., Chen, J.S., Han, Z.J., Khor, K.A., 2007. *Biosens. Bioelectron.* 23, 135–139.
- Zhu, L., Zhai, J., Guo, Y., Tian, C., Yang, R., 2006. *Electroanalysis* 18, 1842–1846.

Figure captions

Figure 1 - Chemical functionalization of silica-derived solid supports: (a) general formula for a silane coupling agent; (b) thiol-modified support; (c) amine-modified support; (d) Hydroxyl-modified support.

Figure 2 - Schematic representation of enzyme immobilization onto silane-functionalized supports using glutaraldehyde (GA) as bi-functional crosslinking agent.

Figure 3 - Schematic diagram of the multilayer enzyme.

Figure 4 – Flowchart of multilayer enzyme assembly process.

Figure 5 - Evolution of contact angle measurements for surface modified samples.

Figure 6 - FTIR spectra of (a) glass slide “as supplied”; (b) amino-modified glass slide and (c) GA activated amino-modified glass slide.

Figure 7 – FTIR spectra of (a) glass slide “as supplied”; (b) thiol-modified glass slide and (c) GA activated thiol-modified glass slide.

Figure 8 - Three-dimensional branched thiol silane layer and its interactions with GA.

Figure 9 - UV-vis absorption spectra from GOx immobilized onto (a) hydroxyl-, (c) thiol-, and (e) amino-modified support showing time dependent change in the absorption at 650 nm due to TMB_{ox} specie formation. Schematic view of the immobilization of glucose oxidase using glutaraldehyde on solid supports with surface chemical functional groups: hydroxyl (b), thiol (d), and amine (f) (GOx sphere model obtained at RCSB- Protein Data Bank).

Figure 10 – (A) Evolution of absorbance at 650 nm with time as function of glucose concentration. (B) Relative absorbance for 5.0 mmol.L⁻¹ and 15.0 mmol.L⁻¹ (9 min) for different surface modifications and free and adsorbed GOx. Insert: Efficiency coefficients (C) Biosensors calibration curves of immobilized GOx onto amino- (a), thiol- (b), and hydroxyl-modified supports (c).

Figure 11 – Glucose conversion rate versus glucose substrate concentration for free GOx (a) and immobilized GOx onto amino-modified polystyrene microplates (b) obtained from M-M equation fitting.

Figure 12 – Schematic representation of the cascade reactions for analyzing the biochemical activity of the cascade structures (HRP, GOx, and Avidin three dimensional views obtained from RCSB - Protein Data Bank).

Figure 13 – Biosensor responses of 3D bi-enzymatic nanostructure with glucose concentrations of 1.0 mmol.L⁻¹ e 15.0 mmol.L⁻¹ (50 min).

Figure 14 – Proof of concept of 3D bi-enzymatic structure 1 assayed using real samples of regular and sugar-free soft drinks.

Figures

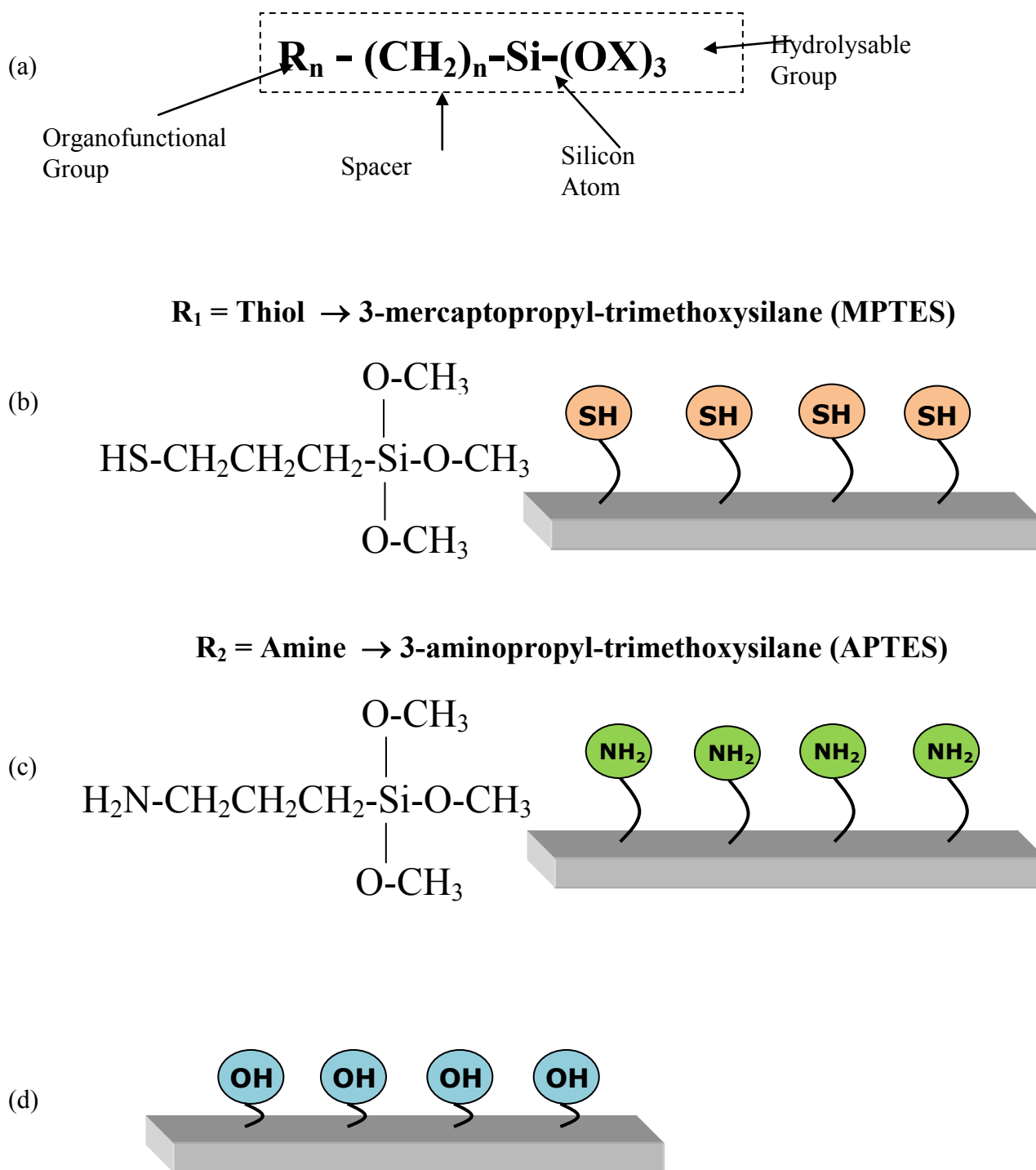


Figure 1.

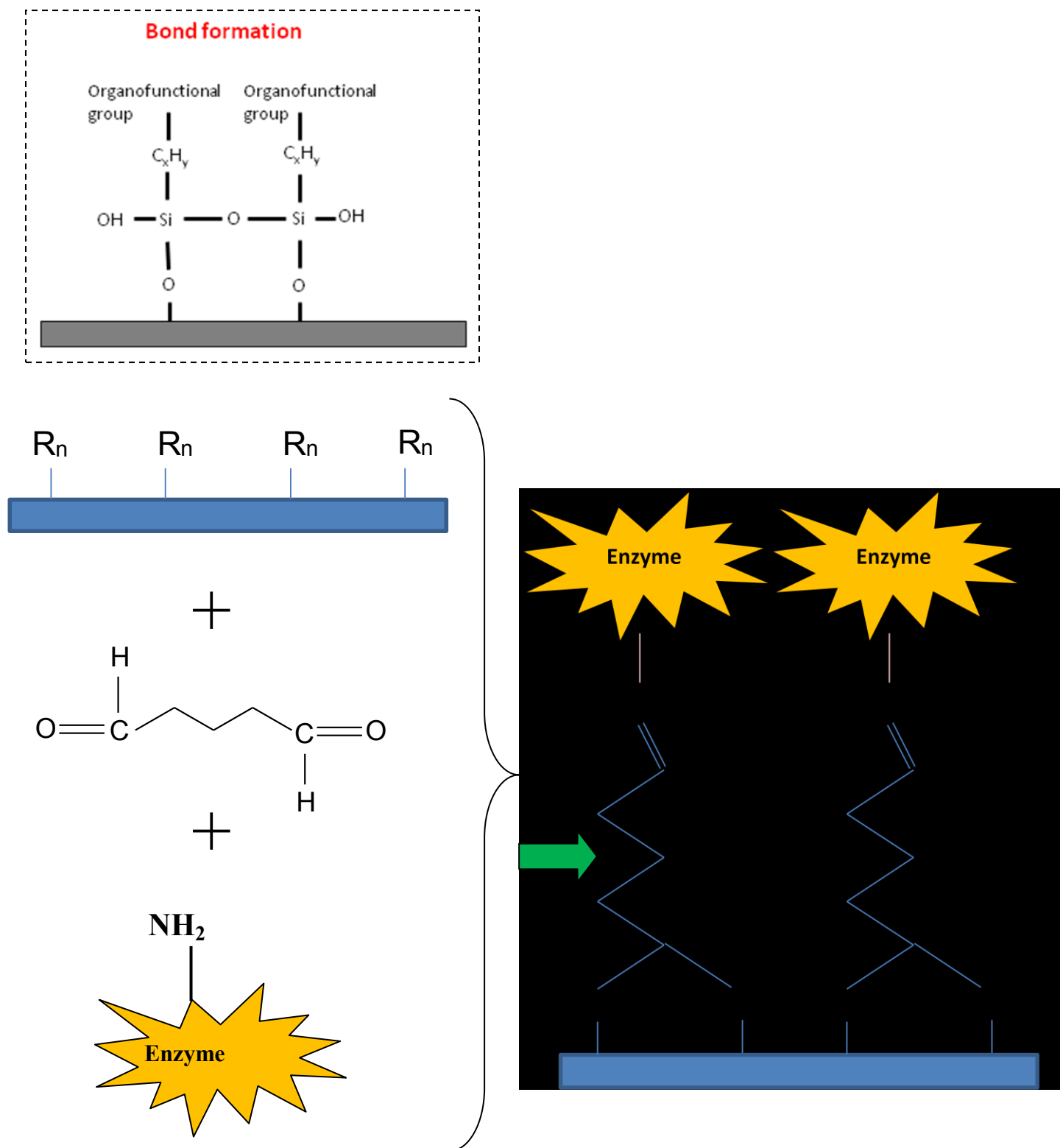


Figure 2.

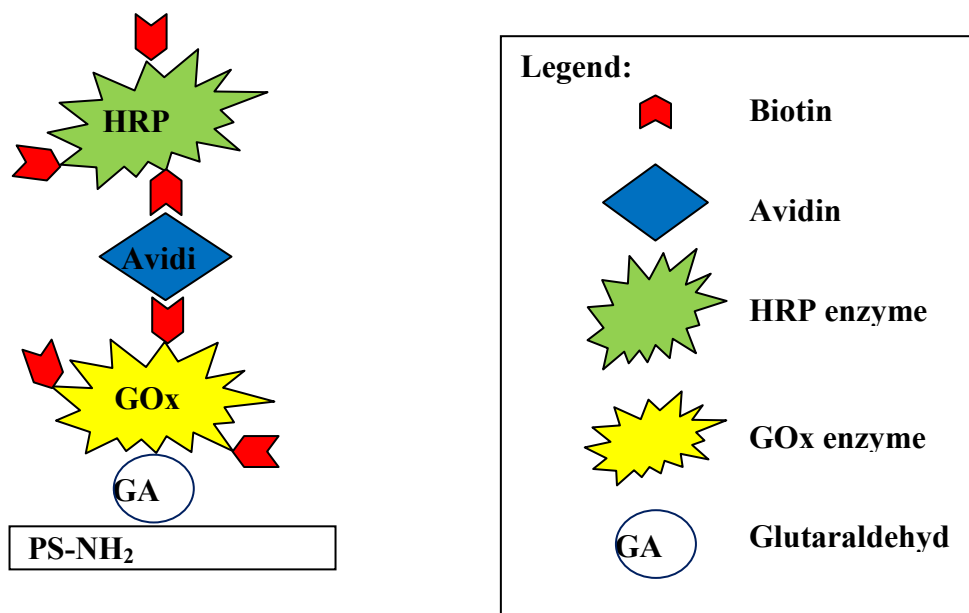


Figure 3.

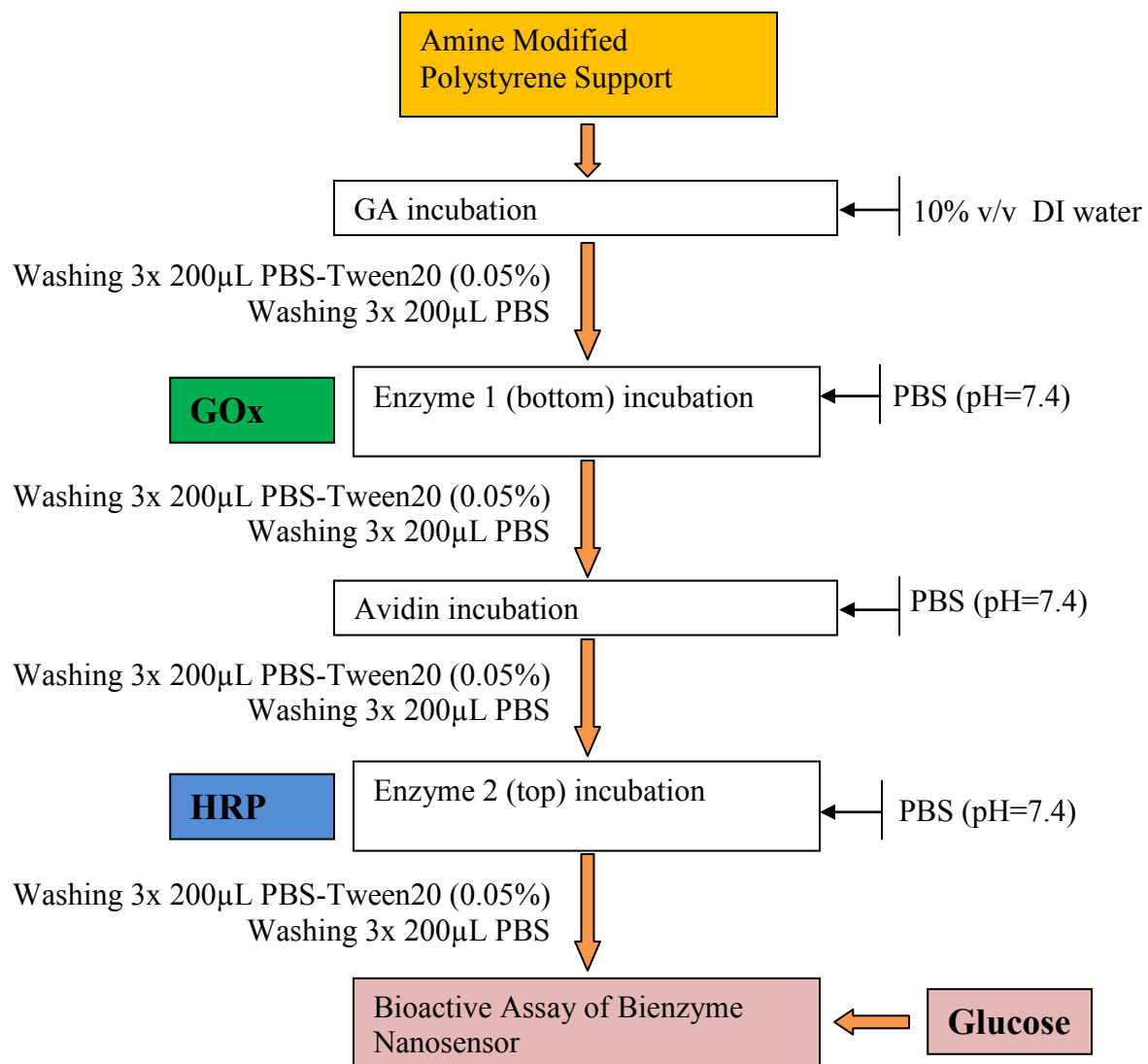


Figure 4.

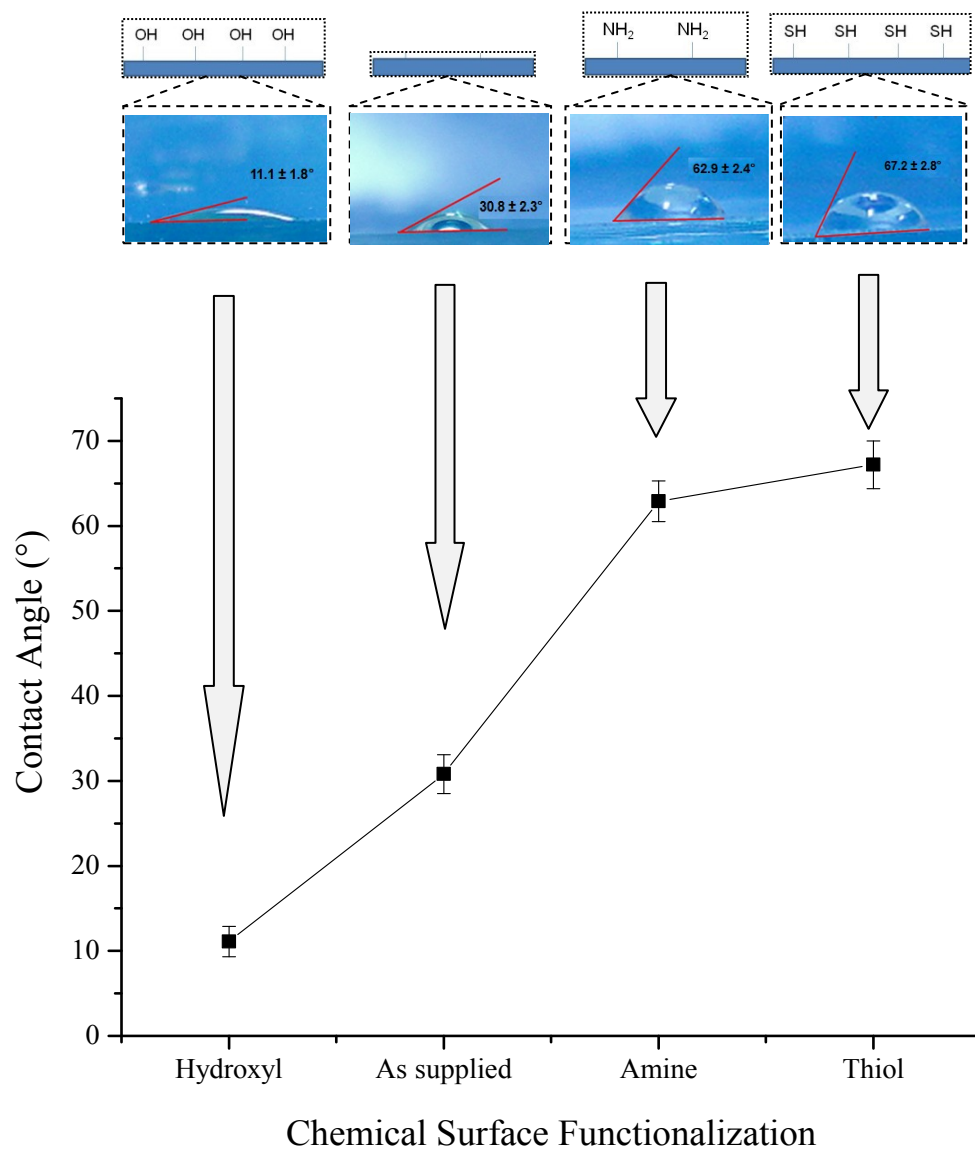
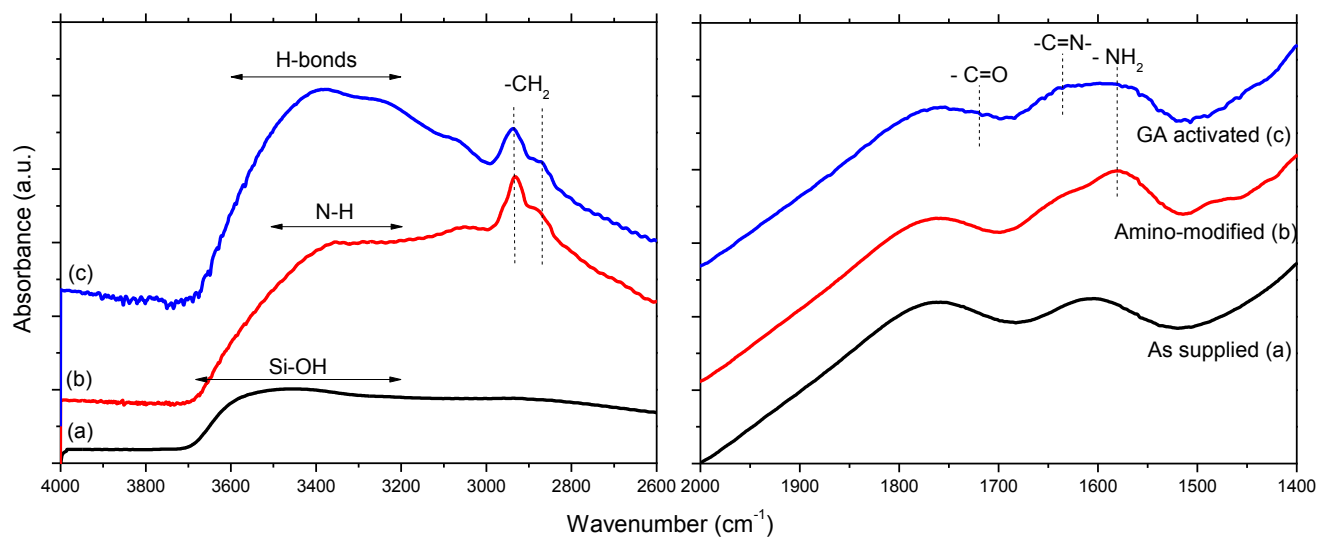


Figure 5.

**Figure 6.**

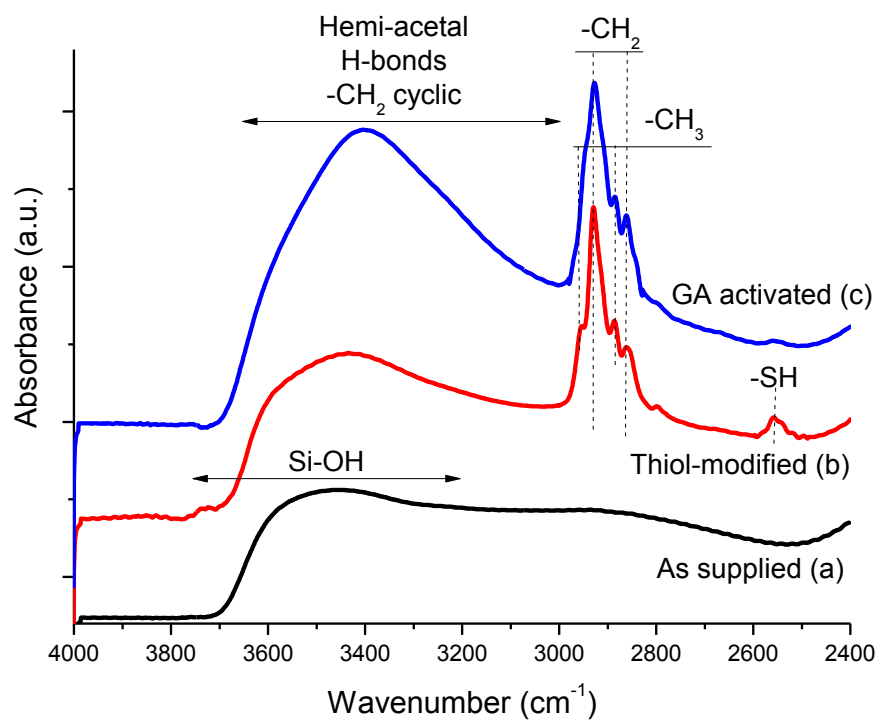


Figure 7.

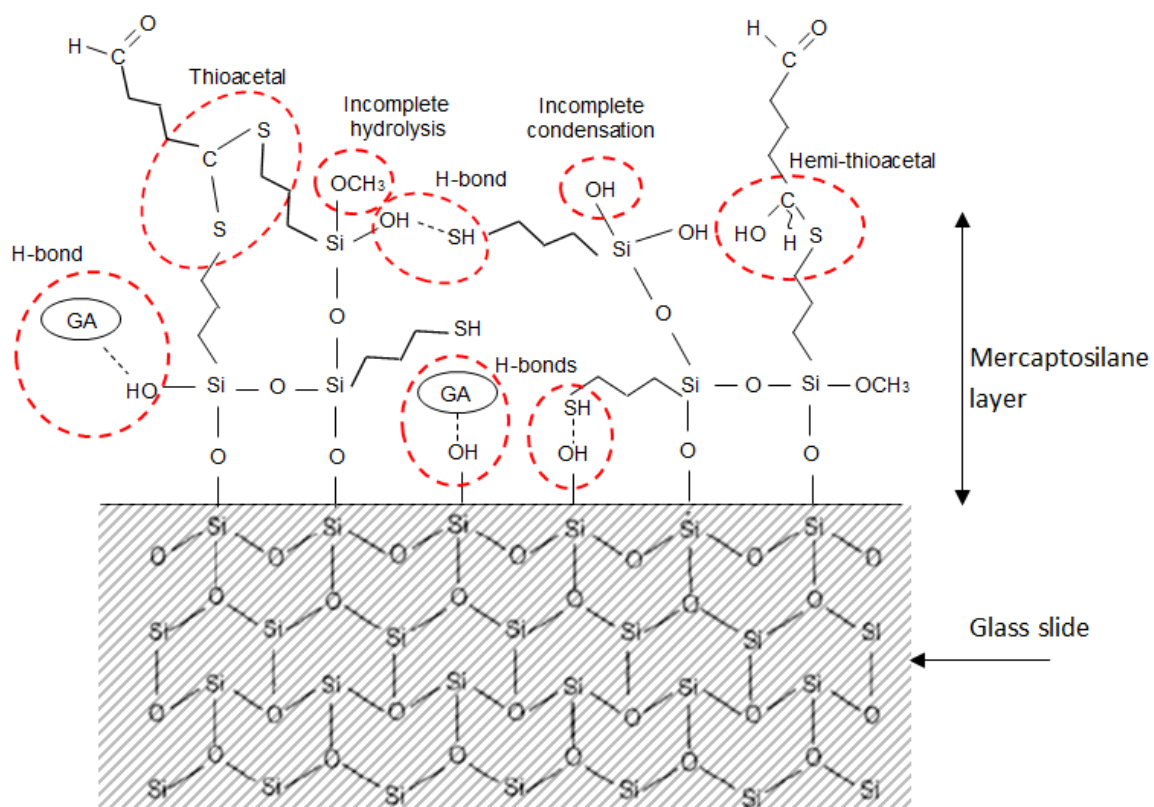


Figure 8.

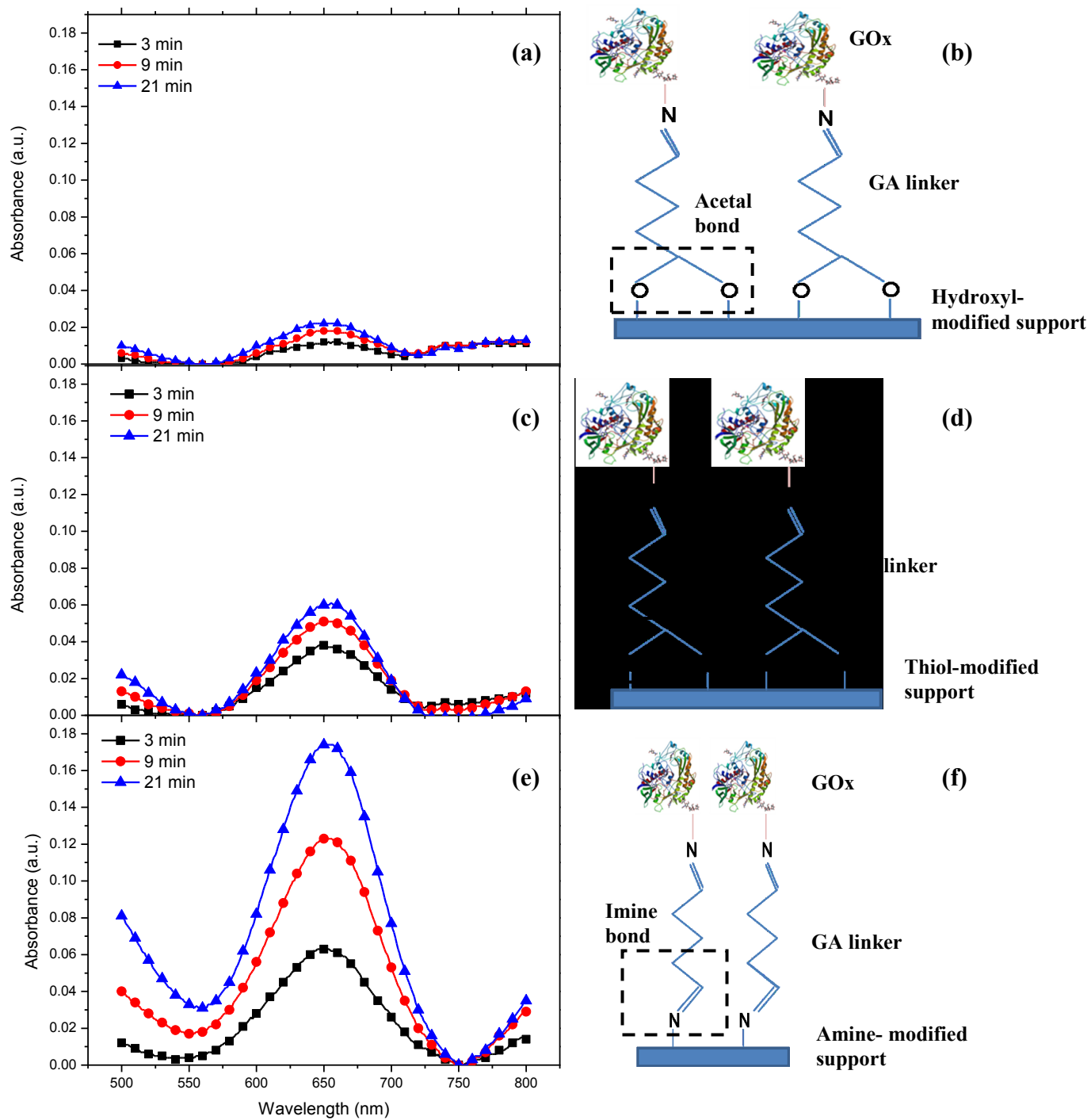


Figure 9.

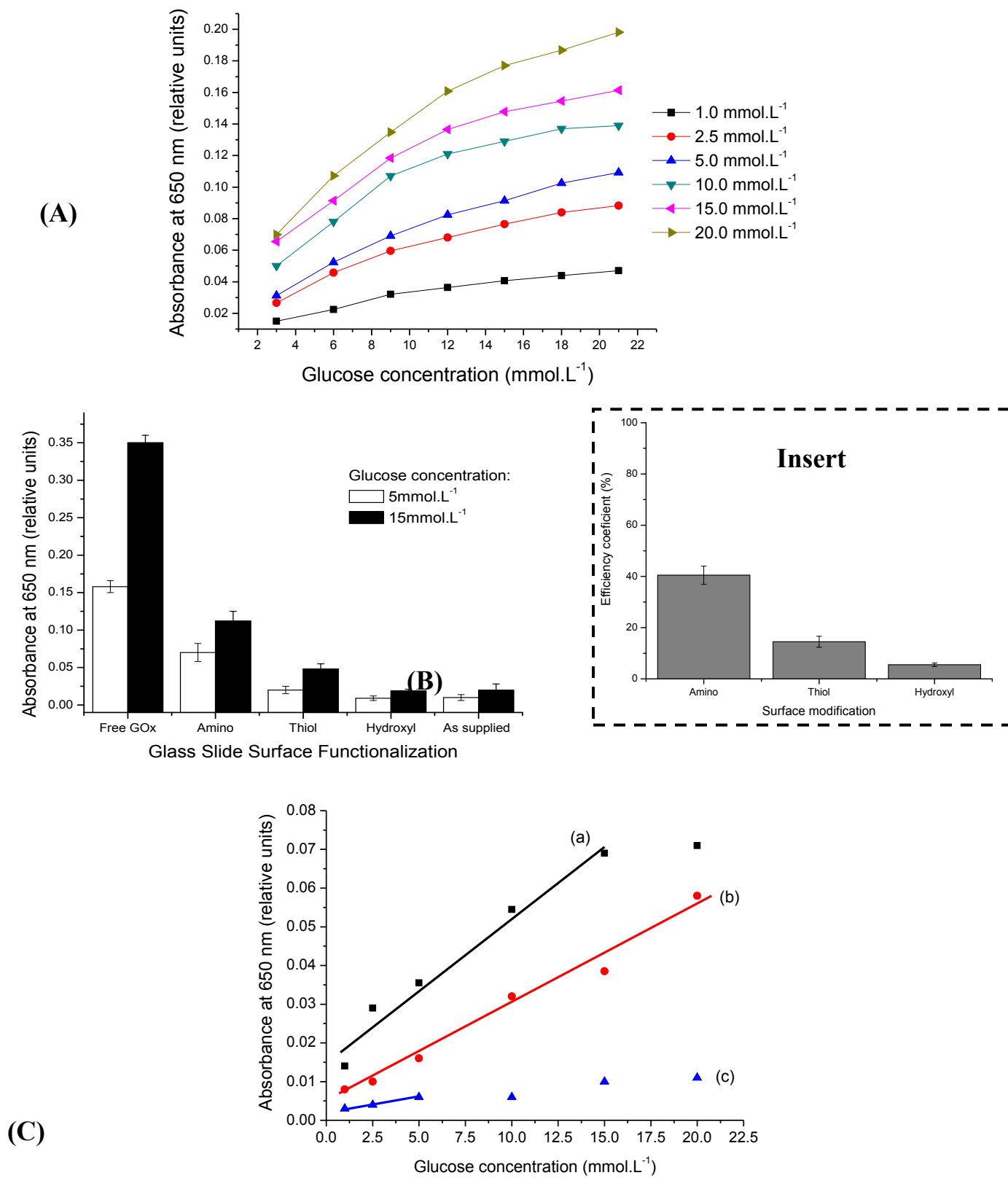


Figure 10.

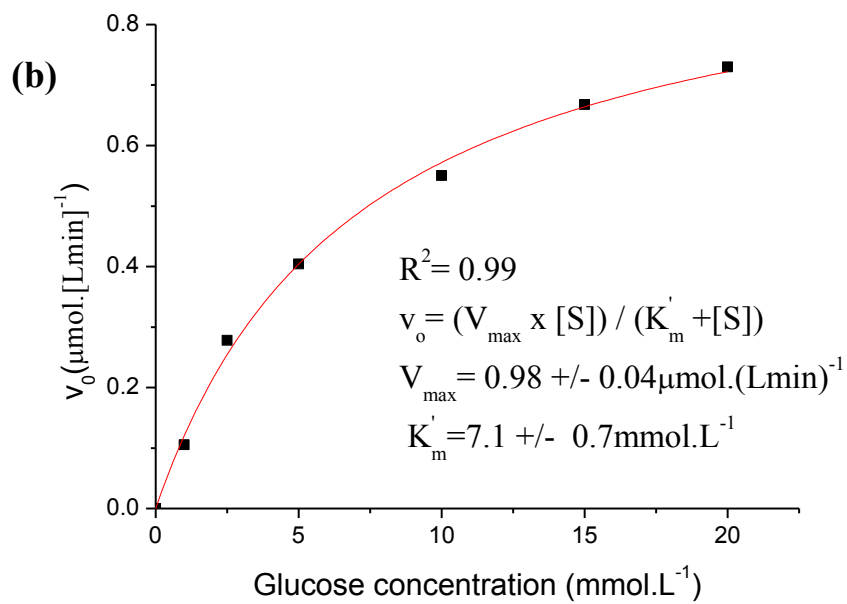
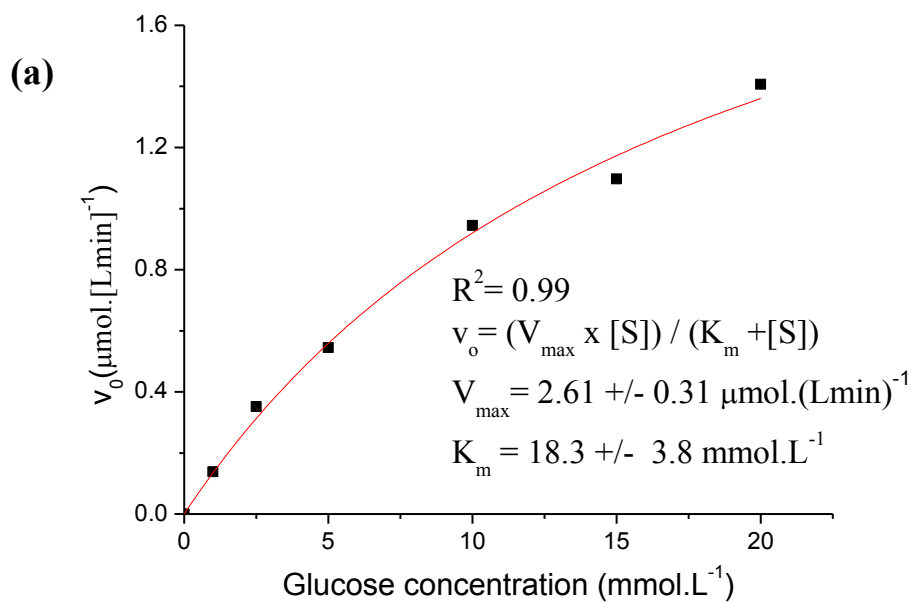


Figure 11.

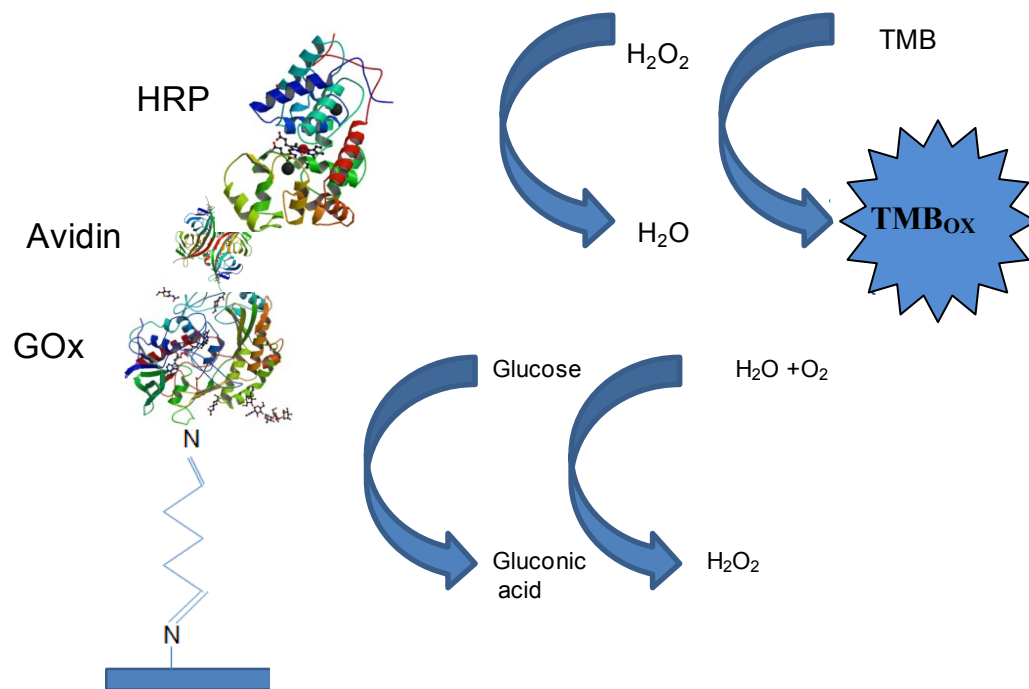


Figure 12.

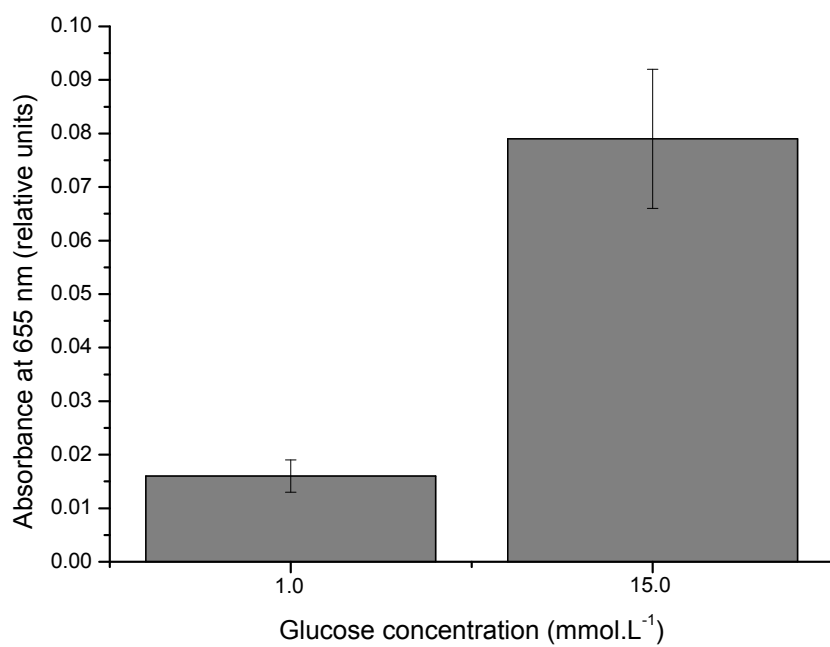
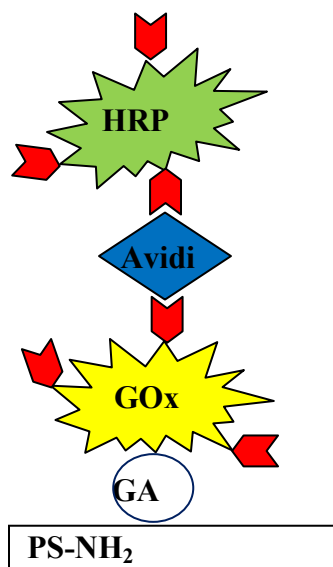


Figure 13.

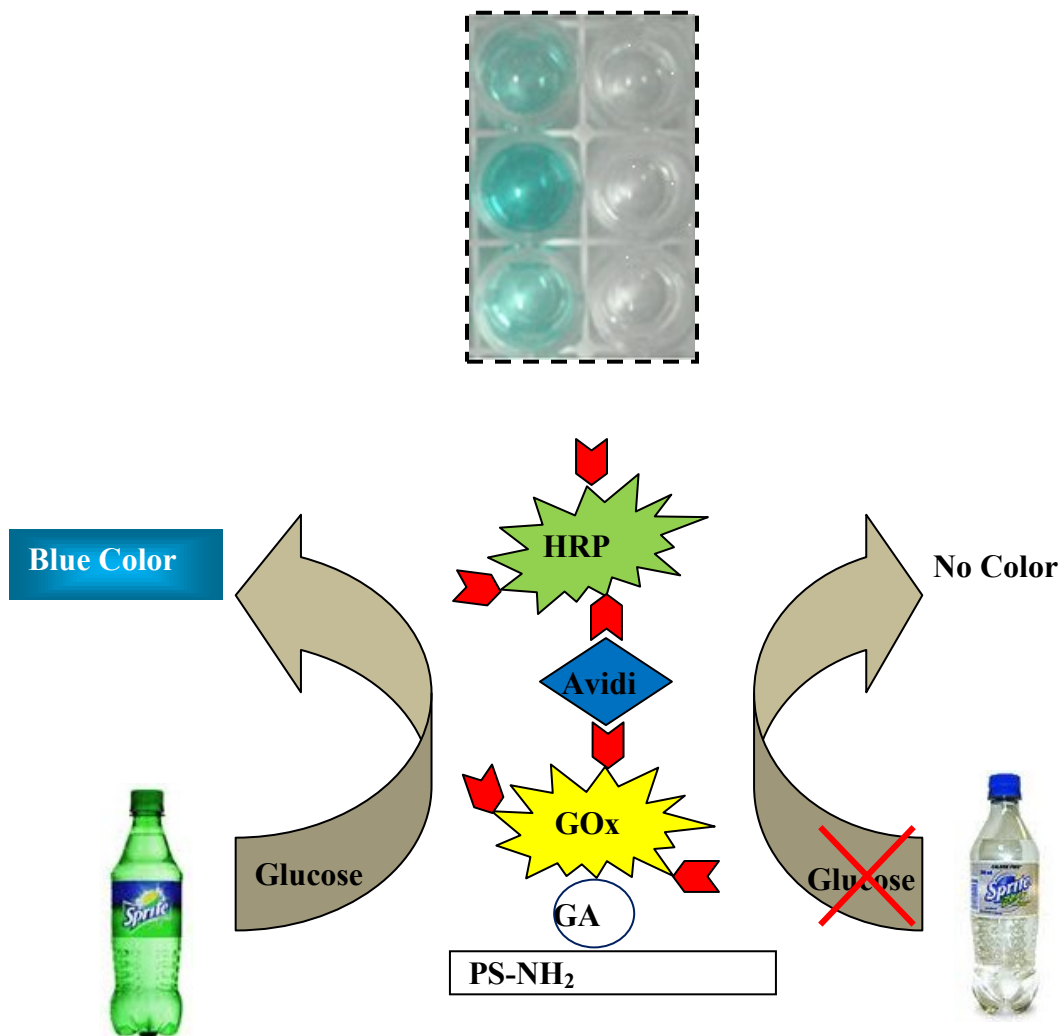


Figure 14.