UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

INSTITUTO DE QUÍMICA

Programa de Pós-Graduação em Química

RUBENS ARAUJO DA SILVA

Sensores Particulados e Nanomecânicos

Versão corrigida da Tese defendida

São Paulo

Data do Depósito na SPG:

29/07/2015

RUBENS ARAUJO DA SILVA

Sensores Particulados e Nanomecânicos

Tese apresentada ao Instituto de Química da
Universidade de São Paulo para obtenção do
Título de Doutor em Química

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Denise Freitas Siqueira Petri

São Paulo

2015

Ficha Catalográfica
Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

S586s Silva, Rubens Araujo da
Sensores particulados e nanomecânicos / Rubens Araújo da
Silva. -- São Paulo, 2015.
236p.

Tese (doutorado) – Instituto de Química da Universidade de
São Paulo. Departamento de Química Fundamental.
Orientador: Petri, Denise Freitas Siqueira

1. Adsorção : Físico-química 2. Sensores químicos 3. Polímeros
(matérias) 4. Nanopartículas I. T. II. Petri, Denise Freitas
Siqueira, orientador.

541.3453 CDD

Dedico aos meus pais, João e Nice,

aos meus irmãos, tia Joana

e à minha esposa Lilian

pelo esforço, apoio, incentivo e carinho

para que eu conquiste meus objetivos.

Dedico também a minha filha Sofia

pelo carinho e amor inesgotável.

Agradecimentos

- ❖ À Profª Drª Denise Petri pela orientação, oportunidade, incentivo e compreensão.
- ❖ À Profª Ana Carmona, Profª Paola Cório e a Profª Michele pela cooperação e auxílio.
- ❖ Aos meus familiares que de alguma forma compreenderam a minha ausência em reuniões e festas.
- ❖ Aos primos que sempre me receberam de braços abertos (Marly, Marlene, Carol, Guilherme, Letícia, Luciana, Maciel e Valderez), bem como a Tia Elenita pelo carinho.
- ❖ A minha cunhada Elza pelo incentivo incessante, curiosidade e desejo de sempre aprender algo novo.
- ❖ Aos amigos de laboratório (Vânia, Leandro, Taís, Jorge, Paulo, Robson, Stalin, Elias e Georgia) pela descontração, risadas, cafés e companhia diária.
- ❖ Aos amigos que fiz na Espanha (Valério, Carmen, Joselo, Manuel, Oscar, Marcus, Rocío e Sheila).
- ❖ Ao Drº Javier Tamayo e Drª Monserrat Calleja pela recepção em seu grupo de pesquisa no Instituto de Microeletrônica de Madri.
- ❖ À Drª Priscila Kosaka pela amizade, conselhos, recepção, ensinamento e muitas risadas e cafés na Espanha.
- ❖ Aos amigos Marco, Fernanda, Tiago Rosa, Edmilson, Jean, Cesar, Tiago Arthur, Tatiana, Natália e Lucas pelas discussões científicas e não científicas.
- ❖ Aos funcionários da Central Analítica pela disponibilidade, auxílio e análises.
- ❖ Ao Instituto de Química pela infraestrutura e pelos funcionários altamente qualificados.
- ❖ Ao CNPq e a FAPESP pelo apoio financeiro.

Resumo

Silva, R. A. **Sensores Particulados e Nanomecânicos**, 2015, 236p. Tese de Doutorado. Programa de Pós-graduação em Química. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Esta tese descreve o desenvolvimento e aplicação de sensores particulados (Parte A) e nanomecânicos (Parte B). Nanopartículas de poliestireno (PS) decoradas com Poli(etileno glicol), PEG, foram sintetizadas e caracterizadas antes e após adsorção do corante vermelho do Congo (VC). Colesterol oxidase (Chox), a principal enzima na oxidação do colesterol, foi imobilizada sobre PS/PEG e PS/PEG/VC para gerar sensores de colesterol. A bioconjugação entre VC e Chox permitiu respostas lineares para dosagem de colesterol HDL presente em amostras de sangue artificial. A lipase, uma hidrolase com larga aplicação científica e industrial, também foi imobilizada sobre PS/PEG e PS/PEG/VC. Os parâmetros cinéticos da hidrólise de *p*-nitrofenil butirato determinados para lipase livre e lipase imobilizada mostraram que sobre PS/PEG/VC a velocidade máxima de reação (V_{max}) e número de renovação (k_{cat}) aumentaram em comparação com os valores determinados para enzima livre. Lipase imobilizada sobre PS/PEG/VC pôde ser reutilizada por até sete vezes, perdendo um máximo de 10% ou 30% da atividade enzimática original a 40 ° C ou 25 ° C, respectivamente. Estes efeitos foram atribuídos à bioconjugação entre lipase e VC. Os comportamentos catalíticos da lipase e da Chox na ausência e na presença de grafeno (G) ou grafeno oxidado (GO) foram sistematicamente investigados. Na presença de G, ambas enzimas apresentaram valores de V_{max} e de k_{cat} superiores aos das enzimas livres. Já na presença de GO, Chox não apresentou atividade e lipase apresentou V_{max} e de k_{cat} superiores aos da enzima

livre. Estes resultados foram atribuídos à bioconjugação com as partículas de G e GO e grupos hidrofílicos presentes no plano basal de GO.

Sensores nanomecânicos foram desenvolvidos a partir de microcantileveres (MC). Respostas nanomecânicas frente à variação de umidade relativa do meio foram detectadas utilizando filmes finos de Poli (hidroxietil metacrilato), PHEMA, com três diferentes massas molares médias depositados sobre MC de silício puros, um substrato hidrofílico, e sobre MC revestidos com PS, um substrato hidrofóbico. Os resultados demonstraram que as respostas nanomecânicas dependem não só do tamanho de cadeia de PHEMA, mas também da camada de água interfacial entre PHEMA e MC. Transdução nanomecânica foi usada para detectar e dosar a presença do biomarcador antígeno carcinoembrionário (CEA) presente em amostras de soro. CEA é um biomarcador de interesse clínico-diagnóstico para acompanhamento e prognóstico de câncer de cólon. O biomarcador é primeiro reconhecido pelo anticorpo (MAb 3C1) ancorado a uma nanopartícula de ouro, e posteriormente reconhecido pelo anticorpo (MAb 3C6) ancorado em um MC de silício, o qual serve como um ressonador mecânico de massa de nanopartículas de ouro capturadas. O biosensor desenvolvido é capaz de dosar CEA sérico em concentrações traços, correspondente a $1,0 \cdot 10^{-16} \text{ g ml}^{-1}$.

Palavra-Chave: Colesterol oxidase, Lipase, Bioconjugação, Vermelho do Congo, Microcantilever, Sensor de umidade, Sensores nanomecânicos.

Abstract

Silva, R. A. **Particulate and Nanomechanical Sensors**, 2015, 210 p. PhD Thesis. Graduate Program in Chemistry. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

This thesis reports the development and application of particulate (Part A) and nanomechanics sensors (Part B). Poly (ethylene glycol), PEG, decorated polystyrene (PS) nanoparticles were synthesized and characterized before and after adsorption of the dye Congo red (CR). Cholesterol oxidase (Chox), the key enzyme in the oxidation of cholesterol, was immobilized onto PS/PEG and PS/PEG/CR particles for generating cholesterol sensors. The bioconjugation between CR and Chox allowed linear responses for HDL cholesterol content in artificial blood samples. Lipase, a hydrolase with large scientific and industrial applications, was also immobilized onto PS/PEG and PS/PEG/VC nanoparticles. The kinetic parameters of the hydrolysis of p-nitrophenyl butyrate were determined for free lipase and immobilized onto PS/PEG/CR particles. The results showed that maximum reaction velocity ($V_{\max}$) and catalytic efficiency (k_{cat}) increased compared to the values determined for the free enzyme. Lipase immobilized onto PS/PEG/CR particles could be recycled seven times, losing maximum 10% or 30% of the original enzymatic activity at 40 °C or 25 °C, respectively. These effects were attributed to bioconjugation between lipase and CR. Catalytic behavior of lipase and Chox in the absence and in the presence of graphene (G) or graphene oxide (GO) was systematically investigated. In the presence of G, both enzymes showed $V_{\max}$ and k_{cat} values higher than free enzymes. On the other hand, ChOx was inactive and the

interactions between GO and lipase showed $V_{\max}$ and k_{cat} values higher than those of the free enzyme. These results were attributed to bioconjugation of G and GO particles and hydrophilic groups present in the basal plane of GO.

Nanomechanical sensors were developed from microcantilevers (MC). Nanomechanical answers against the relative humidity variation of the medium were detected using thin films of poly (hydroxyethyl methacrylate), PHEMA, with three different average molecular masses deposited onto bare silicon microcantilevers, a hydrophilic substrate, and onto polystyrene (PS) coated microcantilevers, which is a hydrophobic substrate. The results found in the present study demonstrate that the micromechanical responses observed are related not only to the polymer molecular weight, but also to the polymer-interface phenomena and environment–polymer interface. Nanomechanics transductions were used to dose and detect the presence of carcinoembryonic antigen in serum samples. CEA is a biomarker of clinical diagnostic interest for monitoring and prognosis of colon cancer. Biomarker is first recognized by a surface-anchored antibody to a gold nanoparticle (MAB 3C1) and later recognized by a surface-anchored antibody to a silicon MC (MAB 3C6), that acts as a mechanical resonator for ‘weighing’ the mass of the captured nanoparticles. The biosensor developed is able to dose serum CEA in trace concentrations, corresponding to $1.0 \times 10^{-16} \text{ g ml}^{-1}$.

Keywords: Cholesterol oxidase, Lipase, Bioconjugation, Congo Red, Microcantilever, Humidity sensor, Nanomechanical sensor.

Lista de Ilustrações

Parte A – Sensores particulados

Materiais e Métodos

Figura 1: Representação das estruturas químicas do Tween 20 e do Vermelho do Congo (VC).

Figura 2: Representação da reação de oxidação do colesterol e ABTS catalisada pela Chox e HRP, respectivamente. H_2O_2 produzida pela oxidação do colesterol em (a) é agente oxidante do ABTS em (b).

Figura 3: Representação da oxidação do colesterol usando o oxigênio como acceptor de elétrons para formar colest-4-en-3-ona e H_2O_2 como produtos (a). Na presença de H_2O_2 como agente oxidante, HRP catalisa a reação entre 4-aminoantipirina e fenol, rendendo (*p*-benzoquinona monoimino) fenazona (b).

Figura 4: Representação esquemática da hidrólise do p-NPB catalisada pela lipase, rendendo ácido e (p-NP).

Capítulo I: Atividade Enzimática da Colesterol Oxidase

imobilizada sobre nanopartículas de PS/PEG/VC.

Figura 5: (a) Micrografias eletrônicas de varredura obtidas para as partículas de PS/PEG secas em ar. 100 partículas foram usadas para a determinação do diâmetro das partículas. (b) Frequência normalizada do diâmetro de distribuição determinadas por MEV (barra azul) e DLS (vermelho).

Figura 6: Espectros FTIR obtidos para PS/PEG (linha preta), PS/PEG/VC (linha vermelha) e VC (linha azul).

Figura 7: (a) Isoterma de adsorção obtida para VC sobre as partículas de PS/PEG em $(24 \pm 1) ^\circ\text{C}$ e pH 7,0. (b) Valores de potencial ζ , (c) Valores de diâmetro médio e (d) Polidispersidade em função da quantidade de VC adsorvido (Q_{vc}) sobre as partículas. As linhas pontilhadas são guias para os olhos. As barras de erro correspondem a valores médios de desvio padrão determinados em triplicata.

Figura 8: (a) Isoterma de adsorção da Chox sobre as partículas de PS/PEG/VC a $(24 \pm 1) ^\circ\text{C}$ e pH 7. Histogramas de distribuição de tamanho (b) partículas de PS/PEG/CR no plateau de adsorção, partículas de PS/PEG/VC/Chox no valor de Q_{Chox} de $(6,0 \pm 0,5) \mu\text{mol mg}^{-1}$ (c) antes e (d) após a liofilização.

Figura 9: Formação do $\text{ABTS}^{\bullet+}$ catalisada pela reação acoplada do HRP e Chox em função do tempo, pH e temperatura foi 6,5 e $(24 \pm 1) ^\circ\text{C}$ e a concentração do colesterol foi de 100 mg dL^{-1} . Linha vermelha, linha azul, linha preta e linha verde para a atividade de Chox livre ($28,5 \mu\text{mol L}^{-1}$), Chox livre ($28,5 \mu\text{mol L}^{-1}$) na presença de VC

(8,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$), Chox imobilizada sobre partículas PS/PEG/VC e Chox imobilizada sobre partículas de PS/PEG/VC liofilizadas, respectivamente.

Figura 10: Espectros de dicroísmo circular determinados para Chox pura em 28,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (linha vermelha), VC puro em 8,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (linha preta), mistura de Chox e VC em $r = 6,3$ (linha verde) e $r = 3,6$ (linha azul).

Figura 11: Espectro eletrônico obtido para VC puro (linha preta), Chox pura (linha vermelha) e mistura de VC e Chox. A concentração de VC foi mantida constante em 8,0 $\mu\text{mol L}^{-1}$, enquanto que as concentrações de Chox foram de 15,6 $\mu\text{mol L}^{-1}$ ($r = 0,78$, linha azul), 31,3 $\mu\text{mol L}^{-1}$ ($r = 1,56$, linha rosa), 46,9 ($r = 2,35$, linha verde), 62,6 $\mu\text{mol L}^{-1}$ ($r = 3,13$, linha vinho) e 78,1 $\mu\text{mol L}^{-1}$ ($r = 3,91$, linha laranja).

Figura 12: Espectro eletrônico obtido para VC puro 23 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (linha negra), colesterol puro 200 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (linha vermelha) e misturas de VC e colesterol. Linha azul, rosa verde, laranja e vinho são representações para $x = 2,17$, $x = 4,8$, $x = 8,7$, $x = 16,9$ e $x = 34,8$, respectivamente.

Figura 13: Formação do $\text{ABTS}^{\bullet+}$ catalisada pela Chox imobilizada sobre PS/PEG/VC em função da concentração do colesterol numa reação acoplada com HRP, pH e temperatura foram mantidos constantes em 6,5 e $(24 \pm 1) ^\circ\text{C}$ em um tempo reacional de duas horas. A regressão linear rendeu $y = 0,0579 \pm 0,0004 x$ e $R = 0,9887$. As linhas tracejadas representam a fronteira para elevado risco em nível alto de colesterol, por exemplo, $> 240 \text{ mg dL}^{-1}$ corresponde a elevado risco e $< 200 \text{ mg dL}^{-1}$ corresponde ao nível desejado.

Figura 14: $\ln [(p\text{-benzoquinona monoimino) fenazona}]$ catalisada pela Chox livre (quadrado negro) e imobilizada sobre as partículas de PS/PEG/VC (círculo vermelho) em função do tempo numa reação acoplada com HRP, pH e temperatura foram

mantidos constantes em 6,5 e (37 ± 1) °C em um tempo reacional de uma hora. A regressão exponencial rendeu $\ln y = A_1 \cdot \exp(-x/t_1) + y_0$, com valores de $A_1 = -3,35542$, $t_1 = 241,29665$, $y_0 = 3,84103$ e $R^2 = 0,98257$ para Chox livre e $A_1 = -4,93091$, $t_1 = 179,31258$, $y_0 = 3,80863$ e $R^2 = 0,96919$ para Chox imobilizada. Este ensaio foi realizado com o sangue artificial com padrão nível baixo de colesterol HDL.

Figura 15: $\ln [(p\text{-benzoquinona monoimino}) \text{ fenazona}]$ catalisada pela Chox livre (quadrado azul) e imobilizada sobre as partículas de PS/PEG/VC (círculo vermelho) em função do tempo numa reação acoplada com HRP, pH e temperatura foram mantidos constantes em 6,5 e (37 ± 1) °C em um tempo reacional de 20 minutos. A regressão exponencial rendeu $\ln y = A_1 \cdot \exp(-x/t_1) + y_0$, com valores de $A_1 = -5,67752$, $t_1 = 238,93025$, $y_0 = 4,47079$ e $R^2 = 0,98479$ para Chox livre e $A_1 = -4,73127$, $t_1 = 237,85810$, $y_0 = 4,41344$ e $R^2 = 0,97445$ para Chox imobilizada. Este ensaio foi realizado com o sangue artificial com padrão nível alto de colesterol HDL.

Figura 16: Colesterol mensurado em amostras de sangue artificial pela Chox imobilizada sobre partículas de PS/PEG/VC em função da concentração de colesterol teórico. A concentração de colesterol foi mensurada através da formação de $(p\text{-benzoquinona monoimino}) \text{ fenazona}$ catalisada pela Chox imobilizada numa reação acoplada com HRP, pH e temperatura foram mantidos constantes em 6,5 e (37 ± 1) °C em um tempo reacional de 20 minutos. **(a)** Amostras de sangue artificial com parâmetro nível baixo de HDL; os dados experimentais foram ajustados para a regressão linear $y = -4,4252 + 1,02813x$ e $R = 0,9746$ e **(b)** amostras de sangue artificial com parâmetro nível alto de HDL; os dados experimentais foram ajustados para a regressão linear $y = -13,9 + 1,09384x$ e $R = 0,9571$. As barras de erro correspondem a valores médios de desvio padrão determinados em triplicata.

Capítulo II: Atividade Enzimática da Lipase imobilizada sobre nanopartículas de PS/PEG e PS/PEG/VC.

Figura 17: Histogramas de distribuição tamanho das nanopartículas determinados para (a) partículas de PS/PEG e (b) partículas de PS/PEG/VC. As Figuras inseridas nos histogramas correspondem a imagens de MEV obtidas das dispersões secas.

Figura 18: (a) Isotermas de adsorção determinadas em $(24 \pm 1) ^\circ\text{C}$ e pH 7,0 para lipase sobre as partículas de PS/PEG (círculo azul) e PS/PEG/VC (vermelho). As linhas são guias para os olhos. Valores médios de (b) D, (c) PD e (d) potencial- ζ determinados para partículas de PS/PEG ou PS/PEG/VC após adsorção de lipase em função de Q_{lipase} . Histogramas de distribuição de tamanho das partículas obtidos por espalhamento de luz dinâmico e imagens de MEV (inseridas) obtidas para as partículas de (e) PS/PEG e (f) PS/PEG/VC após adsorção de lipase, $Q_{\text{lipase}} = 85 \pm 3 \text{ nmol mg}^{-1}$ e $Q_{\text{lipase}} = 105 \pm 5 \text{ nmol mg}^{-1}$, respectivamente. Cada ponto é uma média de triplicatas $\pm$ desvio padrão.

Figura 19: (a) Velocidades iniciais (V_0) determinadas para a hidrólise do *p*-NPB catalisada lipase livre (quadrado negro) em $0,4 \cdot 10^{-6} \text{ mol/L}$ e lipase imobilizada sobre partículas de PS/PEG (círculo azul, $Q_{\text{lipase}} = 85 \pm 3 \text{ nmol mg}^{-1}$) ou de PS/PEG/VC (triângulo vermelho, $Q_{\text{lipase}} = 105 \pm 5 \text{ nmol mg}^{-1}$) em função da concentração do *p*-NPB. Cada ponto é uma média de triplicatas $\pm$ desvio padrão. (b) Curvas de Lineweaver-Burk para lipase livre (quadrado negro) e lipase imobilizada sobre partículas de PS/PEG (círculo azul) ou PS/PEG/VC (triângulo vermelho).

Figura 20: (a) Dicroísmo Circular (DC) e (b) espectro eletrônico obtido para misturas de VC e lipase. A concentração de VC foi mantida constante em $8,0 \mu\text{mol.L}^{-1}$, enquanto que a concentração de lipase variou de $3,3 \mu\text{mol L}^{-1}$ a $33 \mu\text{mol L}^{-1}$, respectivamente.

Figura 21: Concentração de p-NP formado da hidrólise de p-NPB catalisada pela lipases livres (quadrado preto), lipases imobilizadas sobre partículas de PS/PEG/VC (triângulo vermelho, $Q_{\text{lipase}} = 105 \pm 5 \text{ nmol mg}^{-1}$) ou PS/PEG (círculo azul, $Q_{\text{lipase}} = 85 \pm 3 \text{ nmol mg}^{-1}$) a 25°C , 37°C , 40°C , 45°C e 60°C . Cada ponto é uma média de triplicatas $\pm$ desvio padrão.

Figura 22: Atividade de reuso a 25°C e 40°C para lipases imobilizadas sobre partículas de PS/PEG/VC ($Q_{\text{lipase}} = 105 \pm 5 \text{ nmol mg}^{-1}$). Cada ponto é uma média de triplicatas $\pm$ desvio padrão.

Capítulo III: Bioconjugação da Lipase e da Colesterol Oxidase com Grafeno ou Grafeno Oxidado.

Figura 23: (a) Dependência das velocidades iniciais (V_0) de formação de p-NF em função da concentração de p-NFB determinado em $(24 \pm 1)^\circ\text{C}$, lipase a $0,01 \text{ g L}^{-1}$ ($1,67 \cdot 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$) na ausência e na presença de G ($0,012 \text{ g L}^{-1}$) ou GO ($0,012 \text{ g L}^{-1}$). (b) Ajuste de curvas Lineweaver-Burk para lipase pura (triângulos azuis), lipase na presença de G (quadrados pretos) ou GO (círculos vermelhos). (c) Dependência das velocidades iniciais (V_0) de formação de (*p*-benzoquinona monoimino) fenazona em função da concentração de colesterol determinado em $(24 \pm 1)^\circ\text{C}$, Chox a $0,03 \text{ g L}^{-1}$ ($6,4 \cdot 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$) na ausência e na presença de G ($0,012 \text{ g L}^{-1}$). (d) Ajuste de curvas de

Lineweaver-Burk para Chox pura (estrelas verdes) e Chox na presença de G (losangos roxos).

Figura 24: Retenção de atividade enzimática determinada para lipase a $0,01 \text{ g L}^{-1}$ na ausência e na presença de G ou GO em $0,012 \text{ g L}^{-1}$, após 15 d, 30 d e 45 d armazenados a $(24 \pm 1)^\circ \text{C}$ em ambiente de laboratório.

Figura 25: Espectro de DC determinado para lipase pura $1,0 \text{ g L}^{-1}$ (linha negra) e misturas de lipase e G (a) ou GO (b). A concentração de lipase foi mantida constante em $1,0 \text{ g L}^{-1}$, enquanto que a concentração de grafeno foi de $0,012 \text{ g L}^{-1}$ (linha cinza), $0,025 \text{ g L}^{-1}$ (linha vermelha) e $0,1 \text{ g L}^{-1}$ (linha azul). A mistura de lipase $0,25 \text{ g L}^{-1}$ e G $0,25 \text{ g L}^{-1}$ (linha verde) também foi testado.

Figura 26: Espectros de DC determinados para Chox pura $1,0 \text{ g L}^{-1}$ (linha cinza) e misturas de Chox e G (a) ou GO (b). A concentração de Chox foi mantida constante em $1,0 \text{ g L}^{-1}$, enquanto que a concentração de grafeno ou grafeno oxidado foi de $0,012 \text{ g L}^{-1}$ (linha preta), $0,025 \text{ g L}^{-1}$ (linha vermelha) e $0,060 \text{ g L}^{-1}$ (linha roxa).

Figura 27: Espectro Raman do grafeno (G) (linha azul) e grafeno oxidado (GO) (linha vermelha) na fase sólida ($\lambda_{\text{exc}} = 632,8 \text{ nm}$).

Figura 28: (a) Imagem topográfica de AFM obtida para GO disperso em água e depositado sobre lâmina de Si e (b) seção de corte correspondendo à linha verde.

Figura 29: Espectro de FL obtido para (a) G, lipase e suas misturas; (b) G, Chox e suas misturas; (c) GO, lipase e suas misturas; empregando técnica de micro Raman com $\lambda_{\text{exc}} = 514,5 \text{ nm}$.

Parte B – Sensores nanomecânicos

Introdução

Figura 1: (a) Esquema do sistema experimental. Modos de operação dos sensores nanomecânicos: (b) modo estático e (c) modo dinâmico.

Materiais e Métodos

Figura 2: Imagens topográficas de AFM (10 μm x 10 μm) obtidas para PHEMA-300 antes e após tratamento com plasma, com os correspondentes valores de medida de rms.

Figura 3: Esquema da montagem experimental utilizada para os experimentos. Chip é montado num atuador 2D voice-coil para deslocamento do chip na direção dos eixos X e Y. O deslocamento para fora do plano do sistema mecânico é o eixo Z. O feixe de laser incidente é orientado ortogonalmente para o feixe de laser refletido com um eixo no plano X-Z. O sistema possui também uma câmara ambiental com controle automático de UR e temperatura.

Figura 4: (a) Densidade de nanopartículas de ouro sobre o cantilever e chip em soro, (b) Distribuição relativa de nanopartículas de ouro como monômeros e aglomerados.

Capítulo I: Monitoramento do intumescimento e desintumescimento de filmes finos de PHEMA por sensores de MC.

Figura 5: Micrografias óticas de campo claro dos filmes poliméricos obtidos por spin-coating sobre os MCs, (a) PS, (b) PHEMA-20, (c) PHEMA-300, (d) PS/ PHEMA-300 e (e) PHEMA-1000.

Figura 6: Resposta do MC para ciclos de umidade de 15 minutos: (a) PS, PHEMA-20, PHEMA-300, PHEMA-1000 E (b) PHEMA-300, PS/PHEMA-300, PS. (c) Resposta dos MCs recobertos com PHEMA-300 para ciclos de umidade de 8 minutos, 15 minutos e 60 minutos. PS recobertos sobre os MC foram usados como amostra referência devido a sua hidrofobicidade.

Figura 7: Micrografias óticas de campo claro dos filmes poliméricos de PS/PHEMA-20, PS/PHEMA-300, PS/PHEMA-1000 e PHEMA-20 após 5, 38, 100, 308 e 1085 minutos de exposição em elevada umidade relativa do ar.

Figura 8: Dependência da (a) variação de frequência do microcantilever (Δf) e (b) aumento de valores relativos de massa com a massa molar de PHEMA devido ao aumento da umidade relativa do ar (UR). Os valores de Δf foram obtidos a partir das frequências de ressonância do MC determinadas a 80% de UR e a 0% de UR.

Figura 9: Esquema de disposição da camada interfacial de água e o comprimento da cadeia do polímero em alta e baixa UR, quando (a) Filme fino de PHEMA foi depositada sobre um substrato hidrófilico (SiO_2) e (b) Filme fino de PHEMA foi depositado num substrato hidrofóbico (PS). O retângulo cinza representa o microcantilever de silício, as esferas azuis são as moléculas de água, as linhas verdes são representam o filme de PHEMA polímero e da linha laranja é o PS.

Figura 10: Dependência média da (a) espessura e do (b) índice de refração, η , em função da raiz quadrada do tempo determinada para PHEMA-300 em 80% de UR em $(24 \pm 1)^\circ\text{C}$.

Figura 11: Representação esquemática da orientação dos grupos metilas e hidroxilas do PHEMA em (a) baixa UR e (b) alta UR.

Capítulo II: Detecção de biomarcador de câncer em soro usando um nanosensor hibrido mecânico e optoplasmônico baseado em MC.

Figura 12: (a) Representação esquemática do ensaio sanduiche sobre os MCs, (b) micrografia obtida por MEV dos *cantilevers* de silício utilizados (500 μm de comprimento, 100 μm de largura e 1 μm de espessura), (c) esquema do método ótico de deflexão mensurado pela incidência de um feixe de laser sobre a extremidade final livre do cantilever e (d) Esquema do efeito da adição de massa de nanopartículas aderidas por bioreconhecimento sobre a frequência de ressonância do cantilever, onde o decréscimo da frequência é proporcional à massa adicionada.

Figura 13: (a) Esquema de funcionalização das nanopartículas de ouro com 100 nm de diâmetro revestidos com carboxi-polímero e posterior imobilização covalente dos anticorpos de detecção (MAb3C1), e (b) Esquema de funcionalização do cantilever por meio da silanização com (3-glicidiloxipropil) trimetoxisilano e posteriores reações de ativação de grupos funcionais e imobilização do anticorpo de captura (MAb3C6).

Figura 14: Detecção nanomecânica do biomarcador CEA. (a) Frequência de ressonância nanomecânica do cantilever de Si antes e após os passos de bioreconhecimento, com detecção dos anticorpos ancorados nas nanopartículas de ouro para controle experimental e para o ensaio de detecção de CEA (1pg mL^{-1} em tampão PBS). Medidas foram realizadas em ar em temperatura ambiente. (b) Mudança de frequência de ressonância relativa do modo de vibração fundamental em função da concentração do biomarcador em amostras de tampão e soro (símbolo vermelho). Os valores médios e os erros foram calculados por análise estatística Gaussiana dos dados para diferentes cantilever. As linhas são somente guias para os olhos. As mudanças de frequências de ressonância medidas em solução tampão foram comparadas com as mudanças de frequências de ressonância teórica predita pela distribuição de nanopartículas sobre o cantilever obtido por MEV (símbolo azul). As mudanças de frequência de ressonância relativa para o controle experimental estão apresentadas na região sombreada em cinza que representa os valores médios somados ao desvio padrão.

Figura 15: Micrografias obtidas por MEV na região do cantilever e do *preclamping* após o ensaio sanduiche no experimento controle e no ensaio de detecção de 1 fg mL^{-1} de CEA em soro.

Figura 16: (a) Densidade de nanopartículas de ouro sobre o cantilever e chip em soro, (b) Distribuição relativa de nanopartículas de ouro como monômeros e aglomerados.

Lista de Tabelas

Parte A – Sensores particulados

Materiais e Métodos

Tabela 1: Conteúdo de enzimas bioconjugadas determinados para misturas aquosas de lipase ou Chox a $1,0 \text{ g L}^{-1}$ com G ou GO por meio de medições espectrofotométricas

Capítulo II: Atividade Enzimática da Lipase imobilizada sobre nanopartículas de PS/PEG e PS/PEG/VC.

Tabela 2: Valores de diâmetros médios (D), polidispersidade (P) e potencial-zeta (ζ) determinados para as partículas de PS/PEG e PS/PEG/VC antes e após a adsorção da lipase em (a) $Q_{\text{lipase}} = (85 \pm 3) \text{ nmol mg}^{-1}$ e (b) $Q_{\text{lipase}} = (105 \pm 5) \text{ nmol mg}^{-1}$.

Tabela 3: Parâmetros cinéticos determinados para a hidrólise do *p*-NPB catalisada pela lipase livre em $0,4 \cdot 10^{-6} \text{ mol/L}$ e lipase imobilizada sobre partículas de PS/PEG ($Q_{\text{lipase}} = 85 \pm 3 \text{ nmol mg}^{-1}$) ou PS/PEG/VC ($Q_{\text{lipase}} = 105 \pm 5 \text{ nmol mg}^{-1}$). V_{max} , K_m , k_{cat} e ξ são velocidade máxima, constante de Michaelis, ciclo catalítico e eficiência catalítica, respectivamente.

Capítulo III: Bioconjugação da Lipase e da Colesterol Oxidase com Grafeno ou Grafeno Oxidado.

Tabela 4: Parâmetros cinéticos determinados para a hidrólise do *p*-NPB catalisado pela lipase 0,01 g L⁻¹ ($1,67 \cdot 10^{-7}$ mol·L⁻¹) e para a oxidação do colesterol catalisada pela Chox 0,03 g L⁻¹ ($6,4 \cdot 10^{-7}$ mol L⁻¹) na ausência e na presença de G (0,012 g L⁻¹) ou GO (0,012 g L⁻¹) a 24 ± 1 °C.

Parte B – Sensores nanomecânicos

Capítulo I: Monitoramento do intumescimento e desintumescimento de filmes finos de PHEMA por sensores de MC.

Tabela 1: Diferença no estresse superficial entre os lados superior e inferior da MCs calculados usando a equação 1 para máximo Δz e $\Delta \sigma_{\max}$. A mudança da frequência relativa (Δf) é a diferença entre a frequência de ressonância determinada a 80% de UR e a 0% de UR; aumento da massa relativa determinada com Δf e equação 1.

Lista de Abreviaturas

ABTS: 2,2'-azino-bis (ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico)

ABTS⁺⁺: 2,2'-azino-bis (ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico oxidado)

AFM: *Atomic Force Microscopy* (Microscopia de Força Atômica)

ag: atograma

BSA: *Bovin seric Albumin* (Albumina sérica bovina)

CEA: *Carcionic Embryonic Antigen* (Antígeno carcinoembrionário)

Chox: *Colesterol oxidase*

CMC: Concentração Micelar Crítica

CTAB: *Cetyl Trimethylammonium Bromide* (Brometo de Cetil Trimetilamônio)

D: Diâmetro

dk: espessura média

DLS: *Dynamic light Scaterig*, Espalhamento de Luz Dinâmico

DNA: *Deoxyribonucleic Acid* (Ácido Desoxirribonucleico)

EDC: 1-etil-3 (3-dimetilaminopropil)-carbodiimida

Elisa: *Enzyme-linked Immunosorbent Assay*, Ensaio de Imunoabsorção ligado a enzima

FAD: Flavina Adenina Dinucleotídeo

FBS: *Fetal Bovine Serum* (Soro Fetal Bovino)

FL: Fotoluminescência

FTIR: *Fourier Transform Infrared Spectroscopy* (Espectroscopia de Infravermelho com transformada de Fourier)

G: Grafeno

G-6-PDH: *Glucose-6-phosphate dehydrogenase* (Glicose-6-fosfato dehidrogenase)

GO: Grafeno oxidado

HDL: *High Density Lipoprotein* (Lipoproteína de Alta Densidade)

HRP: *horseradish peroxidase*

MAB: *Monoclonal antibody* (Anticorpo Monoclonal)

MC: *Microcantilever*

MES: ácido 2-(N-morfolino) etanossulfônico

MEST: ácido 2-(N-morfolino) etanossulfônico com Tween 20

MEV: Microscopia eletrônica de Varredura

NADP: Nicotinamida Adenina Dinucleótido Fosfato

nm: nanômetro

Np: Nanopartículas

NTA: N α , N α -Bis (carboximetil) -L-lisina hidratado

PBS: Tampão fosfato salino

PBST: Tampão fosfato salino com Tween 20

PD: Polidispersidade

PEG: Poli (etileno glicol) sorbitano monolaurato

PEO: Polioxietileno

pg: picograma

PHEMA: Poli (2-hidroxietil metacrilato)

pI: ponto isoeletrico

PMMA: Poli metacrilato de Metila

p-NF: para nitrofenol

p-NFB: p-nitrofenol butirato

Potencial ζ : Potencial zeta

PS: Poliestireno

PSS: Poliestireno sulfato

Q_{chox} : Quantidade de Chox (Q_{Chox}) sobre as partículas poliméricas

Q_{lipase} : Quantidade de lipase (Q_{lipase}) sobre as partículas poliméricas

Qualitrol 1H: Sangue artificial com padrões saudáveis

Qualitrol 2H: Sangue artificial com padrões patológicos

Q_{vc} : Quantidade de VC (Q_{vc}) sobre as partículas poliméricas

RNA: Ribonucleic Acid (ácido ribonucleico)

R_p : Coeficiente de reflexão global paralelo

R_s : Coeficiente de reflexão global perpendicular

SDS: *sodium dodecyl sulphate* (Dodecil Sulfato de Sódio)

T: Temperatura

Tween 20: Poli (etileno glicol) sorbitano monolaurato

UR: Umidade Relativa do ar

VC: Vermelho do Congo

n_k : índice de refração

Sumário

Parte A – Sensores Particulados

1 - Introdução.....	32
2 - Materiais.....	50
3 - Métodos.....	53
3.1 - Preparação das nanopartículas de PS/PEG: Capítulos I e II.....	53
3.2 – Adsorção de Vermelho do Congo sobre as nanopartículas de PS/PEG: Capítulos I e II.....	53
3.3 - Adsorção de Chox sobre as partículas de PS/PEG/VC: Capítulo I.....	54
3.4 - Adsorção de lipase sobre as partículas de PS/PEG ou PS/PEG/VC: Capítulo II....	55
3.5 - Experimentos de dessorção: Capítulos I e II.....	56
3.6 - Caracterização das partículas de PS/PEG e PS/PEG/VC antes e após a adsorção de Chox ou lipase: Capítulos I e II.....	57
3.7 - Elipsometria: Capítulos I e II.....	59
3.8 - Atividade catalítica da Chox livre e adsorvida sobre PS/PEG/VC: Capítulo I.....	60
3.9 - Atividade catalítica da Chox livre e adsorvida sobre PS/PEG/VC na dosagem de colesterol sérico: Capítulo I.....	62
3.10 - Atividade catalítica da lipase livre e adsorvida sobre PS/PEG ou PS/PEG/VC: Capítulo II.....	64
3.11 - Avaliação da atividade enzimática da lipase na ausência e na presença de G ou GO: Capítulo III.....	66
3.12 - Avaliação da atividade enzimática da Chox na ausência e na presença de G ou GO: Capítulo III.....	67

3.13 - Avaliação dos efeitos de Bioconjugação: Capítulo I, II e III.....	68
3.14 - Raman e espectroscopia de Fotoluminescência (FL): Capítulo III.....	70

4 – Resultados, Discussão e Conclusões Parciais.

Capítulo I: Imobilização de colesterol oxidase sobre partículas poliméricas de PS/PEG/VC

4.1 - Caracterizações das partículas de PS/PEG.....	72
4.2 - Comportamentos de adsorção de Vermelho do Congo sobre as partículas de PS/PEG.....	75
4.3 - Comportamentos da adsorção de Chox sobre partículas de PS/PEG/VC.....	76
4.4 - Atividades enzimáticas da Chox livre e adsorvida.....	79
4.5 - Ensaio com sangue artificial nível alto e nível baixo de HDL.....	88
4.6 – Conclusões Parciais.....	94

5 – Resultados, Discussão e Conclusões Parciais.

Capítulo II: Imobilização de lipase sobre partículas poliméricas de PS/PEG ou sobre partículas PS/PEG/VC

5.1 – Caracterização das nanopartículas.....	97
5.2 - Comportamento da adsorção da lipase sobre partículas de PS/PEG ou PS/PEG/VC.....	99
5.3 - Atividade enzimática da lipase livre e imobilizada.....	104
5.4 – Conclusões Parciais.....	113

6 – Resultados, Discussão e Conclusões Parciais.

Capítulo III: Bioconjugação de Chox ou lipase com grafeno ou grafeno oxidado

6.1 - Parâmetros cinéticos da Chox e lipase na presença e ausência de G ou GO.....	114
--	-----

6.2 - Aspectos estruturais da lipase e Chox avaliadas por espectroscopia de dicroísmo circular (DC).....	118
6.3 - Interações entre enzimas e G ou GO estudadas por espectroscopia de fotoluminescência.....	122
6.4 – Conclusões Parciais.....	128
7 – Referências	
Bibliográficas.....	129
Parte B – Sensores Nanomecânicos	
1- Introdução.....	155
2 - Materiais.....	173
3 - Métodos.....	174
3.1 - Deflexão em função do tempo e medidas de frequência de ressonância:	
Capítulo I.....	176
3.2 - Medidas de perfilometria: Capítulo I.....	178
3.3 - Medidas de elipsometria: Capítulo I.....	179
3.4 - Conjugação de anticorpos sobre nanopartículas de ouro recobertas com carboxi-polímero: Capítulo II.....	180
3.5 - Funcionalização dos microcantilevers: Capítulo II.....	181
3.6 - A imobilização dos anticorpos de reconhecimento e controle sobre os MCs:	
Capítulo II.....	182
3.7 - Reconhecimento do biomarcador e ensaio de sanduíche: Capítulo II.....	183
3.8 - Microscopia de campo claro/escuro: Capítulo II.....	183
3.9 - Microscopia eletrônica de varredura (MEV): Capítulo II.....	185

4 - Resultados, Discussão e Conclusões Parciais.

Capítulo I: Estudo do Comportamento de intumescimento e desintumescimento de filmes finos de PHEMA por sensores nanomecânicos

4.1 - Histerese da deflexão dos MCs em função do ciclo de umidade.....	186
4.2 - Dependência da frequência de ressonância do MC em função da massa molecular do PHEMA.....	191
4.3 - Efeitos interfaciais da camada de hidratação na deflexão do MC.....	195
4.4 – Conclusões Parciais.....	201

5 - Resultados, Discussão e Conclusões Parciais.

Capítulo II: Detecção de biomarcador cancerígeno em sangue por meio de um sensor nanomecânico

5.1 - Representação esquemática do sensor nanomecânico.....	202
5.2 - Funcionalização das nanopartículas de ouro e dos MCs.....	204
5.3 - Ensaio sanduiche.....	206
5.4 - Medidas das assinaturas de massa.....	207
5.5 - Detecção nanomecânica do biomarcador de câncer.....	208
5.7 - Influência do limite difusional.....	211
5.8 - Conclusões Parciais.....	214

Referências Bibliográficas.....	215
--	------------

Conclusões Gerais.....	229
-------------------------------	------------

Perspectivas.....	231
--------------------------	------------

Súmula Curricular.....	232
-------------------------------	------------

Parte A: Sensores Particulados

Capítulo I: Imobilização de colesterol oxidase sobre partículas poliméricas de PS/PEG/VC

Capítulo II: Imobilização de lipase sobre partículas poliméricas de PS/PEG ou sobre partículas PS/PEG/VC

Capítulo III: Bioconjugação de Chox ou lipase com grafeno ou grafeno oxidado

1 - Introdução

A interface entre nanomateriais e moléculas com atividade biológica tem despertado o interesse da comunidade acadêmica e tecnológica em diversas áreas, como por exemplo, Medicina, Ciências Farmacêuticas, Ciências Analíticas, Biotecnologia, Biologia Celular e Biofísica (NEL et al., 2009), pois as biomoléculas imobilizadas podem ser aplicadas em diversos dispositivos de interesse biotecnológico (CHIBATA, 1978), principalmente em biossensores enzimáticos (MORAES et al., 2009), os quais utilizam interações químicas específicas como modelo de reconhecimento biomolecular, onde posteriormente é seguido pela conversão no correspondente produto de interesse, o qual é detectado e quantificado (EGGINS, 1996).

Enzimas são catalisadores macromoleculares biológicos que aceleram transformações químicas eficientemente sob condições brandas e com elevada especificidade (ZHANG; YUWEN; PENG, 2013; BRENA; BATISTA-VIERA, 2006). Estas biomoléculas consistem de centenas de resíduos de aminoácidos conectados em arranjos espaciais precisos, exibindo estrutura tridimensional como resultado de interações intramoleculares e interações entre a molécula de enzima e o meio ao qual está inserida. A catálise enzimática ocorre em diferentes situações, tais como em solução, agregadas com outras moléculas ou aderidas (imobilizadas) em superfícies. A principal vantagem da imobilização está na possibilidade de reutilização, maior estabilidade em intervalos mais amplos de pH e na menor interferência de inibidores e/ou ativadores (CHIBATA, 1978; LYKLEMA; NOEDE, 1996), em detrimento da utilização de enzimas livres, onde ocorre maior instabilidade em relação a variações de pH, temperatura e rápida redução da atividade. Um dos principais pontos que delimita a aplicação de enzimas em escala industrial é o seu alto custo e, além disso, quando se

utiliza uma enzima livre em solução é muito difícil recuperá-la do meio reacional para a posterior reutilização.

A determinação do colesterol é de vital importância na saúde pública da população, pois elevados níveis de colesterol estão diretamente relacionados a doença cardíacas, doença arterial coronariana, arteriosclerose, hipertensão arterial, infarto do miocárdio e trombose cerebral (NAUCK; MÄRZ; WIELAND, 2000). Colesterol é um álcool policíclico de cadeia longa, usualmente considerado um esteroide, encontrado nas membranas celulares e transportado no plasma sanguíneo de todos os animais (GARRET; GRISHAM, 1995). A maior parte do colesterol presente no corpo é sintetizada pelo próprio organismo, sendo apenas uma pequena parte adquirida pela dieta (QUINTÃO; GRUNDY; AHRENS JR, 1971). O colesterol tem um papel central em muitos processos bioquímicos, mas é mais conhecido pela associação existente entre doenças cardiovasculares e as diversas lipoproteínas que o transportam, e os altos níveis de colesterol no sangue (hipercolesterolemia). O colesterol é insolúvel em água e, conseqüentemente, insolúvel no sangue. Para ser transportado através da corrente sanguínea ele liga-se a diversos tipos de lipoproteínas, partículas esféricas que tem sua superfície exterior composta principalmente por proteínas hidrossolúveis. Existem vários tipos de lipoproteínas, e elas são classificadas de acordo com a sua densidade (AKDIM et al., 2010). Comprovadamente elevados níveis de colesterol estão também indiretamente ligados a nefrose, diabetes melitus, mixedema e icterícia (AHMADALINEZHAD; CHEN, 2011). Em contrapartida, baixos níveis de colesterol podem causar hipotireoidismo e anemia. Idealmente, a concentração de colesterol total em uma pessoa sadia é menor que 200 mg.dL^{-1} ($<5,2 \text{ mM}$), entre $200\text{-}239 \text{ mg.dL}^{-1}$ ($5,2\text{-}6,2 \text{ mM}$) são níveis limítrofes de risco a diversas doenças citadas na literatura, e níveis

acima de 240 mg.dL^{-1} são considerados elevados e com sérios riscos à saúde (SAFAVI; FARJAMI, 2011; AKKAYA; SAHIN; DEMIREL; TÜMTÜRK, 2009). Portanto, o desenvolvimento de novos dispositivos para a quantificação do colesterol de forma rápida, precisa e confiável pode reduzir os custos laboratoriais (AKKAYA; SAHIN; DEMIREL; TÜMTÜRK, 2009).

A enzima colesterol oxidase (Chox) cataliza a oxidação do colesterol na presença de oxigênio, gerando colest-4-en-3-ona e peróxido de hidrogênio. A imobilização de Chox sobre superfícies sólidas pode aumentar a eficiência da mesma, estendendo a sua vida útil e tornando possível a redução substancial de custos em processos industriais e médicos (FERNANDEZ-LAFUENTE et al., 1998; GOPALAN, A. L.; LEE, K. P.; RAGUPATHY, D., 2009). Como Chox é composta por 613 resíduos de aminoácidos com Flavina adenina dinucleotídeo (FAD) como grupo prostético, dos quais 47% correspondem a resíduos hidrofóbicos de aminoácidos (COULOMBE et al., 2001.), pode-se supor que possivelmente a enzima exiba afinidade por superfícies hidrofóbicas. Atualmente, ensaios de quantificação do colesterol sérico envolvem a coleta de uma amostra de sangue do paciente e o posterior envio à um laboratório clínico para análise (KADOKAWA; KOBAYASHI, 2010). A partir da amostra de sangue, o colesterol pode ser determinado e quantificado por métodos colorimétricos, espectrofotométricos ou eletroquímicos (GOMATHI et al., 2011). Dentre estes métodos, o mais utilizado é a detecção eletroquímica do colesterol pela sua simplicidade e baixo custo (GOMATHI et al., 2011; SONG et al., 2011). O principal problema da técnica eletroquímica na quantificação do colesterol, é que o esquema de detecção normalmente é baseado no consumo de oxigênio ou na produção de peróxido de hidrogênio durante a reação enzimática (SALIMI; HALLAJ; SOLTANIAN, 2009), onde espécies facilmente

oxidadas, como ácido ascórbico e ácido úrico na amostra de sangue talvez sejam oxidadas ao mesmo tempo, sendo necessário o uso de mediadores na superfície do eletrodo de modo a alterar o caminho do elétron transferido (SHIH; YANG; LIN, 2009). O desenvolvimento de outros métodos e técnicas podem ser interessantes, pois podem aumentar a sensibilidade, a seletividade e minimizar os erros devido a presença de alguns interferentes.

Avanços na imobilização da Chox tem sido reportado na literatura. Akkaya e colaboradores (AKKAYA; SAHIN; DEMIREL; TÜMTÜRK, 2009) desenvolveram um suporte polimérico funcional para a imobilização da colesterol oxidase através do uso de matrizes de poli(metacrilamida – co - ácido acrílico)/polietilenoamina e poli(metacrilato de metila – co – metacrilato de glicidila), obtendo boa estabilidade na estocagem da enzima imobilizada e alto grau de reutilização. O uso de quitosana suportada sobre material condutor como meio de adsorção da Chox (ANSARI; KAUSHIK; SOLANKI; MALHOTRA, 2009; GOPALAN; LEE; RAGUPATHY, 2009; SALIMI; HALLAJ; SOLTANIAN, 2009; SAFAVI; FARJAMI, 2011; SOLANKI et al., 2009; UMAR et al., 2009), possibilita a quantificação de colesterol por métodos eletroquímicos. Umar (UMAR et al., 2009) imobilizou a Chox sobre nanopartículas de ZnO, desenvolvendo um biossensor amperométrico ultra-sensível, reproduzível, com baixo limite de detecção e baixo tempo de resposta, tendo como vantagem elevada área superficial, transparência óptica e fotoestabilidade. Hamid e colaboradores (HAMID; OMAR, 2003) determinaram o colesterol sérico total Chox e colesterol esterase co-imobilizadas sobre membranas de acetato de celulose, as quais apresentaram 90% da atividade inicial após 8 reutilizações.

Outro ramo de importância em diagnósticos de interesse clínico-analítico é a dosagem de triglicérides sanguíneo mediada pela lipase, onde o desenvolvimento de kits de diagnósticos rápidos e precisos pode reduzir substancialmente o custo de análises laboratoriais (BASU et al., 2013.). Sabe-se que suportes hidrofóbicos são adequados para a imobilização de lipase porque promovem a ativação da enzima com a adsorção sobre estes tipos de superfícies (GROCHULSKI et al., 1994). Esta ativação interfacial pode ser tão importante quanto a interação do sitio ativo das lipases com o substrato hidrofóbicos. Por exemplo, a imobilização de lipase sobre substratos hidrofóbicos de octil agarose levou a um considerável aumento de sua atividade enzimática (FERNANDEZ-LAFUENTE et al., 1998). O uso de suportes microporosos com caráter hidrofóbico pode aumentar a eficiência catalítica da lipase imobilizada quando comparada a lipase livre, porque a concentração do substrato na interface líquido-sólido é maior do que o presente em solução (GRIFFITHS; BOSLEY, 1993; PIERRE et al., 2006). No organismo humano, a lipase atua principalmente sobre lipídeos, tendo como função básica de catalisar a hidrólise de triacilgliceróis em ácidos graxos e glicerol (FERNANDEZ-LAFUENTE et al., 1998). Mas a aplicação da lipase imobilizada sobre superfícies sólidas tem chamado a atenção da comunidade acadêmica devido as inúmeras aplicações tecnológicas e comerciais que a enzima possui, como por exemplo a utilização de lipases na produção de fármacos, cosméticos, detergentes, alimentos, kits de diagnósticos, síntese de compostos opticamente ativos, resolução de racematos, produção de aromas e fragrâncias, modificações de gorduras e tratamento de couros (FERNANDEZ-LAFUENTE et al., 1998), polimerização de ésteres e de policarbonatos (KADOKAWA; KOBAYASHI, 2010).

A lipase utilizada nesta tese é proveniente de fungo (*Candida rugosa*), apresenta ponto isoelétrico (pI) próximo de 7,0 (WU et al., 2001) e sua estrutura molecular é constituída por 534 resíduos de aminoácidos. O sítio catalítico é formado pela tríade catalítica Ser-His-Asp/Glu, e é freqüentemente protegido na molécula por uma "tampa" hidrofóbica ou "lid" que ao interagir com a interface lipídeo/água sofre uma mudança conformacional, expondo o sítio ativo (WU et al., 2001). A presença da "tampa" na estrutura da enzima e a propriedade de ativação interfacial passaram a serem fatores determinantes para a caracterização de lípases (YAHYA; ANDERSON; MOO-YOUNG, 1998).

Lipases são enzimas largamente exploradas na catálise de acilação de alguns alcoóis em condições anidras, possuindo a capacidade de catalisar também derivatização enantiosseletiva de compostos quirais, reações regioseletivas, uma série de esterificações (hidrólises), transesterificações e reações de interesterificação (CAUGLIA; CANEPA, 2008; KADOKAWA; KOBAYASHI, 2010).

Para explorar o comportamento catalítico da lipase e Chox em meio hidrofílico ou hidrofóbico, estudou-se sistematicamente suas propriedades catalíticas quando imobilizadas sobre partículas de poliestireno decoradas com moléculas de polietileno glicol (PS/PEG) ou partículas de poliestireno decoradas com moléculas de polietileno glicol recobertas com corante vermelho do Congo (PS/PEG-VC). A síntese das nanopartículas de poliestireno obtidas por polimerização em emulsão possui alguns fatores que podem influenciar nas suas características físico-químicas, como por exemplo concentração do iniciador, solubilidade do monômero no meio aquoso, velocidade de agitação, temperatura e concentração do tensoativo utilizado (Chern, 2006). Tween-20® (polioxietileno sorbitano monolaurato) foi o tensoativo usado na

estabilização da emulsão monômero-meio aquoso. Ele é um surfactante composto por cadeia de 12 carbonos de éster de ácido graxo e cabeça polar neutra composta por oligômeros de poli(etilenoglicol) (PEG), a 25 °C, a concentração micelar crítica (CMC) é $\sim 1 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ (BONFA et al., 2011). Este tensoativo é rotineiramente utilizado como agente de lavagem em imunoenaios e teste Elisa para minimizar a ligação não específica de biomoléculas em ensaios clínicos (GUIMARÃES; STEDILE; DOS SANTOS, 2003). A redução da adsorção de proteínas/enzimas não específicas se deve ao efeito hidroestérico causado pelo comprimento, mobilidade e densidade das cadeias aleatórias dos resíduos de polioxietileno, como também a ausência de cargas do tensoativo (SCHROEN et al., 1995; REN et al., 2006; HLAVACEK; POSNER; PERELSON, 1999). Este efeito de repulsão protéica é maximizado com proteína de tamanho elevado e com empacotamento elevado do PEG sobre a superfície sólida (BONFA et al., 2011). Sofia e colaboradores (SOFIA; PREMNATH; MERRILL, 1998) mostram que a adsorção de citocromo-c, albumina e fibronectina sofrem redução em função do aumento da massa molar e do aumento da densidade de empacotamento de polioxietileno (PEO) enxertado sobre lâminas de silício. Comportamento similar foi observado por Du no uso de PEG para repelir a adsorção de proteínas e células sobre lâminas de vidro (DU; CHANDAROY; HUI, 1997). Entretanto, o efeito repelente das cadeias de PEG sobre a adsorção de proteínas/enzimas ocorrem somente em elevada densidade de empacotamento, situação a qual não sucedem nos capítulos I e II. Recentemente Bonfá e Saito demonstraram que a densidade de PEG nas partículas de PMMA-PEG obtidas por polimerização em emulsão são pequenas o suficiente para garantir o sucesso na adsorção de Albumina sérica bovina (BSA) e concanavalina (Con A), e sob as mesmas condições experimentais as nanopartículas de poliestireno foram

confeccionadas (BONFA et al., 2011). No caso do vermelho do Congo (VC), pertencente à classe do azo-corantes, possui em sua estrutura química anéis aromáticos com os substituintes amino e sulfonato sódico, que lhe conferem características hidrofílicas (KHURANA et al., 2001; LENDEL et al., 2009). VC exibe habilidade de formar complexos com α -proteínas, bem como ligar-se de forma não específica a peptídeos β -amiloide, tendo uso terapêutico na redução da neurotoxicidade da doença de Alzheimer (KAZUSHIGE et al., 2010). Nos capítulos I e II desta tese verificou-se bioconjugação entre o corante e as enzimas Chox e lipase, provavelmente dirigida pela combinação de ligações de hidrogênio e interações hidrofóbicas, bem como o efeito da bioconjugação VC/enzima sobre as propriedades catalíticas.

No capítulo III enzimas Chox e lipase foram imobilizadas sobre partículas de grafeno (G) ou grafeno oxidado (GO) e os parâmetros cinéticos das reações foram avaliados. G e GO são nanomateriais que possuem propriedades interessantes na imobilização de biomoléculas. Dentre as biomoléculas, as enzimas Chox e lipase são boas candidatas para a imobilização sobre G ou GO, pois conforme citado anteriormente, na estrutura dessas proteínas existem regiões hidrofóbicas, hidrofílicas, positivamente e negativamente carregadas, que podem interagir com o G ou GO durante o processo de adsorção, podendo estender a vida útil dessas biomoléculas, criando a possibilidade de reutilização do sistema enzima-G ou enzima-GO, e tornando as enzimas mais estáveis frente a variações maiores de temperatura e pH. No caso do G, apesar de basear-se no mesmo bloco construtor que o fulereno, grafite e nanotubos de carbono, é o único dentre os supracitados que possui estrutura planar (GEIM; NOVOSELOV, 2007). Suas propriedades físico-químicas devem-se a bidimensionalidade de suas folhas planares de um átomo de espessura, com ligações

carbono-carbono sp^2 densamente empacotadas em anéis de seis átomos, conferindo-lhe uma rede cristalográfica semelhantes a favos de mel (GEIM; NOVOSELOV, 2007). Este alótropo de carbono tem se tornado nas últimas décadas um dos principais tópicos no campo de ciências dos materiais, nanotecnologia, ciências químicas e físicas por exibir flexibilidade eletrônica, elevada área superficial planar, elevada resistência mecânica, elevada condutividade térmica e notáveis propriedades eletrônicas (NETO et al., 2009). As notáveis propriedades eletrônicas do grafeno são as que tem despertado mais o interesse da comunidade científica devido ao seu elevado efeito quântico integrado em temperatura ambiente (ZHANG et al., 2005), o qual gera uma ampla possibilidade de aplicações, principalmente em aplicações biotecnológicas para estudos que envolvem a interação entre grafeno e moléculas bioativas (WANG et al., 2009 a; WANG et al., 2009 b). Entretanto, G possui baixa solubilidade em inúmeros solventes, principalmente solventes polares e em sistemas aquosos, enquanto que GO apresenta as mesmas propriedades físico-químicas que G, mas tem boa solubilidade em água e solventes polares (TANG et al., 2009).

GO pode ser obtido por tratamento químico do grafite em direção a sua oxidação, com subsequente dispersão e esfoliação em água ou outro solvente orgânico, assumindo em seu plano basal a presença de vários grupos funcionais oxigenados na forma de grupos epoxis, hidroxilas, fenóis, lactonas, quinonas e carbonilas (CHEN; FENG; LI, 2012). A presença desses grupos funcionais na estrutura do GO lhe confere a vantagem de ampliar suas aplicações se comparado ao G, podendo ser modificado quimicamente com a inserção de outros grupos orgânicos de interesse (EDA; CHHOWALLA, 2010).

Devido a elevada área planar específica do G, a sua interação com biomoléculas que possuem características hidrofóbicas é interessante pois o processo de adsorção pode ser governado por forças dispersivas intermoleculares, fazendo com que essas biomoléculas fiquem inseridas sobre a superfície de suas folhas (WANG et al., 2011). No caso do GO, a presença de grupos funcionais oxigenados é interessante em aplicações de biomoléculas com características hidrofílicas, induzindo que o processo de adsorção seja regido por formação de ligações de hidrogênio (SEGER; KAMAT, 2009). Além disso, GO pode ser funcionalizado com diferentes grupos orgânicos que direcionem a formação de ligação covalente entre o GO e moléculas de interesse biológico (ALLEN; TUNG; KANER, 2009).

Apesar das partículas de PS/PEG, PS/PEG-VC, G e GO apresentarem-se promissores na imobilização da Chox e da lipase, estudos sistemáticos realizados pela comunidade acadêmica demonstraram que a técnica de imobilização escolhida tem efeitos cruciais sobre a atividade catalítica da enzima. Portanto, a influência da técnica de imobilização sobre a estabilidade e a catálise enzimática não pode ser negligenciada, pois pode determinar o sucesso em inúmeras aplicações biológicas potenciais. O método de imobilização covalente, por exemplo, é amplamente utilizado, no qual a enzima é ligada quimicamente à superfície sólida por meio de uma ligação covalente entre um grupo químico funcional não essencial da proteína com o grupo funcional presente na superfície sólida (SHELDON, 2007). A técnica é requerida quando no processo reacional a enzima não é liberada na solução após o uso devido à natureza estável da ligação formada entre a enzima e a matriz sólida (KATCHALSKI-KATZIR; KRAEMER, 2000). A ligação covalente da enzima com o suporte envolve dois passos principais, (i) ativação da matriz pela adição de um grupo funcional reativo e (ii)

modificação da superfície do suporte por meio da inserção de um grupo funcional ativado (NISHA; KARTHICK; GOBI, 2000). O processo de ativação geralmente forma grupos eletrofílicos no suporte, no qual numa reação acoplada reage com nucleófilos fortes da proteína. As reações frequentemente usadas envolvem cadeias laterais dos seguintes aminoácidos: lisina (grupo ϵ -amino), cisteína (grupo tiol), e ácidos aspártico e glutâmico (grupo carbonila), as quais rendem ligações amida, éter, tio-éter ou carbamato. Lipase (REN et al., 2011) e Chox (SAXENA; CHAKRABORTY; GOSWAMI, 2011) foram imobilizadas covalentemente com sucesso, porém a aplicação eletroquímica em biossensores apresentam o inconveniente de sofrerem interferência de espécies facilmente oxidadas, conforme citado anteriormente (SHIH; YANG; LIN, 2009). Uma variação da imobilização covalente é a ligação por afinidade. Os princípios da afinidade entre biomoléculas complementares podem ser aplicados na imobilização de enzimas. A imobilização da enzima na matriz ocorre por meio de interações específicas envolvendo o reconhecimento antígeno-anticorpo (SU et al., 2010). Na segunda parte desta monografia temos uma aplicação prática deste método por meio da notável seletividade e reconhecimento antígeno-anticorpo na interação entre HRP e anti-HRP e anticorpos monoclonais e glicoproteína (MABC1 ou MABC6 com CEA). Uma descrição mais detalhada está apresentada no Capítulo II, Parte B desta tese.

Outro método de imobilização amplamente utilizado é aprisionamento ou encapsulamento, onde a enzima é aprisionada na rede tridimensional interna do material polimérico, que permite que substrato e produto atravessem livremente pela membrana permeável (CHOI et al., 2011). Este método difere dos outros métodos supracitados pois a enzima não é ligada na matriz polimérica ou na membrana, mas na verdade ela é envolvida pelo material polimérico. O aprisionamento da biomolécula pode ser

executado com o auxílio de um gel, fibra de aprisionamento ou microencapsulação. A vantagem da técnica está na rapidez, baixo custo financeiro, condições amenas no processo reacional, proteção da enzima contra contaminação microbiológica e elevada área superficial entre o material polimérico e a enzima. Porém, para uso prático este método é limitado pela transferência de massa através da membrana ou do gel, e pelo inconveniente de inativação da enzima durante o processo de encapsulação (TAN et al., 2010; OZYILMAZ; GEZER, 2010; PRASAD et al., 2011; SASSOLAS; BLUM; LECA-BOUVIER, 2012; NISHA; KARTHICK; GOBI, 2012).

Os métodos de imobilização por ligação covalente e encapsulamento são conhecidos como métodos de imobilização irreversíveis. O processo de imobilização de enzimas pelo modo reversível pode apresentar-se altamente atrativo economicamente, pois o procedimento de imobilização ocorre sob condições amenas com manutenção considerável da atividade catalítica (ZHANG; YUWEN; PENG, 2013). A imobilização reversível de enzimas é particularmente importante para a imobilização de enzimas lábeis e para aplicações em sistemas de interesse clínico-analítico na identificação, dosagem e monitoração de moléculas, vírus, bactérias, proteínas e enzimas diretamente relacionadas a enfermidades. A imobilização reversível é um método não-específico de adsorção baseado na fisissorção. Na adsorção física as enzimas são aderidas a matriz sólida através de ligações de hidrogênio, forças de van der Waals, ou interações hidrofóbicas, enquanto que na ligação iônica as enzimas são ligadas por interações eletrostáticas (RABE; VERDES; SEEGER, 2011). A natureza das forças envolvidas na imobilização não-covalente resulta de processos que podem ser revertidos por mudanças nas condições que influenciam as condições de interações, como pH, força iônica, temperatura ou polaridade do solvente. Uma aplicação prática altamente utilizada da

ligação iônica de enzima reversivelmente imobilizada é baseada nas interações proteína-ligantes, princípio usado na cromatografia por afinidade (JOSEPH; HAGE, 2010). A metodologia é simples e reversível, porém há dificuldades em encontrar as condições experimentais em que a enzima permaneça fortemente ligada e ativa. Mais recentemente, o uso de ligantes poliméricos-iônicos imobilizados tem permitido a modulação das interações proteína-superfície, otimizando as propriedades das proteínas derivatizadas (MAGNUSSON et al., 2010). Contudo, problemas relacionados ao uso de superfície altamente carregadas podem surgir quando os substratos ou os produtos também são carregados, gerando distorções na cinética enzimáticas como resultados de fenômenos de partição ou de difusão (DA SILVA et al., 2010).

A imobilização de enzima por ligação com metais, também chamada de quelação, é um método simples com manutenção da atividade enzimática entre 30 e 80 %. Sais de metais de transição ou hidróxidos são depositados em superfícies com suportes orgânicos por aquecimento ou neutralização e aderem-se por coordenação com grupos nucleófilos na matriz (NISHA; KARTHICK; GOBI, 2012). Fatores estéricos impossibilitam a matriz de ocupar todas as posições de coordenação do metal, permanecendo algumas posições livres para coordenar com grupos funcionais de alguns resíduos de aminoácidos da enzima. No entanto, a estabilidade operacional alcançada é altamente variável e dificilmente reproduzível. As razões para esta ausência de reprodutibilidade são possivelmente relacionadas com a não uniformidade dos sítios de adsorção e com a significativa dispersão do íon metálico no suporte. Uma maneira de controlar a formação de sítios de adsorção, os queladores ligantes podem ser imobilizados no suporte sólido por meio de ligações covalentes. Os íons metálicos podem então serem ligados por coordenação e os complexos estáveis queladores fortes

formados podem ser usados para a retenção de proteínas. A dessorção de proteínas ligadas pode ser facilmente alcançada por competição com ligantes solúveis ou por variações do pH, e o suporte por ser facilmente regenerado lavando-o com um quelador forte (TÜZMEN; KALBURCU; DENIZLI, 2012).

Interações hidrofóbicas geralmente gera ganho entrópico para o sistema devido à liberação de moléculas de água de hidratação. Imobilização reversível decorrente de interações hidrofóbicas pode ocorrer sob condições brandas e não resulta em perdas significativas de atividade enzimática. Interações de van der Waals entre os resíduos de aminoácidos hidrofóbicos e a superfície da matriz garantem a adesão da enzima. Apesar dos méritos deste tipo de adsorção, alguns inconvenientes existentes como pobre estabilidade operacional e suscetibilidade a variações de alguns parâmetros físico-químicos podem causar dessorção da proteína devido às fracas forças que a mantêm aderida sobre a superfície sólida. Podem ocorrer também mudanças conformacionais que podem vir a inativar a atividade catalíticas da enzima (GARCIA-GALAN et al., 2011; HIRSH, S. L. et al, 2010; ZHANG et al., 2010).

Há parâmetros externos que controlam a adsorção de enzimas e que são decisivos no sucesso da retenção da atividade da enzima imobilizada sobre superfície sólida. Principalmente no desenvolvimento de biossensores espectrofotométricos para a dosagem de triglicérides e colesterol sérico baseados na lipase e na Chox, estes parâmetros podem determinar a afinidade entre as enzimas e os seus respectivos substratos e, conseqüentemente, no sucesso da imobilização (Goldstein, 1976; VIDAL, Juan Carlos et al., 2003; KOUASSI; IRUDAYARAJ; MCCARTY, 2005; RAM et al., 2001). Parâmetros externos são basicamente temperatura, pH, força iônica e composição do tampão empregado (NEL et al., 2009). Temperatura tem efeito sobre as

condições de equilíbrio e a cinética de adsorção. O aumento da temperatura causa aumento na velocidade de adsorção devido a difusividade aumentada da proteína em direção à superfície sorvente. A força motriz na adsorção enzimática é o ganho entrópico causado pela liberação de íons e moléculas de água adsorvidas e da mudança conformacional causada pelo rearranjo das estruturas tridimensionais. A quantidade de enzima adsorvida geralmente aumenta com a elevação da temperatura por tornar a energia de Gibbs mais favorável para o processo. Entretanto, existe a possibilidade de inativação quando a enzima for lábil (SIZER, 2006; KLIBANOV, 1983).

O pH determina a carga líquida da enzima. Quando o pH se iguala ao ponto isoelétrico (pI) da proteína o número de cargas negativas e positivas estão balanceados, resultando em carga líquida nula. Em $\text{pH} < \text{pI}$ as proteínas estão positivamente carregadas, enquanto que $\text{pH} > \text{pI}$ as mesmas encontram-se negativamente carregadas. Repulsões eletrostáticas proteína-proteína são minimizadas no ponto isoelétrico permitindo alta densidade de empacotamento na superfície (RODRIGUES et al., 2013). Conforme trabalho reportado na literatura (SILVA et al., 2010), interações entre polycations e proteínas positivamente carregadas sob diferentes forças iônicas podem ocorrer devido à anisotropia de carga existente na superfície dessas biomoléculas, como também pela existência de regiões hidrofóbicas e hidrofílicas. Velocidades de adsorção são altas quando proteína e substrato suportam cargas opostas, sendo a migração das enzimas aceleradas por atrações eletrostáticas em direção à superfície (LADAM et al., 2001).

A concentração de sais dissolvidos, ou a força iônica do meio, é outro parâmetro que afeta o processo de adsorção de proteínas. A força iônica basicamente determina o comprimento de Debye: quanto maior a força iônica, mais blindadas estarão as cargas

das proteínas (SHELDON, 2007). Uma blindagem eficiente do potencial elétrico de proteínas podem influenciar a cinética de adsorção ao reduzir as interações laterais que são de natureza eletrostática, e por sua vez pode iniciar um aumento na densidade de empacotamento, favorecendo efeitos cooperativos ou reduzindo repulsões proteína-proteína. Entretanto, em condições de força iônica elevada ocorre um aumento da tendência de agregação da proteína, fenômeno conhecido como *salting out*, devido à competição dos eletrólitos e macromoléculas pelas moléculas de água. Hofmeister reconheceu que soluções aquosas de proteínas apresentavam comportamentos distintos dependendo do tipo de sal que estava presente no meio. Ele ordenou os sais conforme a habilidade de aumentar ou diminuir a solubilidade das proteínas. Os íons de sais com habilidade de precipitar proteínas em soluções aquosas foram denominados de cosmotrópicos; estes íons geralmente tem campo elétrico forte. Os íons de sais que aumentam a solubilidade de proteínas foram denominados de caotrópicos; estes íons apresentam alta polarizabilidade e tendem a adsorver na proteína (ZHANG; CREMER, 2006; CACACE; LANDAU; RAMSDEN, 1997; NAPPER, 1970).

As propriedades interfaciais entre superfície-proteína podem determinar o comportamento de adsorção, o qual é frequentemente resultante da sobreposição de fenômenos de transporte, adsorção e processo de repulsão. Em processo de adsorção competitiva proteínas pequenas difundem mais rapidamente do que as grandes e são as espécies dominantes na fase inicial de adsorção. Porém, proteínas grandes ligam-se mais fortemente com a superfície devido a sua maior área de contato e pode ainda repelir outras enzimas pré-adsorvidas na superfície, resultando em um máximo de adsorção enzimática (JUNG et al., 2003; TURBILL; BEUGELING; POOT, 1996). Portanto, é importante a compreensão dos fenômenos que ocorrem na interface

suporte/biomolécula, os quais se relacionam com comportamentos termodinâmico e cinético. Para este trabalho focaremos na compreensão das interações na interface entre enzima de interesse clínico-analítico e nanopartículas poliméricas, avaliando: (i) as características físico-químicas das superfícies das nanopartículas, (ii) a interface sólido-líquido e as mudanças que ocorrem quando as partículas interagem com as enzimas e os componentes à sua volta, (iii) a interface sólido-enzima de interesse. As características da interface partícula-proteína possuem uma função chave na compreensão da estabilidade coloidal e nos parâmetros catalíticos exibidos pelas enzimas imobilizadas, os quais foram sistematicamente estudados.

As características das nanopartículas que podem influenciar o comportamento da imobilização de enzimas são a composição química do material, funcionalização da superfície, forma e ângulo de curvatura, porosidade, rugosidade e comportamento hidrofóbico e hidrofílico, carga efetiva da superfície (potencial zeta), agregação da partícula e hidratação (GODDARD; HOTCHKISS, 2007; CHONG; ZHAO, 2004). Essas características contribuem ativamente com as interações por meio da promoção da adsorção de biomoléculas, formação da dupla camada elétrica e minimização da energia livre de superfície, determinando as forças que operam a interface partícula-meio, como forças de van der Waals, repulsão eletrostática entre as interações da dupla camada elétrica, forças de curto alcance e interações com o solvente (SCHWARZ et al., 1999; RECHENDORFF et al., 2006; SUN; BERNSTEIN, 1996, THORMANN et al., 2008). Interações do meio (por exemplo interações proteína-proteína) podem também induzir mudança de larga escala, tais como dissolução de nanopartículas, lixiviação de íons, transformação de fase e aglomeração. Conforme citado anteriormente, neste trabalho focaremos nos capítulos I e II da parte A na imobilização das enzimas Chox e lipase

sobre nanopartículas de poliestireno obtidas por polimerização em emulsão mediadas ou não por VC, enquanto que no capítulo III essas enzimas serão imobilizadas sobre G ou GO e os seus parâmetros cinéticos avaliados sistematicamente.

Objetivos

Esta dissertação tem por objetivos:

- (i) Estudar o comportamento catalítico das enzimas colesterol oxidase e lipase imobilizadas sobre nanopartículas e avaliar o potencial de aplicação em análises clínicas;
- (ii) Desenvolver um sensor nanomecânico para humidade baseado em filme fino de PHEMA e
- (iii) Desenvolver um sensor nanomecânico para a identificação e dosagem de um biomarcador cancerígeno (CEA).

2 - Materiais

Para suportar as enzimas sobre as nanopartículas poliméricas de PS/PEG foram usadas nos capítulos I e II monômero de estireno (S; Fluka, Switzerland), persulfato de potássio ($K_2S_2O_8$, Merck, Germany) e poli(etilenoglicol) sorbitano monolaurato (Tween-20®, Sigma-Aldrich Co. Milwaukee, WI, USA) para a polimerização em emulsão. Vermelho do congo (VC) (3,3'-(4,4'-bifenildilbisazo) bis- (4-amino-1-naftalinsulfonato) - de dissódio) obtido pela Sigma-Aldrich (Brasil) foi adsorvido sobre as partículas poliméricas. Estruturas químicas do Tween-20® e VC estão apresentadas na Figura 1. Para o capítulo III as enzimas Chox e lipase foram suportadas sobre Grafeno (G) e grafeno oxidado (GO) obtidos da CheapTubes (USA).

Figura 1: Representação das estruturas químicas do Tween 20® e do Vermelho do Congo (VC).

Para o capítulo I foram utilizadas Colesterol oxidase, Chox, da *Brevibacterium sterolicum* (DOUKYU, 2009) (47 kDa, C8868, FAD não covalentemente ligado, Sigma, USA), horseradish peroxidase, HRP, tipo VI-A, da *Amorascia rusticana*, (44 kDa, P-6782, Sigma, USA) e 2,2'-azino-bis (ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico) (ABTS, A-1888, Sigma, Brasil) sem purificação prévia. Lâminas de sílcio (Si/SiO₂) (100) com uma camada nativa de óxido de sílcio de aproximadamente 2 nm de espessura, obtidos da University Wafers (Boston, MA, USA), cortados em uma dimensão de 1 cm², limpos conforme a maneira padrão e posteriormente usados como substratos para microscopia eletrônica de varredura.

Para avaliar o comportamento do sistema PS/PEG/VC/Chox na determinação e dosagem de colesterol em amostra de sangue artificial com padrões nível baixo e alto de colesterol *high-density lipoprotein* (HDL) (lipoproteína de alta densidade) (Qualitrol 1H e Qualitrol 2H, obtidos da LabTest, lote 3001, respectivamente) utilizou-se dextrana sulfatada (D-8906, Sigma-Aldrich, Brasil), NaN₃ (A 1105.01.AD, Synth), MnCl₂.4H₂O (C 10520.01.AG, Synth), colesterol esterase (~300KDa, extraída de *Pseudomonas sp*, C 1403, Sigma-Aldrich, Brasil), fenol (P 1037, Sigma-Aldrich, Brasil) e 4-aminoantipirina (A 4382, Sigma-Aldrich, Brasil). Estes ensaios foram importantes para avaliar o potencial de aplicação dos sistemas desenvolvidos em análises clínicas de amostras reais. A concentração tabelada de colesterol e presente no sangue artificial com padrões nível baixo e nível alto de colesterol HDL serviram como padrão de análise nos ensaios realizados.

Para o capítulo II foram utilizados lipase proveniente da *Candida rugosa* (~ 60 KDa, L1754 Sigma-Aldrich, Brasil) (BENJAMIN; PANDEY, 2000) e o *p*-nitrofenilbutirato, (*p*-NFB, N9876 Sigma-Aldrich, Brasil). Lâminas de sílcio cortados

em uma dimensão de 1 cm² e limpos em mistura oxidativa foram usados como suporte para microscopia eletrônica de varredura.

Para o capítulo III foram usados grafeno (G) e grafeno oxidado (GO) obtido da empresa Cheaptubes, EUA, como suporte para as enzimas lipase e Chox, tendo as suas atividades enzimáticas mensuradas espectrofotometricamente em solução tampão trisma-HCl (Sigma T1503 Ultra) preparada em água deionizada. Os reagentes necessários para a avaliação da atividade enzimática da lipase foram: p-nitrofenol butirato (p-NFB) (Sigma N 9876) adicionado em 2-propanol (Synth, Lot 153323) e posteriormente diluído em tampão trisma-HCl. Na atividade enzimática da Chox, preparou-se solução de colesterol (Sigma, C8667) em tampão tris-HCl, sendo adicionado Triton X-100 (Nuclear, cod. 311960). Os reagentes que formaram o cromóforo foram: 4-aminoantipirina (Sigma, A 4382) e fenol (Sigma, P1037) catalisadas pela enzima horseradish peroxidase (HRP) (Sigma, P6786).

3 - Métodos

3.1 - Preparação das nanopartículas de PS/PEG: Capítulos I e II

O método utilizado para a síntese de nanopartículas de poliestireno foi o da polimerização em emulsão (BONFA et al., 2011; BLACHECHEN et al, 2012), que utiliza além do monômero (estireno), um iniciador hidrossolúvel (persulfato de sódio, 216232, Synth, Brasil) e um emulsificante (tensoativo não iônico, Tween 20). A síntese ocorreu em um balão volumétrico de quatro bocas contendo 100 mL de $4,8 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ de Tween 20, concentração correspondente a sua concentração micelar crítica (c.m.c.). O sistema foi conectado a um condensador de refluxo e purgado com N_2 sob agitação constante de 500 rpm durante o processo de polimerização. Em temperatura constante de $(75 \pm 2)^\circ\text{C}$ foi adicionado 10 mL de estireno. Em seguida, foi adicionado o persulfato de sódio ($\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$), de forma a atingir a concentração de $0,013 \text{ mol.L}^{-1}$. A síntese ocorreu por 2 hs. Terminado este período, o sistema foi resfriado sob agitação constante de 500 rpm até a temperatura ambiente. A dispersão foi dialisada (membrana de diálise de 14000 MW; Viskase Corp., USA) até atingir condutividade iônica de $5 \mu\text{S cm}^{-1}$.

3.2 - Adsorção de Vermelho do Congo sobre as nanopartículas de PS/PEG: Capítulos I e II

A isoterma de adsorção do vermelho do congo (VC) dissolvido em solução 10 mmol L^{-1} de NaCl sobre as nanopartículas foi obtido em $(24 \pm 1)^\circ\text{C}$ e pH 7, no intervalo de concentração de VC de $0,9 \mu\text{mol L}^{-1}$ a $9,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ e com $\text{Np} = 1,7 \cdot 10^{11} \text{ partículas mL}^{-1}$ constante. O corante e as nanopartículas interagiram por 4 h sob rotação constante de 3 rpm em um carrossel vertical montado no laboratório. O

tempo de adsorção de 4 h foi suficiente para que as condições de equilíbrio fossem atingidas. Posteriormente as dispersões foram centrifugadas em 12045 g por 30 min, e o seu sobrenadante foi separado das partículas com o auxílio de uma seringa. A concentração do corante não adsorvido (livre) presente no sobrenadante foi determinado por espectrofotometria UV-Vis em 497 nm usando coeficiente de extinção molar $\epsilon = 6,24 \cdot 10^4 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (IWUNZE, 2010). A temperatura e o pH do meio usados na curva de calibração foram os mesmos daqueles utilizados nos experimentos de adsorção. A concentração de corante adsorvido sobre as nanopartículas foi calculado como a diferença entre a concentração inicial de VC e a concentração de VC livre presente no sobrenadante. A quantidade de VC (Q_{VC}) sobre as partículas foi calculado dividindo a concentração de VC adsorvido pela massa de partículas de PS/PEG na dispersão com $N_p = 1,7 \cdot 10^{11} \text{ partículas mL}^{-1}$, onde a unidade correspondente a Q_{VC} é $\mu\text{mol g}^{-1}$. Os valores médios de diâmetro (D), polidispersidade (PD) e potencial- ζ foram determinados após cada experimento de adsorção, centrifugação, e remoção completa do sobrenadante para a quantificação do VC livre e posterior redispersão em 10 mmol L^{-1} de KCl.

3.3 - Adsorção de Chox sobre as partículas de PS/PEG/VC: Capítulo I

A isoterma de adsorção da Chox sobre as partículas de PS/PEG ou PS/PEG/VC foram obtidas a $(24 \pm 1)^\circ \text{C}$ e pH 7, e o intervalo de concentração de Chox de $0,4 \mu\text{mol L}^{-1}$ a $28 \mu\text{mol L}^{-1}$ e com $N_p = 1,7 \cdot 10^{11} \text{ partículas mL}^{-1}$ constante. Chox e as nanopartículas interagiram por 24 h sobre rotação constante de 3 rpm em um carrossel vertical montado no laboratório. Posteriormente as dispersões foram centrifugadas em 12045 g por 30 min, e o seu sobrenadante foi separado das partículas com o auxílio de

uma seringa. O tempo de adsorção de 24 h foi suficiente para que as condições de equilíbrio fossem atingidas. A concentração da Chox não adsorvida (livre) presente no sobrenadante foi mensurada por espectrofotometria UV-Vis em 280 nm usando coeficiente de extinção molar $\epsilon = 76365 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (SAMPSON; KASS; GHOSHROY, 1998). A temperatura e o pH do meio usados para a curva de calibração foram os mesmos dos utilizados nos experimentos de adsorção. A concentração de Chox adsorvida sobre as partículas de PS/PEG ou PS/PEG/VC foi calculada como a diferença entre a concentração inicial de Chox e a concentração de Chox livre presente no sobrenadante. A quantidade de Chox (Q_{Chox}) sobre as partículas foi calculado dividindo a concentração de Chox adsorvido pela massa de partículas de PS/PEG/VC na dispersão. A unidade correspondente a Q_{Chox} é $\mu\text{mol mg}^{-1}$. Os valores médios de D, PD e potencial- ζ foram determinados após cada experimento de adsorção, centrifugação, e remoção completa do sobrenadante para a quantificação de Chox livre e posterior redispersão em 10 mmol L^{-1} de KCl.

3.4 - Adsorção de lipase sobre as partículas de PS/PEG ou PS/PEG/VC: Capítulo II

A isoterma de adsorção da lipase sobre as partículas de PS/PEG ou PS/PEG/VC foram obtidas $(24 \pm 1)^\circ \text{C}$ e pH 7, e o intervalo de concentração de lipase de $3,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ a $33 \mu\text{mol L}^{-1}$ e com $N_p = 1,7 \cdot 10^{10}$ partículas mL^{-1} constante. Lipase e as nanopartículas interagiram por 24 h sobre rotação constante de 3 rpm em um carrossel vertical montado no laboratório. O tempo de adsorção de 24 h foi suficiente para que as condições de equilíbrio fossem atingidas. Posteriormente as dispersões foram centrifugadas em 12045 g por 30 mins, e o seu sobrenadante foi separado das partículas com o auxílio de uma seringa. A concentração da lipase não adsorvida (livre) presente

no sobrenadante foi mensurada por espectrofotometria UV-Vis em 280 nm em um equipamento Beckman-Coulter DU640 usando coeficiente de extinção molar $\epsilon = 11889 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ determinados experimentalmente. A temperatura e o pH do meio usados para a curva de calibração foram os mesmos dos utilizados nos experimentos de adsorção. A concentração de lipase adsorvida sobre as partículas de PS/PEG ou PS/PEG/VC foi calculado como a diferença entre a concentração inicial de lipase e a concentração de lipase livre presente no sobrenadante. A quantidade de lipase (Q_{lipase}) sobre as partículas foi calculado dividindo a concentração de lipase adsorvida pela massa de partículas de PS/PEG/VC na dispersão. A unidade correspondente a Q_{lipase} é $\mu\text{mol mg}^{-1}$. Os valores médios de D, PD e potencial- ζ foram determinados após cada experimento de adsorção, centrifugação, e remoção completa do sobrenadante para a quantificação de lipase livre e posterior redispersão em 10 mmol L^{-1} de KCl.

3.5 - Experimentos de dessorção: Capítulos I e II

Após a adsorção de lipase, Chox e VC sobre as nanopartículas foram realizados ensaios de dessorção. Após a adsorção, centrifugação e remoção do sobrenadante dos eppendorfs, o volume inicial foi completado com solvente puro. As dispersões foram mantidas por 3 h sob rotação constante de 3 rpm. As dispersões foram centrifugadas em 12045 g por 30 min e a absorbância do sobrenadante foi mensurada para quantificar a concentração da dessorção da lipase, Chox ou VC. A quantidade dessorvida não sofreu alteração significativa após 3 h de interação com o solvente puro.

3.6 - Caracterização das partículas de PS/PEG e PS/PEG/VC antes e após a adsorção de Chox ou lipase: Capítulos I e II

Os valores médios do diâmetro hidrodinâmico (D) foram determinados por meio do espalhamento quase-elástico da luz, usando um equipamento ZetaPlus-Zeta Potential Analyzer (Brookhaven Instruments Corporation, Holtsville, NY, USA), o qual é equipado com um laser de 570 nm e um detector de foto-correlação de luz espalhada fixo em 90° para a determinação de tamanho de partícula. Para a determinação de D, a técnica de espalhamento de luz dinâmico (Dynamic light-scattering, DLS) baseia-se na flutuação da intensidade da luz espalhada pela dispersão ao longo do tempo causadas pelas partículas em movimento Browniano (PECORA, 2000). Quando a partícula atravessa o feixe de luz incidente ocorre redução da intensidade da luz transmitida. Este fenômeno é quantificado pelo decaimento da função de autocorrelação temporal das flutuações da intensidade da luz espalhada, tornando possível medir diretamente o coeficiente de difusão translacional (D_t), o qual está inversamente relacionado com o raio hidrodinâmico da partícula (R) (PECORA, 2000). Para uma dispersão diluída, as partículas esféricas podem ser determinadas por meio da equação de Stokes-Einstein (equação 1):

$$D_t = k_B T / (6\eta\pi R) \quad (1)$$

onde k_B é a constante de Boltzmann, T é a temperatura absoluta e η é a viscosidade do meio. Portanto, para uma partícula esférica é possível calcular o seu raio hidrodinâmico (o qual inclui camadas de solvatação).

No caso da distribuição de tamanho e dos valores de polidispersidade (PD), o programa NNLS (“non negatively constrained least square method”) entre outros do

ZetaPlus, permite obter a distribuição das constantes de decaimento das flutuações da luz espalhada (GRABOWSKI; MORRISON, 1983). Por meio do coeficiente de difusão (D_t) obtido a partir do ângulo de espalhamento θ e da constante de decaimento (Γ), equação 2, o programa calcula o valor de D da partícula ao relacionar com a equação 1.

$$D_t = \Gamma/q^2 \quad (2)$$

onde $q = (4\pi n/\lambda) \sin(\theta/2)$, n é o índice de refração do meio e λ é o comprimento de onda da luz incidente.

O potencial zeta (ζ) é definido como o potencial no plano de cisalhamento da partícula. Para ser determinado o valor do potencial- ζ , o programa Zeta-Sizer da Brookhaven utiliza-se do “electrophoretic light scattering”, onde a velocidade pelo qual as partículas se movem em um campo elétrico aplicado é mensurado pela mudança da frequência da luz de laser espalhada (efeito Doppler), a qual se relaciona diretamente com a mobilidade eletroforética da partícula (μ) em 10 mmol L⁻¹ de KCl, conforme a equação de Smoluchowski (equação 3) (SHAW, 1992).

$$\zeta = \mu\eta/\epsilon \quad (3)$$

onde μ é a mobilidade eletroforética, η e ϵ são respectivamente a viscosidade e a constante dielétrica do meio.

Outra caracterização física importante é a densidade numérica média de partículas (N_p), o valor foi calculado considerando o diâmetro médio das partículas obtido por DLS, teor de sólidos e densidade de polímero de 1,0 g/cm³ (CASTRO et al., 2004). Para efeito de avaliação dos dados obtidos na adsorção de Chox e lipase sobre as partículas de PS/PEG ou PS/PEG/VC, as partículas foram caracterizadas antes e após a

adsorção das enzimas com $N_p = 10^8$ partículas mL^{-1} . Após a adsorção das enzimas, as dispersões foram centrifugadas, o sobrenadante removido, e as partículas redispersadas. Este procedimento foi repedito três vezes e os valores médios de D, PD e potencial- ζ foram determinados.

Para determinar a morfologia das partículas secas, extraiu-se micrografias por microscopia eletrônica de varredura (MEV) usando o equipamento SEM-FEG JEOL 7401F (Jeol, Tokio, Japão). A solução estoque da dispersão polimérica foi diluída 1000 vezes em água Milli-Q e posteriormente gotejadas sobre lâminas de silício previamente limpas. A água evaporou lentamente em temperatura ambiente. As dispersões secas foram recobertas com uma uma camada de 3 nm de ouro.

3.7 - Elipsometria: Capítulos I e II

A espessura média da camada de lipase adsorvida foi determinada por elipsometria usando um elipsomêtro vertical modelo computer-controlled DRE-EL02 ellipsometer (Ratzeburg, Alemanha) com ângulo de incidência ϕ de $70,0^\circ$ e um laser He-Ne com comprimento de onda λ de 632,8 nm. A equação fundamental da elipsometria (equação 4) (AZZAM; BASHARA, 1996):

$$\exp(i\Delta) \tan\psi = (R_p/R_s) = f(n_k, d_k, \lambda, \phi) \quad (4)$$

onde R_p e R_s são coeficiente de reflexão total para as componentes paralelos e perpendiculares da luz. A espessura média (d_k) e o índice de refração (n_k) pode ser calculado pela variação dos ângulos elipsométricos Δ e ψ usando cálculos iterativos e um modelo de multicamadas compostos pelo substrato, camada desconhecida e meio ao redor. A espessura da camada de SiO_2 foi determinada em ar, considerando os índices

de refração $n_{\text{Si}} = (3,88 - i0,018)$, $n_{\text{ar}} = 1,00$ e $n_{\text{SiO}_2} = 1,462$ e uma camada infinita para o Si e o ar. A espessura média obtida para SiO_2 foi $(2,0 \pm 0,1)$ nm. Para a camada de VC adsorvida sobre Si/SiO₂, $n_{\text{VC}} = 1,59$ e $d_{\text{VC}} = (1,4 \pm 0,2)$ nm. Após serem determinados os valores para a camada de lipase, d_{lipase} , adsorvida sobre Si/SiO₂ ou Si/SiO₂/VC foram calculados usando índice de refração $n = 1,52$ (KOSAKA et al., 2007). Os valores de d_{lipase} obtidos no ar foram determinados no equilíbrio de adsorção.

3.8 - Atividade catalítica da Chox livre e adsorvida sobre PS/PEG/VC: Capítulo I

O ensaio de atividade enzimática da Chox foi avaliado por meio de uma reação acoplada com a enzima “horseradish peroxidase” (HRP). Chox catalisa a oxidação do colesterol (colest-5en-3 β -ol) usando o oxigênio como aceptor de elétrons para formar colest-4-en-3-ona e H₂O₂ como produtos. Na presença de H₂O₂, como agente oxidante, HRP catalisa a oxidação do ABTS para o cátion radical ABTS^{•+} (esquema equação 2). A reação ocorreu em pH 6,5 a (24 ± 1) ° C. A oxidação do ABTS ($\lambda_{\text{máx}} = 340$ nm) para ABTS^{•+} ($\lambda_{\text{máx}} = 414$ nm) (KADNIKOVA; KOSTIĆ, 2002) foi monitorado por espectrofotometria UV-Vis (Beckmann-Coulter DU 600) em função do tempo. A concentração de ABTS^{•+} foi calculado usando a equação de Beer-Lambert considerando o caminho optico de 1 cm e o coeficiente de extinção molar de $3,6 \cdot 10^4 \text{ mol L}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (CHILDS; BARDSLEY, 1975). Visualmente a formação de ABTS^{•+} foi evidenciado pelo aparecimento de uma coloração verde na solução. As reações estão esquematizadas na Figura 2.

Figura 2: Representação da reação de oxidação do colesterol e ABTS catalisada pela ChOx e HRP, respectivamente. H₂O₂ produzida pela oxidação do colesterol em (a) é agente oxidante do ABTS em (b).

Para os ensaios de atividade enzimática da Chox, $0,24 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de Triton X-100 (Triton é uma marca comercial da Union Carbide Corp.) e colesterol foi preparado em uma mistura de 98 mL de tampão Tris-HCl (pH 7,0, $50 \cdot 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$) e 2 mL de isopropanol, rendendo uma concentração final de colesterol que variou de 100 mg dL⁻¹ (limite inferior da concentração normal no sangue) a 300 mg dL⁻¹ (nível de alto risco no sangue). Estas soluções foram denominadas soluções estoques A e B respectivamente. A solução A foi usada como solventes para preparar soluções de ABTS e HRP. A concentração para o Triton X-100 corresponde a sua concentração

micelar crítica (DE MARTINEZ; GREEN, 1979). Triton foi escolhido como emulsificante por fornecer a melhor constante catalítica (SAMPSON; KASS; GHOSHROY, 1998; KREIT; SAMPSON, 2009). O volume e a concentração de cada reagente na mistura na cubeta espectrofotométrica foi a seguinte: 5 μL da dispersão polimérica com $N_p = 1,7 \cdot 10^{11}$ partículas mL^{-1} , 20 μL de ABTS ($4,0 \cdot 10^{-3}$ mol L^{-1}), 30 μL de HRP (0,1 mg mL^{-1}) e 645 μL da solução B. Para as medidas do branco, a mesma mistura foi preparada na ausência de ABTS. Para efeito de comparação da eficiência catalítica entre a Chox livre e a adsorvida, a concentração da Chox livre foi a mesma da obtida na isoterma de adsorção da Chox sobre as partículas em $N_p = 1,7 \cdot 10^{11}$ partículas mL^{-1} . Experimentos controles também foram realizados, onde as partículas de PS/PEG ou PS/PEG/VC na ausência de Chox foram adicionadas na reação para o monitoramento da formação do ABTS^{++} por espectrofotometria UV-Vis ($\lambda_{\text{máx}} = 414$ nm) em função do tempo.

3.9 - Atividade catalítica da Chox livre e adsorvida sobre PS/PEG/VC na dosagem de colesterol sérico: Capítulo I

Sangue artificial liofilizado com nível baixo de colesterol HDL (Qualitrol 1H) e nível alto de colesterol HDL (Qualitrol 2H) foram diluídos em água Milli-Q conforme as especificações do fornecedor e utilizados como padrões nos ensaios enzimáticos com a Chox livre e imobilizada sobre as nanopartículas de PS/PEG/VC. Para a dosagem do colesterol HDL sérico a dispersão sanguínea interagiu com 0,091 g L^{-1} de dextrana com 0,5 g L^{-1} de NaN_3 , 50 μL de MnCl_2 0,32 mol L^{-1} e 59 μL de água Milli-Q; rendendo um volume final de 500 μL , o qual foi centrifugado em 12045 g por 30 minutos. O sobrenadante foi removido com o auxílio de uma seringa e adicionado em um tubo

“eppendorf” com 100 μL de colesterol esterase 0,1 g L^{-1} , interagindo por 30 minutos a $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$. Colesterol estearase hidrolisa o colesterol ligado a lipoproteína de alta densidade (colesterol HDL) liberando-o para o plasma. Após este período, 60 μL de amostra de sangue artificial (Qualitrol 1H ou 2H) foram adicionados a cubeta espectrofotométrica com 30 μL da dispersão de Chox livre ou imobilizada sobre as partículas de PS/PEG/VC, 480 μL da solução de fenol ($3,0 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) com 4-aminoantipirina ($1,5 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) e 400 μL de tampão tris-HCl ($50 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$). O cromóforo (*p*-benzoquinona monoimino) fenazona ($\lambda_{\text{max}} = 516 \text{ nm}$) formado foi mensurado por espectrofotometria UV-vis em função do tempo. A concentração foi determinada considerando o coeficiente de extinção molar de $7870 \text{ L.mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Estes dados estão apresentados nas Figuras 14 e 15 (Resultados e Discussão, Capítulo I), respectivamente. Para fins práticos, a atividade enzimática da Chox imobilizada sobre as partículas de PS/PEG/VC foi investigada em soluções de sangue artificial com parâmetros níveis baixos (16a) e níveis altos de colesterol HDL(16b) em função da adição de concentrações previamente conhecidas de colesterol, sendo codificado como colesterol teórico A concentração de colesterol teórico para amostra inicial de colesterol nível baixo, Qualitrol 1H, variou de 49 mg dL^{-1} a 96 mg dL^{-1} . O mesmo foi feito com Qualitrol 2H, amostra nível alto de colesterol HDL, onde a concentração de colesterol teórico variou de 86 mg dL^{-1} a 120 mg dL^{-1} . Estes dados estão apresentados nas Figuras 16a e 16b (Resultados e Discussão, Capítulo I), respectivamente. A Figura 3 esquematiza as reações de formação do cromóforo (*p*-benzoquinona monoimino) fenazona.

Figura 3: Representação da oxidação do colesterol usando o oxigênio como acceptor de elétrons para formar colest-4-en-3-ona e H_2O_2 como produtos (a). Na presença de H_2O_2 como agente oxidante, HRP catalisa a reação entre 4-aminoantipirina e fenol, rendendo (p-benzoquinona monoimino) fenazona (b).

3.10 - Atividade catalítica da lipase livre e adsorvida sobre PS/PEG ou PS/PEG/VC:

Capítulo II

A atividade catalítica da lipase livre e imobilizada sobre as partículas de PS/PEG ou PS/PEG/VC foi determinada pela quantificação de *p*-nitrofenol (*p*-NF) formado, como resultado da hidrólise enzimática do *p*-nitrofenol butirato (*p*-NFB), como o indicado na Figura 4.

Figura 4: Representação esquemática da hidrólise do *p*-NPB catalisada pela lipase, rendendo ácido e (*p*-NP).

A formação do *p*-NF ($\lambda_{\text{máx}} = 340 \text{ nm}$) ocorreu em pH 7,0 a $(24 \pm 1)^\circ \text{C}$ e foi monitorado por espectrofotometria UV-Vis (Beckmann-Coulter DU 640) em função do tempo. A concentração do *p*-NF formado foi calculado usando o coeficiente de extinção molar $\epsilon = 13800 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (IACAZIO; PÉRISSOL; FAURE, 2000). Primeiro 25 μL de *p*-NFB ($M 209,2 \text{ g mol}^{-1}$, densidade $1,19 \text{ g cm}^{-3}$) foi dissolvido em 5,0 mL de isopropanol. Posteriormente, a solução de *p*-NFB foi adicionado 45 mL de Trisma-HCl 50 (pH 7,0, $50 \cdot 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$), rendendo uma solução estoque de $2,8 \cdot 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ de *p*-NFB. Os parâmetros cinéticos foram determinados no intervalo de concentração de *p*-NFB de $0,3 \cdot 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ a $2,8 \cdot 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ a 25°C . O volume e a concentração de cada reagente na cela espectrofotométrica foram os seguintes: 20 μL da dispersão contendo lipase imobilizada sobre PS/PEG ($Q_{\text{lipase}} = 85 \pm 3 \text{ nmol.mg}^{-1}$) ou PS/PEG/VC ($Q_{\text{lipase}} = 105 \pm 5 \text{ nmol.mg}^{-1}$), dando uma solução estoque de *p*-NFB para atingir a concentração desejado e finalmente adicionado com Trisma-HCl (pH 7,0, $50 \cdot 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$) até completar 1,0 mL.

A fim de comparar a eficiência catalítica entre a lipase livre e imobilizada, a concentração da lipase livre foi definida como $18 \mu\text{mol L}^{-1}$ porque corresponde ao mais alto Q_{lipase} para PS/PEG/VC. Assim, a concentração final de lipase livre ou lipase

imobilizada em partículas poliméricas na célula espectrofotométrica foi de $0,4 \mu\text{mol L}^{-1}$. As experiências de controle foram realizadas, onde as partículas de PS/PEG e PS/PEG/VC não funcionalizadas com lipase foram adicionados à reação enzimática e a formação do *p*-NP foi monitorizada por espectrofotometria de UV-Vis em função do tempo. De uma maneira semelhante, a atividade da lipase imobilizada sobre partículas PS/PEG ou PS/PEG/VC foi determinada a 25°C e 40°C , após sete reusos consecutivos ou após o armazenamento durante sete dias em ambiente de laboratório.

A estabilidade térmica das lipases livres e imobilizadas foi investigada através da monitoração da concentração de *p*-NP formada durante 20 minutos no intervalo de temperatura entre 25°C e 60°C . O volume e a concentração de cada reagente misturado na célula espectrofotométrica foram os mesmos.

3.11 - Avaliação da atividade enzimática da lipase na ausência e na presença de G ou GO: Capítulo III

A atividade catalítica da lipase na ausência e na presença de G ou GO foi determinada em pH 6,5 a $(24 \pm 1)^\circ\text{C}$ por meio da formação de *p*-NP resultante da hidrólise enzimática do *p*-NPB conforme Figura 4. A formação do *p*-NF ($\lambda_{\text{máx}} = 400 \text{ nm}$) foi monitorada espectrofotometricamente em função do tempo e sua concentração calculada usando o coeficiente de extinção molar de $\epsilon = 13800 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (IACAZIO; PÉRISSOL; FAURE, 2000). Primeiro $2,0 \mu\text{L}$ de *p*-NFB (M 209,2 g mol^{-1} , densidade $1,19 \text{ g cm}^{-3}$) foi dissolvido em 5,0 mL de isopropanol. Posteriormente, à solução de *p*-NFB foram adicionados 45 mL de Trisma-HCl 50 (pH 7,0, $50 \cdot 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$), rendendo uma solução estoque de $4,6 \cdot 10^{-5} \text{ mol.L}^{-1}$ de *p*-NFB. Para determinar os parâmetros cinéticos, a concentração de *p*-NFB variou de $5,0 \cdot 10^{-7} \text{ mol.L}^{-1}$

a $7,2 \cdot 10^{-6} \text{ mol.L}^{-1}$. Nesses ensaios enzimáticos, a concentração de lipase foi $0,010 \text{ g L}^{-1}$ ($1,67 \cdot 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$) e G ou GO foram $0,012 \text{ g L}^{-1}$. Todos os reagentes foram homogeneizados suavemente.

3.12 - Avaliação da atividade enzimática da Chox na ausência e na presença de G ou GO: Capítulo III

A atividade catalítica da Chox na ausência e na presença de G ou GO foi avaliada por meio de uma reação acoplada com a enzima HRP. Chox catalisa a oxidação do colesterol (colest-5en-3 β -ol) usando o oxigênio como aceptor de elétrons para formar colest-4-en-3-ona e H_2O_2 como produtos. Na presença de H_2O_2 , como agente oxidante, HRP catalisa a reação entre o 4-aminoantipirina e o phenol, rendendo (*p*-benzoquinona monoimino) phenazona ($\lambda_{\text{max}} = 516 \text{ nm}$), Figura 3. A formação do (*p*-benzoquinona monoimino) phenazona foi monitorado por espectrofotometria UV-Vis em função do tempo. A concentração foi determinada considerando o coeficiente de extinção molar de $7870 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$. Primeiro foi preparada uma solução estoque, sendo em 2 mL de 2-propanol grau analítico adicionado Triton (tensoativo Triton é uma marca da Union Carbide Corp.) para obter em um volume final de 100 mL de $0,24\text{mmol.L}^{-1}$ do tensoativo; e posteriormente completada com 98 mL de solução de tampão Tris-HCl ($50 \cdot 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$, pH 7,0). A concentração de Triton X-100 usada corresponde a sua concentração micelar crítica (MATEO et al., 2007) e foi escolhida por fornecer o melhor turnover (ciclo catalítico) (GUYÁDODSON, 1992). Na solução estoque tamponada foi preparada uma solução de fenol $3,0 \cdot 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ com 4-aminoantipirina $1,5 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$. O volume e a concentração de cada reagente na cela espectrofotométrica foram os seguintes: 30 μL de HRP $0,03 \text{ g.L}^{-1}$ ($6 \cdot 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$),

30 μL de ChOx $0,03 \text{ g.L}^{-1}$ ($6,4 \cdot 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$) e 300 μL de fenol $3,0 \cdot 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$ com 4-aminoantipirina $1,5 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$. A concentração de colesterol variou de $0,3 \text{ mol L}^{-1}$ a $1,6 \text{ mol L}^{-1}$. A concentração de G ou GO usados no ensaio enzimático foi mantidos constante em $0,012 \text{ g L}^{-1}$. A atividade enzimática da ChOx foi determinada na ausência e na presença de G ou GO.

3.13 - Avaliação dos efeitos de Bioconjugação: Capítulo I, II e III

Medidas de dicroísmo circular (DC) foram realizadas no equipamento Jasco J-720 espectropolarímetro (Jasco Easton, MD, USA), no comprimento de onda de 190 nm a 260 nm, a $(24 \pm 1)^\circ \text{C}$, usando uma cubeta de quartzo de 0,5 cm. Todos os espectros de DC foram coletados em pH 7 usando velocidade de varredura de 50 nm min^{-1} , tempo constante de 0,5 s e largura de banda de 1 nm. Oito varreduras foram acumuladas para cada amostra. Para os capítulos I e II, respectivamente, as amostras para DC foram preparadas com solução de Chox em $28,5 \mu\text{mol L}^{-1}$ na ausência e na presença de VC em concentração constante de $8,0 \mu\text{mol L}^{-1}$. No caso da lipase, as amostras para DC foram preparadas com no intervalo de concentração $3 \mu\text{mol.L}^{-1}$ a $33 \mu\text{mol L}^{-1}$.

Mudanças no espectro eletrônico do VC no intervalo visível foram monitorados pelo aumento da adição das enzimas nos respectivos capítulos I e II. A concentração de VC foi mantida constante em $8,0 \mu\text{mol L}^{-1}$, enquanto que a concentração das enzimas aumentou. No capítulo II a bioconjugação entre moléculas de VC e *p*-NFB foi avaliado pelo monitoramento da mudança no espectro de VC em $8,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ na presença de *p*-NFB no intervalo de concentração de $0,3 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ a $2,8 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$.

Para o capítulo III, misturas físicas de enzima (lipase ou Chox) e G ou GO foram preparadas em água MilliQ usando concentração de enzima constante em $1,0 \text{ g L}^{-1}$ e variando-se a concentração de G ou GO de $0,012 \text{ g L}^{-1}$ e $0,12 \text{ g L}^{-1}$. As misturas foram suavemente homogeneizadas durante cinco minutos. A fim de estimar a quantidade de bioconjugado e a enzima livre em misturas físicas, os sistemas foram centrifugados a 10.000 rpm , a 20° C , durante 30 minutos. Posteriormente o sobrenadante foi cuidadosamente separada a partir dos peletes formados na parte inferior. A quantidade de enzima livre no sobrenadante foi determinada por espectrofotometria a 280 nm , após a sua comparação com a solução de enzima pura a $1,0 \text{ g L}^{-1}$. A quantidade de enzima bioconjugada com G ou GO foi estimada pela diferença entre a concentração de enzima livre e da concentração original. A Tabela 1 mostra o conteúdo de bioconjugação estimado para cada sistema. Em geral, a baixa concentração de nanomaterial ($0,012 \text{ g L}^{-1}$ ou $0,025 \text{ g L}^{-1}$) conduziu a um aumento de rendimento de bioconjugação, provavelmente porque as nanopartículas de G ou GO tendem a agregar com o aumento da concentração. No caso de lipase, bioconjugação com G ou GO em $0,012 \text{ g L}^{-1}$ foi muito eficiente. Por outro lado, a bioconjugação entre moléculas Chox e G ou GO não foi eficiente. A melhor situação foi na presença de G a $0,012 \text{ g L}^{-1}$, em 50% de Chox ligado ao nanomaterial. Amostras para DC foram preparadas com soluções de enzimas (lipase e Chox) em $1,0 \text{ g L}^{-1}$ e G ou GO em concentrações de $0,012 \text{ g L}^{-1}$, $0,024 \text{ g L}^{-1}$ e $0,1 \text{ g L}^{-1}$. Em suma, misturas de enzimas em $0,25 \text{ g L}^{-1}$ e G ou GO em $0,25 \text{ g L}^{-1}$ foram analisados.

Tabela 1: Conteúdo de enzimas bioconjugadas determinados para misturas aquosas de lipase ou Chox a $1,0 \text{ g L}^{-1}$ com G ou GO por meio de medições espectrofotométricas

Enzima ($1,0 \text{ g L}^{-1}$)	G (g L^{-1})	GO (g L^{-1})	Bioconjugação (%)
Lipase	0,012	-	96 ± 1
	0,025	-	97 ± 1
	0,12	-	52 ± 2
	-	0,012	90 ± 2
	-	0,025	87 ± 1
	-	0,12	31 ± 2
ChOx	0,012	-	50 ± 1
	0,025	-	39 ± 2
	0,12	-	38 ± 2
	-	0,012	38 ± 2
	-	0,025	37 ± 1
	-	0,12	0

3.14 - Raman e espectroscopia de Fotoluminescência (FL): Capítulo III

Medidas de fotoluminescência foram realizadas com um feixe de laser de Ar^+ excitado em 514,5 nm em um equipamento Renishaw System 3000 spectrometer acoplado com um microscópio Olympus (BTH2) e equipado com um detector CCD, o qual permite uma rápida acumulação dos espectros Raman com uma resolução espacial de aproximadamente $1 \text{ }\mu\text{m}$ (micro-Raman technique). O feixe de laser foi focado na

amostra uma ampliação de 80×, cinco espectros de varredura foram adquiridos com 4 cm^{-1} de resolução. Soluções de enzimas em $1,0\text{ g L}^{-1}$ contendo G or GO em $0,012\text{ g L}^{-1}$, $0,024\text{ g L}^{-1}$ e $0,1\text{ g L}^{-1}$ de enzimas contendo $0,25\text{ g L}^{-1}$ and G or GO foram homogeneizados suavemente e posteriormente secos (35 ± 1) °C. As amostras foram analisadas em cinco diferentes pontos para verificar a homogeneidade da amostra. As medidas de fotoluminescência foram reprodutíveis em algumas regiões das amostras, com excessão de algumas intensidades absolutas devido a focalização do microscópio e da diferença de morfologia das amostras. Espectros Raman foram obtidos para G e GO em um equipamento Renishaw InVia Reflex, acoplado com um microscópio Leica DM 2500M, com um laser (He/Ne) de excitação de 632,8 nm e um detector CCD e ampliação de 100 vezes. Os experimentos foram realizados em temperatura ambiente usando geometria retroespalhada.

Capítulo I: Imobilização de colesterol oxidase sobre partículas poliméricas de PS/PEG/VC

4 - Resultados e Discussão

4.1 - Caracterizações das partículas de PS/PEG

A Figura 5a mostra uma típica imagem de MEV obtidas das partículas secas, onde observamos a presença de esferas grandes e pequenas. A distribuição de diâmetro médio das partículas determinados por DLS e MEV está apresentada na Figura 5b. Ambos os histogramas indicam uma distribuição bimodal de tamanho com predomínio de diâmetros de 120 nm e 480 nm.

Figure 5: (a) Micrografia eletrônica de varredura obtida para as partículas de PS/PEG secas em ar. 100 partículas foram usadas para a determinação do diâmetro das partículas. (b) Frequência normalizada do diâmetro de distribuição determinadas por MEV (barra azul) e DLS (vermelho).

Há duas possíveis razões para explicar a distribuição bimodal de tamanho de partículas:

- (i) No início as gotas de monômeros podem apresentar diferentes tamanhos. O processo de nucleação ocorre em gotas grandes e pequenas. Se as gotas grandes contêm mais oligorradicais, as mesmas crescerão mais rapidamente do que as gotas pequenas, gerando uma distribuição bimodal de tamanho (SAJJADI; BROOKS, 2000).
- (ii) Pode ser consequência do transporte limitado do monômero entre as partículas iniciais e as partículas que estão crescendo durante a polimerização, situação na qual a solubilidade do monômero na fase aquosa é muito baixa, como no caso do estireno (SAJJADI; JAHANZAD, 2003).

Os valores de diâmetro médio calculados por DLS e MEV foram (247 ± 4) nm e (240 ± 2) nm, respectivamente. Como esperado, o diâmetro médio obtido por DLS é ligeiramente maior do que o obtido por MEV devido à camada de hidratação da partícula polimérica. Dispersões sólidas da polimerização renderam (75 ± 2) g L⁻¹, taxa de conversão de (83 ± 2) % e densidade de partícula de $(1,1 \pm 0,1) 10^{13}$ partículas mL⁻¹, respectivamente.

Partículas de PS/PEG apresentaram potencial- ζ de $-(70 \pm 4)$ mV (Figura 7b). No processo de polimerização em emulsão, o iniciador permanece covalentemente ligado ao terminal da cadeia polimérica (GILBERT, 1995). Neste caso, o potencial- ζ de $-(70 \pm 4)$ mV é oriundo de grupos sulfatos decorrentes do iniciador da polimerização, persulfato de potássio. Para avaliar se o potencial- ζ negativo se deve somente a grupos sulfatos ou a uma possível oxidação dos oligômeros de etileno glicol, também presentes na superfície das partículas, espectros de FTIR das partículas secas foram obtidos, conforme a Figura 6.

Figura 6: Espectros FTIR obtidos para PS/PEG (linha preta), PS/PEG/VC (linha vermelha) e VC (linha azul).

Os espectros correspondentes às partículas de PS/PEG apresentam as seguintes bandas características: estiramentos C-H de anel aromático $3090\text{--}2993\text{ cm}^{-1}$ (m), estiramentos C-H de alifáticos (F), estiramentos de anel aromático 1595 cm^{-1} (m) e 1492 cm^{-1} (m), ligação C-H 1444 cm^{-1} (m), estiramento C-O $925\text{--}1133\text{ cm}^{-1}$ (f), ligação C-H de anel aromático 755 cm^{-1} e 689 cm^{-1} . As indicações (F), (m) e (f) correspondem a bandas de intensidade forte, média e fraca, respectivamente. O espectro correspondente às partículas de PS/PEG não apresentou bandas de carbonilas em 1715 cm^{-1} , indicando que os oligômeros de etileno glicol não sofreram oxidação e que a presença de grupos sulfatos nas partículas é responsável pela carga negativa na sua superfície. O potencial- ζ determinado para as partículas é consequência do grau de dissociação de grupos na interface, o qual depende da concentração de eletrólitos e pH do meio.

4.2 - Comportamentos de adsorção de Vermelho do Congo sobre as partículas de PS/PEG

A Figura 7a mostra a isoterma de adsorção obtida para o VC sobre as partículas de PS/PEG a (24 ± 1) °C em pH 7. A quantidade de VC (Q_{VC}) sobre as partículas aumentou até um máximo caracterizado por um plateau de adsorção, em $7,3 \mu\text{mol L}^{-1}$ de VC, e o valor de Q_{VC} corresponde a $(4,73 \pm 0,02) \mu\text{mol g}^{-1}$. A Figura 7b e 7c mostra que à medida que os valores de Q_{VC} aumentam, os valores de potencial- ζ tornam-se menos negativos e o diâmetro médio das partículas aumentam, respectivamente. A Figura 7d mostra que a polidispersidade (PD) foi constante em 0,197 (linha pontilhada) com o aumento dos valores de Q_{VC} , exceto para Q_{VC} de $(4,76 \pm 0,02) \mu\text{mol g}^{-1}$ (valor elevado), onde PD aumenta para $0,23 \pm 0,01$. Experimentos de dessorção indicaram redução de aproximadamente 5% nos valores de Q_{VC} , evidenciando elevada afinidade entre as moléculas de VC e a superfície das partículas de PS/PEG. Considerando que a adsorção ocorre em pH 7 e que o pK_b do VC é $4,6 \pm 0,2$ (KHAKH; MICHEL; HUMPHREY, 1994), a quantidade de grupos aminos de VC protonados são pequenos, porém deve ser suficiente para se ligar na superfície dos grupos sulfatos presentes na superfície da partícula e causar aumento dos valores de potencial- ζ de $-(70 \pm 4) \text{ mV}$ a $-(46 \pm 2) \text{ mV}$. Entretanto, a adsorção do corante com as partículas é possivelmente devida a ligações de hidrogênio entre VC e os oligômeros de PEG, favorecidos pelos grupos aminos não carregados. Após experimentos de dessorção, partículas de PS/PEG/VC foram liofilizadas e caracterizadas por espectroscopia vibracional de FTIR. Espectros de FTIR obtidos para as partículas de PS/PEG/VC apresentaram bandas características de PS/PEG e VC puro.

Figure 7: (a) Isotherma de adsorção obtida para VC sobre s partículas de PS/PEG em $(24 \pm 1) ^\circ\text{C}$ e pH 7,0. (b) Valores de potencial ζ , (c) Valores de diâmetro médio e (d) Polidispersidade em função da quantidade de VC adsorvido (Q_{vc}) sobre as partículas. As linhas pontilhadas são guias para os olhos. As barras de erro correspondem a valores médios de desvio padrão determinados em triplicata.

4.3 - Comportamentos da adsorção de Chox sobre partículas de PS/PEG/VC

A isoterma de adsorção de Chox sobre as partículas de PS/PEG/VC a $(24 \pm 1) ^\circ\text{C}$ em pH 7,0 está apresentado na Figura 8a. A quantidade de Chox adsorvida (Q_{chox}) aumenta linearmente com o aumento da concentração de Chox disponível. As amostras

no maior valor de Q_{Chox} , $(6,0 \pm 0,5) \mu\text{mol mg}^{-1}$, tiveram as dispersões centrifugadas, o sobrenadante descartado e as partículas redispersadas em água Milli-Q. O procedimento foi repetido 3 vezes e os valores de distribuição de tamanho e potencial- ζ foram analisados. Para efeito de comparação, as partículas de PS/PEG/VC também sofreram o mesmo procedimento. A Figura 8b e 8c mostra os histogramas de distribuição de tamanho correspondentes às partículas de PS/PEG/VC no valor do plateau de adsorção e PS/PEG/VC/Chox no maior valor de Q_{Chox} , respectivamente. Ambos os histogramas apresentaram distribuição bimodal de tamanho, com diâmetros médios de $(356 \pm 3) \text{ nm}$ e $(366 \pm 3) \text{ nm}$, respectivamente. A adsorção levou a um aumento no valor do diâmetro médio em aproximadamente 10 nm, os quais são consistentes com (i) a adsorção monocamada de Chox ou (ii) Chox agregada sobre a superfície das partículas. O valor do potencial- ζ médio determinado para PS/PEG/VC antes a adsorção de Chox foi $-(50 \pm 2) \text{ mV}$ e após a adsorção foi $-(49 \pm 1) \text{ mV}$. Uma possível explicação para esses resultados seriam que a Chox adsorve sobre a superfície de PS/PEG/VC por interações eletrostáticas, onde os resíduos de aminoácidos positivamente carregados da enzima interagem com os grupos sulfatos, compensando a blindagem pela exposição de resíduos de aminoácidos negativamente carregados para o meio. Como o pI da Chox é 4,7 (FUJISHIRO et al., 2002), em pH 7 ela está negativamente carregada, porém regiões da enzima com resíduos de aminoácidos positivamente carregados são capazes de se ligarem em superfícies negativamente carregadas. Dados reportados na literatura mostram que a albumina sérica bovina (BSA) se liga a poliânions não somente quando o pH está abaixo de seu pI, mas também quando está acima de seu pI (PANCERA; ITRI; PETRI, 2005; SILVA et al., 2010). Experimentos de dessorção indicaram redução de aproximadamente 7% nos valores de Q_{chox} , evidenciando alta afinidade entre

as partículas de PS/PEG/VC e a Chox. Para avaliar a estabilidade da Chox adsorvida, após medidas de DLS as partículas de PS/PEG/VC/Chox foram liofilizadas e redispersadas em água destilada para serem caracterizadas novamente. Comparando os histogramas de distribuição de tamanho nas Figuras 8c e 8d, conclui-se que apesar de ser mantida uma distribuição bimodal, a liofilização levou a um aumento da população de diâmetros médios maiores e, consequentemente, o diâmetro médio das partículas foi de (406 ± 3) nm. O processo de liofilização deve induzir a formação de dubletos e pequenos agregados, porém não há efeito significativo nos valores médios de potencial- ζ , o qual corresponde a $-(46 \pm 3)$ mV. Como experimento controle, a adsorção de Chox sobre as partículas de PS/PEG (na ausência de VC) foi investigada na concentração de Chox de $28,5 \mu\text{mol L}^{-1}$. A quantidade de Chox adsorvida (Q_{chox}) sobre as partículas de PS/PEG foi determinada com $(5,8 \pm 0,4) \mu\text{mol mg}^{-1}$, o qual é comparável com o observado sobre as partículas de PS/PEG/VC (Figura 8a). Os valores médios de diâmetro e potencial- ζ determinados para Chox adsorvida sobre as partículas de PS/PEG corresponderam a (360 ± 3) nm e $-(48 \pm 2)$ mV, respectivamente.

Figure 8: (a) Isoterma de adsorção da Chox sobre as partículas de PS/PEG/VC a $(24 \pm 1) ^\circ\text{C}$ e pH 7,0. Histogramas de distribuição de tamanho (b) partículas de PS/PEG/VC no plateau de adsorção, partículas de PS/PEG/VC/Chox no valor de Q_{ChOx} de $(6,0 \pm 0,5) \mu\text{mol mg}^{-1}$ (c) antes e (d) após a liofilização.

4.4 - Atividades enzimáticas da Chox livre e adsorvida

A atividade enzimática da Chox livre e adsorvida sobre as partículas poliméricas foi monitorada pela formação do ABTS^{++} em função do tempo, como mostrado na Figura 9. Para a Chox adsorvida sobre as partículas de PS/PEG ou PS/PEG/VC, os respectivos valores de Q_{chox} empregados foram $(5,8 \pm 0,4) \mu\text{mol mg}^{-1}$ e $(6,0 \pm 0,5) \mu\text{mol mg}^{-1}$. Para a determinação da atividade enzimática da Chox livre, a concentração foi de $28,5 \mu\text{mol L}^{-1}$, concentração correspondente aos valores de Q_{chox} supracitados. Para estes experimentos a concentração de colesterol foi de 100 mg dL^{-1} . A atividade enzimática da Chox livre (linha vermelha) decaiu em função do tempo, sendo que em 1h seu valor era 75% do nível inicial. Para efeito de comparação, a atividade da Chox livre foi determinada na presença de $8,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ de VC (linha azul). Neste caso, o máximo de atividade foi observado após 10 minutos, o qual era 40% do nível de

atividade observado para a Chox livre na ausência de VC. Similarmente à Chox livre, o nível de atividade da Chox na presença do VC decaiu continuamente em função do tempo. O decréscimo da concentração do ABTS^{*+} no estágio posterior da reação deve ser devido à desativação da Chox ou HRP ou ambas. Conforme o protocolo experimental (www.sigma-aldrich.com.br) é sugerido o uso da Chox imediatamente após a dissolução devido a sua baixa estabilidade.

Figura 9: Formação do ABTS^{*+} catalisada pela reação acoplada do HRP e Chox em função do tempo, pH e temperatura foram 6,5 e $(24 \pm 1) ^\circ\text{C}$ e a concentração do colesterol foi de 100 mg dL^{-1} . Linha vermelha, linha azul, linha preta e linha verde para a atividade de Chox livre ($28,5 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$), Chox livre ($28,5 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$) na presença de VC ($8,0 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$), Chox imobilizada sobre partículas PS/PEG/VC e Chox imobilizada sobre partículas de PS/PEG/VC liofilizadas, respectivamente.

Para avaliar uma possível mudança na estrutura secundária da Chox na presença de VC, espectros de dicroísmo circular (DC) foram obtidos para Chox (em $28,5 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$) na ausência e na presença de VC, como mostrado na Figura 10.

Figura 10: Espectros de dicroísmo circular determinados para Chox pura em $28,5 \mu\text{mol L}^{-1}$ (linha vermelha), VC puro em $8,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ (linha preta), mistura de Chox e VC em $r = 6,3$ (linha verde) e $r = 3,6$ (linha azul).

Como esperado, VC não apresentou sinal no intervalo de 190 nm a 700 nm. Espectros de DC determinados para a Chox pura apresentaram características típicas de conformações α -hélice com mínimo em 208 nm e 220 nm. As misturas de Chox em $28,5 \mu\text{mol L}^{-1}$ e VC em $4,5 \mu\text{mol L}^{-1}$, razões molares r ($r = [\text{Chox}]/[\text{VC}]$) $\sim 6,3$, também apresentaram características típicas α -hélice com mínimo em 210 nm e 220 nm. Entretanto, o aumento da concentração de VC para $8 \mu\text{mol L}^{-1}$ ou decréscimo de r para 3,6 causou o aparecimento de um mínimo intenso em 222 nm, indicando mudanças de α -hélice para uma conformação aleatória. Essas mudanças indicam efeitos de bioconjugação (KWON; ITO, 2001) e que na concentração crítica de VC as interações entre o corante e a Chox ocorrem, indicando desnaturação. Sob condições específicas a ligação de VC com proteínas devem causar transições conformacionais. Por exemplo, em pH 11 a ligação de VC com poli (L-lisina) induzem a mudanças conformacionais de α -hélice para β -folha pregueada (PIGORSCH; ELHADDAOUI; TURRELL, 1995).

Mudanças estruturais do VC devido à interação com a Chox não pode ser detectada por DC. A interação entre VC e Chox foi monitorada por mudanças no espectro eletrônico do VC no intervalo visível pelo aumento de Chox adicionada. A Figura 11 mostra os espectros eletrônicos obtidos para VC pura, Chox pura e mistura de VC e Chox em diferentes valores de r ($r = [\text{Chox}]/[\text{VC}]$). A concentração de VC foi mantida constante em $20,0 \mu\text{mol L}^{-1}$, enquanto que a concentração de Chox aumentou de $15,6 \mu\text{mol L}^{-1}$ para $78,8 \mu\text{mol L}^{-1}$. VC puro apresentou duas transições $\pi \rightarrow \pi^*$, uma em 497 nm (mais forte) e outra em 350 nm (não mostrada), e transição de baixa intensidade $n \rightarrow \pi^*$ associada ao grupamento azo (FABIAN; HARTMANN, 1980). À medida que Chox foi adicionada ao sistema ocorreu um deslocamento do máximo de absorção para o azul (efeito hipsocrômico). Na maior concentração de Chox ($78,1 \mu\text{mol L}^{-1}$) ou $r = 3,9$, a mudança foi de aproximadamente 16 nm. Este efeito foi observado em valor de r similar para aquele onde à transição de α -hélice para conformações aleatórias (Figura 10). De certo modo o efeito hipsocrômico é geralmente devido ao aumento da polaridade do meio. O deslocamento para o azul observado na Figura 11 deve indicar formação de ligações de hidrogênio entre os grupos aminos e os resíduos polares da Chox. Como controle experimental, espectro de adsorção também foi obtido para Chox pura ($[\text{Chox}] = 15,6 \mu\text{mol L}^{-1}$), o qual indicou absorção negligenciável em 497 nm.

Figura 11: Espectro eletrônico obtido para VC puro (linha preta), Chox pura (linha vermelha) e mistura de VC e Chox. A concentração de VC foi mantida constante em $8,0 \mu\text{mol L}^{-1}$, enquanto que as concentrações de Chox foram de $15,6 \mu\text{mol L}^{-1}$ ($r = 0,78$, linha azul), $31,3 \mu\text{mol L}^{-1}$ ($r = 1,56$, linha rosa), $46,9 \mu\text{mol L}^{-1}$ ($r = 2,35$, linha verde), $62,6 \mu\text{mol L}^{-1}$ ($r = 3,13$, linha vinho) e $78,1 \mu\text{mol L}^{-1}$ ($r = 3,91$, linha laranja).

A estrutura cristalina da Chox revelou que a enzima possui dois loops, compreendendo os resíduos de aminoácidos 78-87 e os resíduos 433-436, correspondendo a uma tampa onde se localiza o sítio ativo que facilita a ligação do substrato (COULOMBE et al., 2001). Ao interagir com o substrato, esses loops se abrem, formando um canal hidrofóbico entre a membrana e o sítio ativo da proteína, e desta forma sequestrando o colesterol do meio aquoso. O modelo cristalográfico da enzima sugere que o aminoácido responsável pelo mecanismo de oxidação e isomerização é His 447, sendo que a todo o processo ocorre numa cavidade de $11\text{\AA}$ (KASS; SAMPSON, 1998). Um mecanismo químico razoável requer que a His 447 atue como base removendo o próton do 3-hidroxila durante a oxidação (KASS; SAMPSON, 1998). O íon imidazol formado age como um ácido durante a

isomerização, estabilizando o dienolato formado, a Glu 361 abstrai o 4 β -próton, e a Flavina Adenina Dinucleotídeo (FAD) completa o processo através de um meio eletrostático com potencial de redução suficiente para formar o produto (VRIELINK; GHISLA, 2009). A Ligação do VC em $r \approx 3,9$ provavelmente desestabiliza a abertura da tampa, reduzindo a atividade enzimática.

Nenhuma atividade pode ser observada para a Chox adsorvida sobre as partículas de PS/PEG (na ausência de VC). Por outro lado, a atividade enzimática de Chox adsorvida sobre as partículas de PS/PEG/VC (linha preta) aumentou em função do tempo, conforme apresentado na Figura 9. A atividade enzimática da Chox adsorvida sobre as partículas de PS/PEG/VC foi aproximadamente à metade da observada para a Chox livre após uma hora. A estabilidade do arranjo multicomponente foi avaliada pela liofilização da Chox imobilizada sobre as partículas de PS/PEG/VC seguida pelo teste enzimático. As partículas liofilizadas mantiveram aproximadamente 90 % da atividade enzimática original (Figura 9, linha verde) mesmo após um mês estocado a temperatura ambiente. Para propósitos práticos este é um resultado interessante porque significa que elas podem ser estocadas em temperatura ambiente ou transportadas para serem utilizadas mais tarde, evitando o inconveniente da desnaturação da enzima, o qual é comumente observado em soluções de Chox (liofilizadas ou não). Estes resultados geram as seguintes perguntas? Porque a Chox imobilizada sobre PS/PEG não apresenta nenhuma atividade enzimática em detrimento à Chox imobilizada sobre PS/PEG/VC? As mudanças estruturais observadas na Figura 10 indicam efeito de conjugação entre VC e Chox. Efeitos de conjugação direcionam a adsorção da Chox sobre as partículas de PS/PEG/VC. Quando comparadas à adsorção direta sobre as partículas de PS/PEG, as moléculas de Chox devem possivelmente adotar uma conformação diferente, a qual é

crucial para a atividade enzimática. Espectros eletrônicos e de DC foram extraídos para as dispersões de Chox sobre as partículas de PS/PEG e PS/PEG/VC como tentativas de acessar o estado conformacional da Chox em cada situação. Entretanto, a intensidade da luz espalhada era tão alta que encobria possíveis sinais espectrais. Controles experimentais de atividade enzimática foram realizados para as partículas de PS/PEG e PS/PEG/VC na ausência de Chox. A formação de ABTS^{*+} não pôde ser detectada em $\lambda = 414 \text{ nm}$ em função do tempo, indicando que H_2O_2 não foi produzida na ausência da enzima.

A eficiência catalítica da enzima é afetada pela associação da Chox com o suporte bem como pela solubilidade do colesterol nas micelas de Triton/isopropanol. Estudos cinéticos indicaram que a velocidade de dessorção de colesterol das micelas é aproximadamente cinco ordens de grandeza menor que a velocidade do ciclo catalítico da Chox mensurada em diversas membranas (KREIT; SAMPSON, 2009). Portanto, não se espera que a enzima capture colesterol livre em solução. Em vez disso, é esperado que a Chox se ligue ao colesterol na interface da micela. A espessura da camada polar de PEG que está presente nas partículas é de aproximadamente $8,5 \text{ \AA}$ (BLACHECHEN et al., 2012) e confere uma camada de hidratação (BONFA et al., 2011) que pode dificultar a formação do complexo enzima-substrato. Em suma, a conjugação da Chox com VC na superfície das partículas devem criar um ambiente favorável para a formação do complexo enzima-substrato. Para avaliar esta hipótese, espectros eletrônicos foram obtidos para o colesterol, o qual foi dissolvido em Triton X-100 ($0,24 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$), 98 mL de água e 2 mL de isopropanol, e misturado com VC nas razões molares x ($x = [\text{colesterol}]/[\text{VC}]$) que variam de 2,2 a 34,8. A Figura 12 mostra que o colesterol adicionado à solução de VC causa um

deslocamento no máximo de absorção em direção ao vermelho (efeito batocrômico). Em valores elevados de x , o deslocamento do máximo de absorbância foi de 15 nm. Deslocamento batocrômico geralmente é causado por efeitos de conjugação, como por exemplo, devido a interações de elétrons- π decorrentes do colesterol e do VC. A ligação do colesterol com a Chox adsorvida sobre as partículas de PS/PEG/VC é possivelmente favorecida por transferência de elétrons- π entre o anel aromático do VC e a ligação dupla do colesterol. Fortes associações entre as moléculas de VC e as macromoléculas devem causar o efeito batocrômico. Por exemplo, formações de agregados entre proteínas príons e VC geram um deslocamento do máximo de absorbância de 31 nm (STÖCKEL; HARTL, 2001), a ligação do VC com fibras de celulose causou um deslocamento do máximo de absorbância de aproximadamente 20 nm (YAMAKI et al., 2005). Outra possível explicação seria as diferentes orientações do sítio ativo da Chox e do cofator FAD adsorvido sobre as partículas de PS/PEG e PS/PEG/VC, sendo que no primeiro eles devem estar expostos para a partícula, enquanto que no último eles devem estar expostos para o meio.

Figura 12: Espectro eletrônico obtido para VC puro $23 \mu\text{mol L}^{-1}$ (linha negra), colesterol puro $200 \mu\text{mol L}^{-1}$ (linha vermelha) e misturas de VC e colesterol. Linha azul, rosa verde, laranja e vinho são representações para $x = 2,17$, $x = 4,8$, $x = 8,7$, $x = 16,9$ e $x = 34,8$, respectivamente.

Para propósitos práticos, a atividade enzimática da Chox imobilizada sobre as partículas de PS/PEG/VC foi investigada em soluções de colesterol com concentração na faixa de 100 mg dL^{-1} a 300 mg dL^{-1} , como mostrado na Figura 13. Estes dados experimentais foram obtidos *in vitro* e representam valores de colesterol total, o qual seria a soma das concentrações do colesterol HDL, colesterol LDL e do colesterol VLDL em amostras reais hipotéticas (STEFANICK et al., 1998). Como se pode observar na Figura 13, os dados experimentais puderam ser ajustados com uma regressão linear ($y = 0,0579 \pm 0,0004x$, $R^2 = 0,9887$). As respostas enzimáticas das partículas estocadas e liofilizadas desviaram aproximadamente 8% das partículas recém-preparadas. As linhas tracejadas na Figura 13 representam a fronteira para elevado risco em nível alto de colesterol total, $> 240 \text{ mg dL}^{-1}$, e $< 200 \text{ mg dL}^{-1}$ corresponde ao nível desejado.

Figura 13: Formação do ABTS^{•+} catalisada pela Chox imobilizada sobre PS/PEG/VC em função da concentração do colesterol numa reação acoplada com HRP, pH e temperatura foram mantidos constantes em 6,5 e (24 ± 1) °C em um tempo reacional de duas horas. A regressão linear rendeu $y = 0,0579 \pm 0,0004 x$ e $R^2 = 0,9887$. As linhas tracejadas representam a fronteira para elevado risco em nível alto de colesterol, por exemplo, $> 240 \text{ mg dL}^{-1}$ corresponde a elevado risco e $< 200 \text{ mg dL}^{-1}$ corresponde ao nível desejado.

4.5 - Ensaio com sangue artificial nível alto e nível baixo de colesterol HDL

Inúmeras enfermidades, tais como arteriosclerose, acidente vascular cerebral (AVC), doença arterial coronariana (DAC), infarto do miocárdio, etc., estão diretamente relacionadas às alterações do metabolismo de lipoproteínas (SANTOS et al., 2013). As lipoproteínas são partículas globulares de alta massa molar que transportam as triglicérides e o colesterol ingeridos diariamente (DIAZ et al., 2006). Existem cinco classes principais de lipoproteínas ligadas ao colesterol: quilomícrons, a lipoproteína de densidade muito baixa (VLDLC), a lipoproteína de densidade intermédia (IDL), a lipoproteína de baixa densidade (LDL) e a lipoproteína de alta densidade (HDL). As

diferenças entre elas são composição da apoproteína, densidade, tamanho e mobilidade eletroforética (SACKS et al., 2000). As alterações no metabolismo lipoproteico são expressas pelo desbalanceamento dos níveis de colesterol LDL e HDL, onde se observa o aumento dos níveis séricos de colesterol LDL, referido como “mau colesterol”, e a diminuição dos níveis séricos de colesterol HDL, referido como “bom colesterol” (DESPRÉS; GOLAY; SJÖSTRÖM, 2005). Níveis elevados de colesterol LDL induzem ao depósito de partículas desta lipoproteína na túnica média das artérias de calibre médios e grandes, tais como aorta, artérias pulmonares e as denominadas artérias musculares, formando lesões e placas, as quais começam a estreitar os vasos sanguíneos que progridem insidiosamente ao longo de muitas décadas antes de causar manifestações clínicas (LIMA, 2007). Normalmente, as placas desenvolvem-se em determinados pontos concretos dessas artérias, onde o fluxo sanguíneo, por razões anatômicas, é particularmente mais turbulento, como acontece nas zonas mais curvas e nas bifurcações (RIDKER et al., 2002). O processo pode afetar qualquer uma das artérias, podendo afetar várias de uma só vez; no entanto, as manifestações e complicações são mais frequentes e importantes quando afeta a aorta e as artérias que irrigam os órgãos vitais, ou seja, o cérebro, o coração e os rins ou as artérias abdominais (RIDKER et al., 2002). Diante disso, pacientes com predisposição merecem maior atenção e investigação no intuito de se obter um diagnóstico menos invasivo, mais seguro e precoce, já que 52% dos indivíduos assintomáticos sofrem infarto agudo do miocárdio, dentre outras consequências (WAUGH et al., 2006). Nível ideal de colesterol LDL é menor que 160 mg dL^{-1} enquanto que o colesterol HDL é acima de 40 mg dL^{-1} (SPOSITO et al., 2007). Entretanto, a redução dos níveis séricos do colesterol LDL pode não ser suficiente no prognóstico de redução de risco de

desenvolvimento de doenças ligadas a hipercolesterolemia. No entanto, níveis elevados de colesterol HDL possui um efeito benéfico contrário, atuando como protagonista na remoção das placas de colesterol LDL formado nos vasos, levando-os ao fígado, onde são metabolizados (STEFANICK et al., 1998). Quanto maior o nível de HDL, menos “colesterol ruim” estará presente no sangue (STEFANICK et al., 1998). Profissionais das ciências da saúde consideram que os níveis de colesterol HDL devem ser considerados como alvos terapêuticos independente da redução dos níveis de colesterol LDL (SCHULZ, 2006). Por isso a determinação dos níveis de Colesterol HDL juntamente com o Colesterol total e o Colesterol LDL no soro é sempre solicitada para avaliar o fator de risco de uma pessoa desenvolver enfermidades devido à dislipidemia.

A partir destas informações pode-se afirmar que o estudo sistemático do uso das partículas de PS/PEG/VC/Chox na dosagem de colesterol em padrões que mimetizam amostras de sangue reais são de suma importância na avaliação da eficiência em possíveis análises laboratoriais rotineiras. Portanto, para avaliar o potencial de aplicação do sistema PS/PEG/VC/Chox em análises clínicas de amostras reais, dosou-se o colesterol HDL sérico presente no sangue artificial com padrões nível baixo e nível alto de colesterol HDL. A concentração tabelada de colesterol HDL presente no sangue artificial com padrões nível baixo e nível de alto de HDL serviram como modelo de análise nos ensaios realizados. A Figura 14 apresenta o logaritmo da concentração do cromóforo (*p*-benzoquinona monoimino) fenazona em função do tempo de reação catalisada pela Chox livre e imobilizada num ensaio realizado com sangue artificial com parâmetros clínicos considerados nível baixo de colesterol HDL. Os resultados obtidos são interessantes, pois os valores da dosagem de colesterol HDL sérico determinados pela enzima livre e imobilizada são extremamente próximos ao valor de colesterol HDL

presente no sangue artificial (dado obtido pelo fornecedor). A concentração do colesterol HDL tabelado pelo fornecedor foi $1,27 \cdot 10^{-3} \text{ mol. L}^{-1}$ (49 mg dL^{-1}), enquanto que a concentração determinada para Chox livre e imobilizada sobre as partículas de PS/PEG/VC foram $1,26 \cdot 10^{-3} \text{ mol. L}^{-1}$ (48 mg dL^{-1}) e $1,24 \cdot 10^{-3} \text{ mol. L}^{-1}$ (48 mg dL^{-1}), respectivamente. O tempo reacional utilizado nos cálculos foi de 1200 segundos.

Figura 14: $\ln [(p\text{-benzoquinona monoimino) fenazona}]$ catalisada pela Chox livre (quadrado azul) e imobilizada sobre as partículas de PS/PEG/VC (círculo vermelho) em função do tempo numa reação acoplada com HRP, pH e temperatura foram mantidos constantes em 6,5 e $(37 \pm 1) ^\circ\text{C}$ em um tempo reacional de uma hora. Os pontos experimentais foram ajustados com a regressão exponencial $\ln y = A_1 \cdot \exp. (-x/t_1) + y_0$, com valores de $A_1 = -3,35542$, $t_1 = 241,29665$, $y_0 = 3,84103$ e $R^2 = 0,98257$ para Chox livre e $A_1 = -4,93091$, $t_1 = 179,31258$, $y_0 = 3,80863$ e $R^2 = 0,96919$ para Chox imobilizada. Este ensaio foi realizado com o sangue artificial com padrões nível baixo de HDL.

Para avaliar a eficiência do sistema PS/PEG/VC/Chox na dosagem de colesterol HDL sérico, realizou-se sob as mesmas condições experimentais o ensaio com sangue

artificial com parâmetros altos de colesterol HDL. A Figura 15 mostra o logaritmo da concentração do cromóforo (*p*-benzoquinona monoimino) fenazona em função do tempo catalisada pela Chox livre e imobilizada num ensaio realizado com sangue artificial com parâmetros clínicos considerados nível alto de HDL.

Figura 15: $\ln [(p\text{-benzoquinona monoimino) fenazona}]$ catalisada pela Chox livre (quadrado azul) e imobilizada sobre as partículas de PS/PEG/VC (círculo vermelho) em função do tempo numa reação acoplada com HRP, pH e temperatura foram mantidos constantes em 6,5 e $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ em um tempo reacional de 20 minutos. Os pontos experimentais foram ajustados com a regressão exponencial $\ln y = A_1 \cdot \exp. (-x/t_1) + y_0$, com valores de $A_1 = -5,67752$, $t_1 = 238,93025$, $y_0 = 4,47079$ e $R^2 = 0,98479$ para Chox livre e $A_1 = -4,73127$, $t_1 = 237,85810$, $y_0 = 4,41344$ e $R^2 = 0,97445$ para Chox imobilizada. Este ensaio foi realizado com o sangue artificial com padrões níveis altos de colesterol HDL.

Pode-se observar na Figura 15 o logaritmo da concentração do cromóforo (*p*-benzoquinona monoimino) fenazona em função do tempo catalisada pela Chox livre e imobilizada num ensaio realizado com sangue artificial com parâmetros clínicos

considerados nível alto de colesterol HDL. Os resultados obtidos são interessantes, pois os valores da dosagem de colesterol HDL sérico determinados pela enzima livre e imobilizada são extremamente próximos ao valor de colesterol HDL presente no sangue artificial padrões nível alto de colesterol HDL (dado obtido pelo fornecedor). A concentração do colesterol HDL tabelado pelo fornecedor foi $2,11 \cdot 10^{-3} \text{ mol. L}^{-1}$ (81 mg dL^{-1}), enquanto que a concentração determinada para Chox livre e imobilizada sobre as partículas de PS/PEG/VC foram $2,33 \cdot 10^{-3} \text{ mol. L}^{-1}$ (90 mg dL^{-1}) e $2,22 \cdot 10^{-3} \text{ mol. L}^{-1}$ (86 mg dL^{-1}), respectivamente. O tempo reacional utilizado nos cálculos foi de 1200 segundos.

Para finalidades funcionais, a atividade enzimática da Chox imobilizada sobre as partículas de PS/PEG/VC foi investigada em soluções de sangue artificial com parâmetros nível baixo (16a) e nível alto (16b) de colesterol HDL em função da concentração previamente conhecida de colesterol. Estes resultados descrevem os experimentos com sangue artificial com padrões nível baixo e alto de colesterol HDL sob as mesmas condições experimentais para a determinação do colesterol HDL. Ratifica-se que o colesterol HDL obtido no processo de centrifugação é hidrolisado pela enzima colesterol esterase liberando ácido graxo e colesterol no plasma, conforme a seção experimental 3.9. Os dados observados para as Figuras 16a e 16b mostram que a concentração do colesterol dosado (colesterol medido) segue uma relação linear em função da concentração previamente conhecida de colesterol (colesterol teórico), mostrando a potencialidade do uso da Chox imobilizada sobre as partículas de PS/PEG/VC em rotinas laboratoriais na dosagem do colesterol HDL séricos. Estes resultados são muito interessantes, pois a Chox recoberta sobre as partículas de PS/PEG/VC é de fácil preparação e baixo custo e podem ser estocadas sob nenhuma

condição especial. Além disso, as enzimas imobilizadas sobre as nanopartículas apresentaram atividade enzimática por até três meses quando estocadas sob temperatura de 4°C.

Figura 16: Colesterol mensurado em amostras de sangue artificial pela Chox imobilizada sobre partículas de PS/PEG/VC em função da concentração de colesterol teórico. A concentração de colesterol foi mensurada através da formação de [(*p*-benzoquinona monoimino) fenazona catalisada pela Chox imobilizada numa reação acoplada com HRP, pH e temperatura foram mantidos constantes em 6,5 e $(37 \pm 1) ^\circ\text{C}$ em um tempo reacional de 20 minutos. **(a)** Amostras de sangue artificial com parâmetro nível baixo de HDL; os dados experimentais foram ajustados para a regressão linear $y = -4,4252 + 1,02813x$ e $R = 0,9746$ e **(b)** amostras de sangue artificial com parâmetro nível alto de HDL; os dados experimentais foram ajustados para a regressão linear $y = -13,9 + 1,09384x$ e $R = 0,9571$. As barras de erro correspondem a valores médios de desvio padrão determinados em triplicata.

4.6 – Conclusões Parciais

No capítulo I preparamos nanopartículas poliméricas decoradas com PEG recobertas com uma camada de VC para a imobilização da Chox. Apesar da Chox adsorver sobre ambas as superfícies, a enzima apresentou atividade somente quando imobilizada sobre superfície recobertas com VC. As razões para isso seriam possivelmente (i) orientação favorável do sítio ativo da Chox imobilizada sobre as partículas de PS/PEG/VC para o meio reacional devido a efeitos de bioconjugação entre VC e a Chox e (ii) efeitos de conjugação entre VC e o colesterol (substrato). Comparando a atividade enzimática em função do tempo da Chox livre e imobilizada sobre as partículas de PS/PEG/VC, após 1 h de reação foi observado para a Chox imobilizada um aumento da formação do ABTS^{*+} com o tempo, sendo aproximadamente a metade do que foi determinado para o primeiro, o qual decaiu com o tempo. Chox imobilizada sobre as partículas de PS/PEG/VC liofilizadas apresentaram atividade enzimática comparável com a enzima adsorvida sobre a mesma superfície recém-preparada, apresentando resposta linear para a concentração de colesterol no intervalo de 100 mg dL^{-1} (limite de concentração sérica abaixo do normal) a 300 mg dL^{-1} (nível de alto risco). Do ponto de vista prático, este trabalho demonstrou que os efeitos de conjugação com o VC permitem estocar a Chox imobilizada sob condições ambientais por mais de um mês (no mínimo) sem perda da eficiência catalítica. Com relação à dosagem de colesterol HDL sérico em sangue artificial com nível baixo e alto de colesterol HDL, Chox imobilizada sobre as partículas de PS/PEG/VC apresentou atividade enzimática comparável com a enzima livre. Entretanto, as partículas de PS/PEG/VC/Chox liofilizadas não apresentaram a eficiência esperada na dosagem do colesterol HDL presente no sangue artificial, devido à agregação das partículas, que

causou espalhamento de luz durante as medidas espectrofotométricas. Chox imobilizada sobre PS/PEG/VC apresentou resposta linear para a concentração de colesterol no intervalo de 49 mg dL^{-1} a 96 mg dL^{-1} para sangue artificial nível baixo de HDL, sendo o mesmo observado no intervalo de 86 mg dL^{-1} a 120 mg dL^{-1} para sangue artificial nível alto de HDL.

Capítulo II: Imobilização de lipase sobre partículas de PS/PEG ou sobre partículas PS/PEG/VC

5 - Resultados e Discussão

5.1 – Caracterizações das nanopartículas

Dispersões poliméricas de PS/PEG e PS/PEG/VC apresentaram distribuição bimodal de tamanho conforme os histogramas de distribuição de tamanho mostrados nas Figuras 17a e 17b, respectivamente. A tabela 2 apresenta os valores determinados em triplicata para os valores médios de diâmetro (D), polidispersidade (PD) e potencial- ζ das partículas de PS/PEG e PS/PEG/VC. Os valores médios de D determinados por DLS corroboram com os tamanhos típicos de partículas observados por microscopia eletrônica de varredura (MEV) (Figuras inseridas 17a e 17b). A preparação das partículas de PS/PEG/VC segue o procedimento descrito na seção experimental 3.2 da Parte A, com plateau de adsorção de VC sobre PS/PEG correspondendo a $5,0 \pm 0,2 \mu\text{mol g}^{-1}$ (SILVA; CARMONA-RIBEIRO; PETRI, 2013). Após a adsorção de VC os diâmetros médios das partículas não aumentaram significativamente, porém os valores de PD aumentaram 20%. A Figura 17b mostra um pequeno aumento na contribuição de partículas com $D \approx 100 \text{ nm}$, os quais devem ser devido a uma agregação parcial induzida pela adsorção de VC.

O potencial- ζ de $-(50 \pm 5) \text{ mV}$ observado para as partículas é consequência da presença de grupos sulfatos (iniciador de polimerização) na superfície das partículas. Após a adsorção de VC o potencial- ζ mudou para $-(36 \pm 5) \text{ mV}$. Interações entre os grupos aminos parcialmente protonados do VC e os grupos sulfatos ou oligômeros de

etileno glicol nas partículas de PS/PEG direcionam a adsorção do corante sobre a superfície da partícula polimérica, causando redução nos valores do potencial- ζ .

Figura 17: Histogramas de distribuição de tamanho das nanopartículas determinados a partir de medidas de espalhamento de luz dinâmico para (a) partículas de PS/PEG e (b) partículas de PS/PEG/VC. As Figuras inseridas nos histogramas correspondem às imagens de MEV obtidas das dispersões secas.

Tabela 2: Valores de diâmetros médios (D), polidispersidade (PD) e potencial- ζ determinados para as partículas de PS/PEG e PS/PEG/VC antes e após a adsorção da lipase em (a) $Q_{\text{lipase}} = (85 \pm 3) \text{ nmol mg}^{-1}$ e (b) $Q_{\text{lipase}} = (105 \pm 5) \text{ nmol mg}^{-1}$.

	D (nm)	ζ (mV)	PD
PS/PEG	286 ± 15	$-(50 \pm 5)$	$0,17 \pm 0,01$
PS/PEG/VC	290 ± 19	$-(36 \pm 5)$	$0,21 \pm 0,02$
PS/PEG/lipase ^(a)	380 ± 20	$-(32 \pm 4)$	$0,20 \pm 0,03$
PS/PEG/VC/lipase ^(b)	405 ± 11	$-(25 \pm 2)$	$0,27 \pm 0,05$

Para efeito de comparação a síntese das partículas foi feita usando com o iniciador $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$, porém ao invés de Tween-20® como emulsificante, foi empregado o

dodecilsulfato de sódio (SDS); sendo estas partículas codificadas como PSS. As partículas apresentaram valores de diâmetro médio de (342 ± 20) nm e potencial- ζ de $-(64 \pm 2)$ mV. As partículas de PSS e PS/PEG continuaram com cargas negativas devido ao grupo sulfato em suas superfícies, mas somente as partículas de PS/PEG estão decoradas com oligômeros de polietileno glicol. Experimentos de adsorção de VC sobre partículas de PSS foram realizadas nas mesmas condições que o realizado para a adsorção de VC sobre as partículas de PS/PEG. Entretanto, a quantidade de VC adsorvida sobre PSS foi somente 5% do adsorvido sobre as partículas de PS/PEG. A principal razão para isto é a repulsão eletrostática entre os grupos sulfatos das partículas de PSS e grupos sulfatos do VC. Estes resultados mostra o papel crucial exercido pelos oligômeros de etileno glicol na adsorção de VC na superfície das partículas de PS/PEG. O uso de um surfactante catiônico, brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB), para a síntese das partículas de PS deixou a dispersão coloidal instável e com agregação parcial antes dos experimentos de adsorção do VC. Isto se deve possivelmente ao efeito de blindagem das cargas negativas superficiais dos grupos sulfatos do iniciador radicalar pelas cabeças catiônicas do CTAB durante o processo de polimerização em emulsão, o qual causa instabilidade na dispersão coloidal porque reduz o potencial eletrostático repulsivo das partículas.

5.2 - Comportamento da adsorção da lipase sobre partículas de PS/PEG ou PS/PEG/VC

A isoterma de adsorção da lipase sobre as partículas de PS/PEG ou PS/PEG/VC foi realizada a (24 ± 1) °C em pH 7, conforme o apresentado na Figura 18a. A quantidade de lipase adsorvida (Q_{lipase}) sobre as partículas de PS/PEG aumentou linearmente em função da concentração de lipase até o plateau de adsorção em (85 ± 3)

nmol mg^{-1} ser atingido (concentração de lipase $> 15 \mu\text{mol L}^{-1}$). No caso da adsorção de lipase sobre as partículas de PS/PEG/VC, os valores de Q_{lipase} aumentaram linearmente em função da concentração de lipase disponível, não atingindo um plateau de adsorção. Para concentrações de lipase menores que $27 \mu\text{mol L}^{-1}$, os valores de Q_{lipase} sobre as partículas de PS/PEG foram superiores aos determinados para a lipase sobre PS/PEG/VC. Para concentrações de lipase maiores que $27 \mu\text{mol L}^{-1}$ há uma tendência oposta. Elevados valores de Q_{lipase} determinados para lipase sobre as partículas de PS/PEG/VC foi $(105 \pm 5) \text{ nmol mg}^{-1}$. As isothermas experimentais não foram ajustadas para os modelos teóricos porque, em ambos os casos, a adsorção é irreversível (menos do que 10% de dessorção) e as superfícies não são quimicamente homogênea, devido à presença de sulfato, oligômeros de etileno-glicol e grupos funcionais do VC.

Figura 18: (a) Isotermas de adsorção determinadas em $(24 \pm 1) ^\circ\text{C}$ e pH 7,0 para lipase sobre as partículas de PS/PEG (círculo azul) e PS/PEG/VC (vermelho). As linhas são guias para os olhos. Valores médios de (b) D, (c) PD e (d) potencial- ζ determinados para partículas de PS/PEG ou PS/PEG/VC após adsorção de lipase em função de Q_{lipase} . Histogramas de distribuição de tamanho das partículas obtidos por espalhamento de luz dinâmico e imagens de MEV (inseridas) obtidas para as partículas de (e) PS/PEG e (f) PS/PEG/VC após adsorção de lipase, $Q_{\text{lipase}} = 85 \pm 3 \text{ nmol mg}^{-1}$ e $Q_{\text{lipase}} = 105 \pm 5 \text{ nmol mg}^{-1}$, respectivamente. Cada ponto é uma média de triplicatas $\pm$ desvio padrão.

Os valores médios D determinados para as partículas de PS/PEG ou PS/PEG/VC após a adsorção da lipase aumentaram em função do aumento de Q_{lipase} (Figura 18b), com máximos de valores D em $405 \pm 11 \text{ nm}$ e $380 \pm 20 \text{ nm}$, correspondendo aos valores de plateau ($Q_{\text{lipase}} = 85 \pm 3 \text{ nmol mg}^{-1}$) para partículas de PS/PEG, e o valor mais elevado ($Q_{\text{lipase}} = 105 \pm 5 \text{ nmol mg}^{-1}$) para partículas de PS/PEG/VC, respectivamente, conforme apresentado na Tabela 2. Para ambos os sistemas os valores de PD variaram de 0,15 a 0,30 (Figura 18c), provavelmente devido à distribuição bimodal de tamanho evidenciada pelos histogramas nas Figuras 18e e 18f, as quais indicam uma população com tamanho típico de partículas isoladas e uma segunda população com tamanho

médio correspondente a pequenos agregados, como evidenciados pelas micrografias obtidas por MEV (Figuras internas 18e e 18f).

O aumento de Q_{lipase} levou a diminuição dos valores de potencial- ζ (em módulo) de (-32 ± 4) mV para (-25 ± 2) mV, para PS/PEG e PS/PEG/VC, respectivamente (Figura 18d). A adsorção de lipase sobre a superfície de PS/PEG possivelmente é governada por interações eletrostáticas entre os resíduos de aminoácidos positivamente carregados da lipase e os grupos sulfatos presentes nas partículas de PS/PEG. Apesar da lipase (pI 4,5) (SHARMA; CHISTI; BANERJEE, 2001) em pH 7 estar negativamente carregada, existe regiões com resíduos de aminoácidos positivamente carregados que são capazes de se ligar a superfícies negativamente carregadas, reduzindo os valores em módulo do potencial- ζ . Comportamento similar foi observado para Chox sobre partículas de PS/PEG (SILVA; CARMONA-RIBEIRO; PETRI, 2013) ou albumina sérica bovina (BSA) sobre poliânions (PANCERA; ITRI; PETRI, 2005; SILVA et al., 2010). Entretanto, a redução dos valores em módulo do potencial- ζ causa decréscimo da repulsão eletrostática nas partículas e consequentemente favorece a formação de pequenos agregados devido às forças atrativas de van der Waals.

Um importante aspecto da relação dos estados monomérico e dimérico da lipase imobilizada foram tratados com detalhes pelo grupo de Guisan e Fernández-Lafuente (PALOMO et al., 2003; FERNÁNDEZ-LORENTE et al., 2003; PALOMO et al., 2004; PALOMO et al., 2005; WILSON et al., 2006). Em concentrações moderadas de lipase a dimerização ocorre em solução e no suporte devido às interações entre áreas hidrofóbicas da superfície da lipase e ao redor do sitio ativo para formar duas moléculas de lipase. Entretanto na presença de detergente (0,1 % v/v Triton X-100) a dimerização é reduzida. A principal consequência é que as propriedades catalíticas da lipase

imobilizada como dímero diferem das lipases no estado monomérico (PALOMO et al., 2003). O aumento dos valores médios de D após a adsorção de lipase foi de aproximadamente 100 nm (Tabela 2) e se deve a agregação parcial das partículas e não podem ser discutidas em termos de adsorção de lipase monomérica ou dimérica. Uma estratégia para avaliar se as lipases foram imobilizadas como monômeros ou dímeros sobre as partículas de PS/PEG ou PS/PEG/VC foi à imobilização desta enzima sobre a superfície de lâminas de Si/SiO₂ ou Si/SiO₂ recobertas com VC para representar a superfície dessas partículas e determinar a espessura da camada de lipase adsorvida por elipsometria. Deve ser ressaltado que uma camada homogênea de PEG covalentemente ligada sobre uma superfície planar não é facilmente obtida. Por outro lado, lâminas de Si/SiO₂ são superfícies muito hidrofílicas, como as partículas de PS/PEG, e são superfícies interessantes para a elipsometria, pois elas são muito planas e homogêneas (BAYRAMOĞLU et al., 2011; HATZINIKOLAOU et al., 1999). Lâminas de Si/SiO₂ puras ou modificadas com VC interagiram com soluções de lipase nas concentrações de 16,6 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (1,0 g L⁻¹) e 33 $\mu\text{mol L}^{-1}$ (2,0 g L⁻¹) na ausência e na presença de 0,2 10^{-3} mol L⁻¹ de Triton X-100, sob condições de equilíbrio a $(24 \pm 1) ^\circ\text{C}$. Os dados de elipsometria revelaram que não há relação entre a concentração de lipase e a presença de Triton X-100. Os valores de espessura média da camada de lipase adsorvida sobre as lâminas de Si/SiO₂ e as lâminas de Si/SiO₂ modificadas com VC foram $(1,5 \pm 0,2)$ nm e $(1,7 \pm 0,2)$ nm, respectivamente. Considerando o raio de giro da lipase em água como sendo 1,67 nm (MATEO et al., 2007), os valores de espessura determinados para a lipase imobilizada sobre as lâminas de Si/SiO₂ e lâminas de Si/SiO₂ recobertas com VC foram atribuídos à formação de monocamadas de lipase. Portanto, se grandes agregados

de lipases estivessem presentes na superfície, eles renderiam camadas muito mais espessas que as observadas para a lipase imobilizada nas duas situações supracitadas.

5.3 - Atividade enzimática da lipase livre e imobilizada

A atividade enzimática da lipase livre e adsorvida sobre as partículas de PS/PEG ou PS/PEG/VC foi monitorada pela formação do *p*-NF em função do tempo. A dependência da relação da velocidade inicial de formação sob a concentração de *p*-NFB esta apresentada na Figura 19a. Para os ensaios enzimáticos com a lipase adsorvida sobre as partículas de PS/PEG ou PS/PEG/VC foram empregados valores de Q_{lipase} , $(85 \pm 3) \text{ nmol mg}^{-1}$ e $(105 \pm 5) \text{ nmol mg}^{-1}$, respectivamente. Para a determinação da atividade enzimática da lipase livre, a concentração empregada de enzima foi de $0,4 \mu\text{mol L}^{-1}$ na cela espectrofotométrica, correspondente à concentração de enzima adsorvida sobre as partículas de PS/PEG/VC (Q_{lipase} , $(105 \pm 5) \text{ nmol mg}^{-1}$), conforme o mostrado na seção experimental 3.10 da Parte A. Os dados experimentais foram linearizados com os gráficos de Lineweaver-Burk, como mostrado na Figura 19b. Os parâmetros cinéticos determinados pela linearização foram a velocidade máxima (V_{max}), constante de Michaelis (K_m), constante catalítica (K_{cat}) e eficiência catalítica (ξ), os quais são mostrados na Tabela 3. Os valores de K_{cat} foram determinados pela divisão dos valores de V_{max} pela da concentração da enzima em solução ($0,4 \mu\text{mol L}^{-1}$). Os valores de ξ foram calculados pela divisão dos valores de K_{cat} por pelos valores de K_m .

Figura 19: (a) Velocidades iniciais (v_0) determinadas para a hidrólise do p -NPB catalisada lipase livre (quadrado negro) em $0,4 \cdot 10^{-6} \text{ mol/L}$ e lipase imobilizada sobre partículas de PS/PEG (círculo azul, $Q_{\text{lipase}} = 85 \pm 3 \text{ nmol mg}^{-1}$) ou de PS/PEG/VC (triângulo vermelho, $Q_{\text{lipase}} = 105 \pm 5 \text{ nmol mg}^{-1}$) em função da concentração do p -NPB. Cada ponto é uma média de triplicatas $\pm$ desvio padrão. (b) Curvas de Lineweaver-Burk para lipase livre (quadrado negro) e lipase imobilizada sobre partículas de PS/PEG (círculo azul) ou PS/PEG/VC (triângulo vermelho).

Uma comparação entre os parâmetros cinéticos determinados para a reação na presença de lipase livre e imobilizada sobre as partículas de PS/PEG e PS/PEG/VC revelaram um interessante efeito interfacial. Baixos valores de K_m foram observados para a lipase imobilizada sobre as partículas de PS/PEG, indicando uma enorme afinidade pelo p -NFB para a lipase livre ou imobilizada sobre PS/PEG/VC. Os oligômeros de PEG altamente hidratados fornecem um meio muito mais favorável que os outros. Estes resultados corroboram com dados reportados na literatura para a atividade enzimática da lipase imobilizada sobre suportes poliméricos hidrofílicos e hidrofóbicos (YE et al., 2013). Os valores de V_{max} determinados para a lipase sobre

PS/PEG mostraram atividade enzimática reduzida se comparada com as da lipase livre e imobilizada sobre PS/PEG/VC. Este efeito é provavelmente devido à natureza hidrofílica da superfície de PS/PEG, a qual não auxilia na promoção da conformação da lipase no estado aberto. Um efeito similar foi observado para a Chox, a qual adsorvida sobre as partículas de PS/PEG não apresentou nenhuma atividade enzimática (SILVA; CARMONA-RIBEIRO; PETRI, 2013). Em solução, o efeito do PEG na conformação e na atividade da enzima parece depender do tipo de enzima e da massa molar do PEG, por exemplo, PEG 400 mudou a conformação da quimotripsina, retardando a degradação da insulina (YU, et al., 2014), a atividade enzimática da hexoquinase aumentou 6% na presença de PEG 400 e decaiu por volta de 14% e 7% na presença de PEG 1500 e PEG 4000, respectivamente, devido a degradação da enzima (PANCERA; PETRI; ITRI, 2004), PEG 400 ou 4000 não apresentaram interação com glicose-6-fostato dehidrogenase (G-6-PDH), mas interações favoráveis foram observadas entre PEG e o cofator NADP^+ , a qual aumenta a atividade enzimática em 20% (PANCERA et al., 2002). Comparando as atividades na presença de PEG 200, PEG 8000 ou PEG 12000, a atividade enzimática da lipase aumentou 161% na presença de PEG 12000 (POLIZELLI; TIERA; BONILLA-RODRIGUEZ, 2008). No caso das partículas de PS/PEG as ramificações das cadeias poliméricas do surfactante (Tween-20®) possuem uma média de cinco unidades de repetição, rendendo aproximadamente 200 g mol^{-1} . Estudos literários supracitados indicaram que as cadeias de PEG não são inertes com respeito à conformação da enzima; interações específicas e efeitos de hidratação possivelmente induzem a mudanças de orientação e de conformação das cadeias poliméricas.

Tabela 3: Parâmetros cinéticos determinados para a hidrólise do *p*-NPB catalisada pela lipase livre em $0,4 \cdot 10^{-6}$ mol/L e lipase imobilizada sobre partículas de PS/PEG ($Q_{\text{lipase}} = 85 \pm 3$ nmol mg⁻¹) ou PS/PEG/VC ($Q_{\text{lipase}} = 105 \pm 5$ nmol mg⁻¹). V_{max} , K_m , K_{cat} e ξ são velocidade máxima, constante de Michaelis, ciclo catalítico e eficiência catalítica, respectivamente.

Sistema	V_{max} (10^{-7} mol L ⁻¹ s ⁻¹)	K_m (10^{-3} mol L ⁻¹)	K_{cat} (s ⁻¹)	ξ (L s ⁻¹ mol ⁻¹)
Lipase livre	$30,3 \pm 0,5$	$1,25 \pm 0,08$	$7,5 \pm 0,8$	6000 ± 691
PS/PEG/VC-Lipase	46 ± 1	$2,9 \pm 0,5$	11 ± 1	3958 ± 344
PS/PEG-Lipase	$5,2 \pm 0,5$	$0,32 \pm 0,04$	$1,3 \pm 0,1$	4053 ± 678

O valor de K_m determinado para a lipase livre foi $(1,25 \pm 0,08) \cdot 10^{-3}$ mol L⁻¹ (Tabela 2), valor similar ao determinado para a lipase de *Candida rugosa* imobilizada quimicamente sobre polipropileno com amino terminal (BAYRAMOĞLU et al., 2011) ou para lipase de *Rhodotorula Glutinis* na hidrólise do *p*-NFB (HATZINIKOLAOU et al., 1999). Lipase imobilizada sobre as partículas de PS/PEG/VC apresentaram valores de k_m de $(2,9 \pm 0,5) \cdot 10^{-3}$ mol L⁻¹, indicando que a afinidade do *p*-NFB decresce em comparação à enzima em solução ou sobre as partículas de PS/PEG/VC. Entretanto, elevados valores de V_{max} e k_{cat} foram obtidos para lipase adsorvida sobre as partículas de PS/PEG/VC. Estes resultados indicam que apesar da afinidade (expressos pelo maior valor de K_m) entre lipase adsorvida e *p*-NFB não ser a mais elevada entre os três sistemas, a presença de moléculas de VC sobre as partículas poliméricas tornam o meio mais hidrofóbico, o qual é adequado para a ativação interfacial da lipase (MATEO et al., 2007). A ativação interfacial da lipase requer: (i) sítio catalítico formado pela tríade catalítica Ser-His-Asp/Glu protegida por uma "tampa" hidrofóbica ou "lid" sofra uma

mudança conformacional expondo o sítio ativo e (ii) orientação do substrato na interface (WU et al., 2001). A característica anfifílica da molécula de VC devido à presença de anéis aromáticos e grupos sulfatos e aminas parecem favorecer a interação entre o sítio ativo da lipase e o *p*-NFB, mantendo uma hidratação ideal para a catálise. A atividade enzimática da lipase fisicamente ligada tende a ser similar ou maior que a lipase livre, quando o suporte é parcialmente hidrofóbico ou possui grupos hidrofílicos que mantêm a hidratação necessária para a reação de hidrólise. Por exemplo, lipase imobilizada sobre filmes de ésteres de celulose exibem atividade enzimática maior que a lipase livre e pode ser reutilizada por até três vezes e estocada a temperatura ambiente por aproximadamente um mês com manutenção de atividade enzimática considerável (KOSAKA et al., 2007). A interação entre as porções hidrofóbicas dos ésteres de celulose e a "lid" auxiliam a manter num estado conformacional favorável, enquanto que grupos hidroxilas dos anéis glicosídicos interagem com moléculas de água. Outros suportes com comportamentos similares são as nanopartículas de zircônia modificadas com moléculas de surfactantes (CHEN et al., 2008), nanoesponjas baseadas em ciclodextrinas carbonatadas (BOSCOLO; TROTTA; GHIBAUDI, 2010), copolímero de etileno e álcool vinílico funcionalizado com cloreto de acila (BELLUSCI et al., 2012), nanotubos de carbono modificados com amino-dextrina (LI; FENG; PAN, 2013).

Para compreender as interações entre VC e a lipase, espectros eletrônicos e de dicroísmo circular (DC) foram feitos para as misturas de VC em $8,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ e lipase em concentrações que aumentaram de $3 \mu\text{mol L}^{-1}$ a $33 \mu\text{mol L}^{-1}$, como mostrado na Figura 20a e 20b, respectivamente. VC não apresentou sinal no DC no intervalo de 190 nm a 260 nm. Espectros de DC obtidos para a lipase pura mostram 22% de estrutura helicoidal, o qual é típico para lipases (GUYÁDODSON et al., 1992), com um

mínimo em 204 nm e um ombro amplo entre 220 nm e 225 nm (Figura 20a). Características típicas podem ser observadas na mistura de lipase em concentrações maiores que $13 \mu\text{mol L}^{-1}$ com VC, indicando que as moléculas de VC não promovem mudanças conformacionais na lipase. Para concentrações de lipase menores que $13 \mu\text{mol L}^{-1}$, o sinal de DC tornou-se muito fraco.

Figura 20: (a) Dicroísmo Circular (DC) e (b) espectro eletrônico obtido para misturas de VC e lipase. A concentração de VC foi mantida constante em $8,0 \mu\text{mol L}^{-1}$, enquanto que a concentração de lipase variou de $3,3 \mu\text{mol L}^{-1}$ a $33 \mu\text{mol L}^{-1}$, respectivamente.

Os espectros eletrônicos obtidos para o VC puro em $8,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ (Figura 20b) apresentaram duas transições em $\pi\text{-}\pi^*$, uma em 497 nm (forte) e outra em 350 nm (não mostrada), e transição de baixa intensidade é associada ao grupo azo (Fabian; Hartmann, 1980). À medida que a lipase foi adicionada ao sistema observou-se o deslocamento do máximo de absorção para o azul (efeito hipsocrômico). Na maior concentração de lipase ($33 \mu\text{mol L}^{-1}$) o deslocamento foi de 5 nm. Efeito hipsocrômico geralmente é causado pelo aumento da polaridade do meio, sendo anteriormente observado em soluções de VC com Chox (SILVA; CARMONA-RIBEIRO; PETRI, 2013). Portanto, deslocamento do máximo de absorção para o azul observado na Figura 20b deve indicar bioconjugação mediada por ligações de hidrogênio entre os grupos aminos e os resíduos de aminoácidos polares da lipase. Espectros eletrônicos obtidos para misturas de VC em $8,0 \mu\text{mol L}^{-1}$ e p-NFB no intervalo de concentração de $0,3 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ a $3,0 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ não mostra deslocamento do máximo de absorção de 497 nm considerável, indicando que não há efeitos de bioconjugação entre VC e p-NFB.

A estabilidade térmica da lipase livre e imobilizada foi investigada pelo monitoramento da formação do p-NF após 20 minutos de hidrólise no intervalo de temperatura de 25°C a 60°C, como mostrado na Figura 21. Nenhum deslocamento da temperatura ótima foi observado para a lipase imobilizada sobre as partículas de PS/PEG/VC (triângulos vermelhos) em comparação com a lipase livre (quadrados pretos), sendo que para ambos os sistemas a maior atividade hidrolítica foi observado em 40°C. A 60°C a lipase livre e imobilizada sobre as partículas de PS/PEG/VC apresentou atividade de aproximadamente 80% e 50% da mensurada em 40 °C. Lipases imobilizadas sobre quitosana apresentaram comportamento similar (PEREIRA; ZANIN; CASTRO, 2003). Considerando a temperatura empregada, a atividade observada para a

lipase imobilizada sobre as partículas de PS/PEG foi menor se comparada com a determinada para a lipase livre e imobilizada sobre as partículas de PS/PEG/VC.

Figura 21: Concentração de p-NP formado da hidrólise de p-NPB catalisada pelas lipases livres (quadrado preto), lipases imobilizadas sobre partículas de PS/PEG/VC (triângulo vermelho, $Q_{\text{lipase}} = 105 \pm 5 \text{ nmol mg}^{-1}$) ou PS/PEG (círculo azul, $Q_{\text{lipase}} = 85 \pm 3 \text{ nmol mg}^{-1}$) a 25 °C, 37 °C, 40 °C, 45 °C e 60 °C. Cada ponto é uma média de triplicatas $\pm$ desvio padrão.

Lipase imobilizada sobre as partículas de PS/PEG/VC ($Q_{\text{lipase}} = 105 \pm 5 \text{ nmol mg}^{-1}$) pode ser reutilizada consecutivamente até 7 vezes. A Figura 22 apresenta a atividade de reuso (%), a qual é a atividade da lipase imobilizada comparada a atividade inicial da lipase livre (SHELDON; VAN PELT, 2013), determinada em 25 °C (triângulos pretos) e 40 °C (estrelas rosa). As atividades enzimáticas da lipase livre e imobilizada foram comparáveis ao primeiro uso em ambas as temperaturas. A atividade de reuso decresceu com o número de reações consecutivas, então na sétima reação de hidrólise a atividade de reuso foi de aproximadamente 70% e 90% em 25 °C e 40 °C. Estes dados revelaram que a estabilidade da lipase imobilizada sobre as partículas de PS/PEG/VC é favorecida em

40 °C e que a desativação por dessorção ou mudanças conformacionais são mínimas. Portanto, as lipases imobilizadas sobre as partículas de PS/PEG/VC são vantajosas, pois a atividade cumulativa após sete reações supera em aproximadamente 6 vezes a atividade da lipase livre, a qual não pode ser recuperada pelo reuso. Além disso, a lipase imobilizada sobre as partículas de PS/PEG/VC pode ser estocada por 7 dias em temperatura ambiente, mantendo a atividade catalítica original. Por outro lado, lipase imobilizada sobre as partículas de PS/PEG ($Q_{\text{lipase}} = 85 \pm 3 \text{ nmol mg}^{-1}$) não pode ser reutilizado, apesar dos valores de K_m para o sistema ser o menor de todos (Tabela 3).

Figure 22: Atividade de reuso a 25 °C e 40 °C para lipases imobilizadas sobre partículas de PS/PEG/VC ($Q_{\text{lipase}} = 105 \pm 5 \text{ nmol mg}^{-1}$). Cada ponto é uma média de triplicatas $\pm$ desvio padrão.

5.4 – Conclusões Parciais

Lipase adsorve fisicamente sobre nanopartículas poliméricas decoradas com PEG e/ou recobertas com VC. A afinidade do *p*-NFB pelas lipases imobilizadas sobre as partículas de PS/PEG foi maior que para a lipase livre e a imobilizada sobre as partículas de PS/PEG/VC. A velocidade de hidrólise observada para as lipases imobilizadas sobre as partículas de PS/PEG/VC foi maior que a observada para a lipase livre ou imobilizada sobre as partículas de PS/PEG. A principal razão para isto são os efeitos de bioconjugação, os quais propiciam: (i) as interações entre as porções hidrofóbicas do VC e da lid, mantendo a conformação da enzima favorável e (ii) meio hidratado próximo ao sítio ativo para a reação de hidrólise. Apesar da afinidade entre a lipase imobilizada sobre as partículas de PS/PEG e o substrato ser elevada, o estado conformacional da enzima não é favorável. Partículas de PS/PEG/VC são facilmente preparadas e baratas (US\$ por litro de dispersão com $N_p = 1,7 \cdot 10^{14}$ partículas L^{-1}). Para fins práticos, a imobilização da lipase sobre as nanopartículas é vantajosa devido à manutenção de suas propriedades catalíticas após sete ciclos repetidos de reutilização, e também pela possibilidade de estocar no laboratório por mais de uma semana em temperatura ambiente restando elevado nível de atividade enzimática.

Capítulo III – Bioconjugação de Chox ou lipase com grafeno ou grafeno oxidado

6 - Resultados e Discussão

6.1 - Parâmetros cinéticos da Chox e lipase na presença e ausência de G ou GO

O comportamento enzimático da lipase, na ausência e na presença de G ou GO foi monitorado através da formação de p-NF em função do tempo. A dependência das velocidades iniciais de formação de p-NF sobre a concentração de p-NFB está apresentada na Figura 23a. Os dados experimentais foram ajustados em gráficos segundo o modelo de Lineweaver-Burk, como mostrado na Figura 23b. Os parâmetros de velocidade máxima ($V_{\max}$), constante de Michaelis (K_m), ciclo catalítico (K_{cat}) e a eficiência catalítica (ξ) são mostrados na Tabela 4. Os valores K_{cat} foram determinados dividindo-se os valores de $V_{\max}$ pela concentração da enzima ($1,67 \cdot 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$). Os valores de ξ foram calculados dividindo K_{cat} por K_m . Comparando os parâmetros cinéticos determinados para as reações na ausência e na presença de G ou GO revelaram efeitos interfaciais interessantes. O menor valor de K_m foi observado para a lipase pura, o que indica que a afinidade para o *p*-NPB é maior na ausência de G ou GO. Por outro lado, $V_{\max}$, valores de K_{cat} e ξ aumentaram consideravelmente na presença de G; tal efeito foi provavelmente causado pela preferência da lipase por regiões hidrofóbicas (KOSAKA et al., 2007; CHEN et al., 2008; BELLUSCI et al., 2012; LI; XIA, 2012; LI et al., 2013; YE et al., 2013; Silva; Carmona-Ribeiro; Petri, 2014; TITOV; KRÁL; PEARSON, 2009), disponível nas partículas de G. Efeitos semelhantes foram observados para lipases na presença de partículas de GO. Lipases covalentemente

ligadas a GO apresentaram em solvente orgânico eficiência catalítica ~ 50% maior em comparação com lipase livre; tal comportamento foi atribuído a interações hidrofóbicas, que favoreceram a abertura da tampa (“*lid*”) (LI; XIA, 2012). Por exemplo, lipase proveniente de *Chromobacterium viscosum* encapsulada em micelas reversas na presença de GO apresentou atividade enzimática 3,8 vezes maior que lipase livre; a grande quantidade de GO aumentou a área interfacial, acomodando grande quantidade de substrato (DAS et al., 2013). As interações entre *Pseudozyma (Candida) Antarctica* lipase B e GO levaram a estrutura mais rígida com aumento do teor folhas β pregueadas devido à interação hidrofóbica e consequente aumento (até 60%) na eficiência catalítica (PAVLIDIS et al., 2012).

A atividade enzimática de Chox na ausência e na presença de G ou GO foi avaliada através da reação acoplada com HRP (Figura 3, seção experimental Parte A). A dependência das velocidades iniciais de formação de (*p*-benzoquinona monoimino) fenazona em função da concentração de colesterol está apresentada na Figura 23c. Os gráficos Lineweaver-Burk estão apresentados na Figura 23d, os quais permitiram a determinação de $V_{\max}$, K_m , K_{cat} e ξ apresentados na Tabela 4. O valor K_m determinado para Chox livre foi a metade do que o encontrado para Chox na presença de G. No entanto, os valores de $V_{\max}$ e K_{cat} na presença de G foram aproximadamente duas vezes aos calculados para Chox livre. É esperado que a Chox se ligue com colesterol na interface das micelas de Triton X-100 / isopropanol (KREIT; SAMPSON, 2009). Assim, o aumento de $V_{\max}$ e K_{cat} na presença de G revelou que partículas de grafeno favoreceram a aproximação entre Chox e colesterol. Na presença de GO, mesmo com alto teor de Chox livre (62%), a formação de *p*-benzoquinona monoimino fenazona não foi observada, indicando a inativação da Chox. Do mesmo modo, a atividade da tripsina

foi drasticamente reduzida na presença de GO, porque a ligação não específica através de interação hidrofóbica provocou a desnaturação da enzima (GU et al., 2011).

Figura 23: (a) Dependência das velocidades iniciais (V_0) de formação de p-NF em função da concentração de p-NFB determinado em $(24 \pm 1) ^\circ\text{C}$, lipase a $0,01 \text{ g L}^{-1}$ ($1,67 \cdot 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$) na ausência e na presença de G ($0,012 \text{ g L}^{-1}$) ou GO ($0,012 \text{ g L}^{-1}$). (b) Ajuste de curvas Lineweaver-Burk para lipase pura (triângulos azuis), lipase na presença de G (quadrados pretos) ou GO (círculos vermelhos). (c) Dependência das velocidades iniciais (V_0) de formação de (*p*-benzoquinona monoimino) fenazona em função da concentração de colesterol determinado em $(24 \pm 1) ^\circ\text{C}$, Chox a $0,03 \text{ g L}^{-1}$ ($6,4 \cdot 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$) na ausência e na presença de G ($0,012 \text{ g L}^{-1}$). (d) Ajuste de curvas de Lineweaver-Burk para Chox pura (estrelas verdes) e Chox na presença de G (losangos roxos).

Tabela 4: Parâmetros cinéticos determinados para a hidrólise do *p*-NPB catalisado pela lipase 0,01 g L⁻¹ (1,67 10⁻⁷ mol·L⁻¹) e para a oxidação do colesterol catalisada pela Chox 0,03 g L⁻¹ (6,4 10⁻⁷ mol L⁻¹) na ausência e na presença de G (0,012 g L⁻¹) ou GO (0,012 g L⁻¹) a 24 ± 1 °C.

	$V_{\max}$ (mol L ⁻¹ s ⁻¹)	K_m (mol L ⁻¹)	K_{cat} (s ⁻¹)	ξ (L mol ⁻¹ s ⁻¹)
Lipase Livre	1,34 x 10 ⁻⁷	0,86 x 10 ⁻⁶	0,802	9,3 x 10 ⁵
Lipase/G	8,28 x 10 ⁻⁷	4,36 x 10 ⁻⁶	4,96	11,4 x 10 ⁵
Lipase/GO	2,16 x 10 ⁻⁷	1,93 x 10 ⁻⁶	1,29	6,7 x 10 ⁵
Chox Livre	7,8 x 10 ⁻⁷	0,12	0,49	3,95
Chox/G	14,4 x 10 ⁻⁷	0,48	0,9	1,87

$V_{\max}$, K_m , K_{cat} e ξ são respectivamente velocidade máxima, constante de Michaelis, ciclo catalítico e eficiência catalítica, respectivamente.

Soluções de lipase (0,01 g L⁻¹) e Chox (0,03 g L⁻¹) foram armazenadas a (24 ± 1) °C na ausência e na presença de G ou GO em 0,012 g L⁻¹. No caso de lipases, a presença de partículas de G ou GO não causou mudança perceptível na conformação da enzima. Depois de duas semanas, aproximadamente 75% da atividade enzimática original da lipase livre e da lipase na presença de G ou GO foi mantida, conforme apresentado na Figura 24. No caso de Chox a atividade foi perdida após um dia, na ausência e na presença de G.

Figura 24: Retenção de atividade enzimática determinada para lipase a $0,01 \text{ g L}^{-1}$ na ausência e na presença de G ou GO em $0,012 \text{ g L}^{-1}$, após 15 d, 30 d e 45 d armazenados a $(24 \pm 1)^\circ \text{C}$ em ambiente de laboratório.

Todas estas observações experimentais revelam que para fins práticos, a adição de G nas reações enzimáticas catalisada pelas lipases ou Chox é vantajosa porque elas são mais rápidas do que aqueles na ausência de G. As investigações sobre as interações moleculares responsáveis pelos efeitos observados estão descritos nas próximas seções.

6.2 - Aspectos estruturais da lipase e Chox avaliadas por espectroscopia de dicroísmo circular (DC)

Para compreender a diferença de comportamento catalítico da lipase ou Chox na presença de G ou GO, um estudo sistemático com espectroscopia de dicroísmo circular (DC) foi realizado. A Figura 25a mostra os espectros de DC de lipase na presença de G. As lipases são α/β hidrolases compostas por folhas β pregueadas rodeadas por algumas α -hélices (CYGLER; SCHRAG, 1999). O sinal de DC típico de α -hélice em (203 ± 1)

nm foi observado para a lipase pura a $1,0 \text{ g L}^{-1}$; o sinal de DC para a lipase de $0,01 \text{ g L}^{-1}$, que era a concentração utilizada para a hidrólise de *p*-NPB, era muito fraco. G puro não tem sinal de DC. A adição de G até $0,1 \text{ g L}^{-1}$ na solução de lipase $1,0 \text{ g L}^{-1}$ não causou nenhuma mudança significativa no sinal α -hélice típico do DC, porém os sinais tornaram-se mais intensos do que o observado para a lipase pura. Estas características evidenciam que a estrutura secundária da lipase está preservada e que ocorre estabilização estrutural na presença de G. Os parâmetros cinéticos apresentados na Tabela 4 foram determinados para a razão de massa da lipase para G ou GO em 1:1. Não foi possível preparar dispersões de G a $1,0 \text{ g L}^{-1}$ devido à rápida agregação e sedimentação. A maior concentração de G disperso em água com boa estabilidade coloidal para um período de 6 h foi de $0,25 \text{ g L}^{-1}$. Assim as misturas de lipase e G foram preparadas em $0,25 \text{ g L}^{-1}$, a fim de alcançar a relação de massa 1:1, a qual foi a relação de massa usada nos estudos cinéticos enzimáticos. Embora o sinal do DC fosse fraco devido à baixa concentração de lipase, ainda assim é possível observar o típico sinal de DC para α -hélice em 204 nm. Portanto, mesmo em alta proporção de massa de lipase com o G a estrutura nativa da lipase foi preservada. DAS e colaboradores observaram que a interação entre a lipase e a cabeça catiônicas do CTAB causou alterações na estrutura secundária da enzima e reduziu a sua atividade catalítica; mas em micelas reversas de CTAB na presença de GO, num ambiente mais hidrofóbico, a atividade enzimática da lipase foi melhorada (DAS et al., 2013).

A Figura 25b mostra os espectros de DC de lipase na presença de GO. GO puro não tem sinal de DC. A adição de GO (até $0,1 \text{ g L}^{-1}$) à solução de lipase em $1,0 \text{ g L}^{-1}$ não causou nenhuma mudança no sinal de DC correspondente ao sinal típico para α -hélice a 204 nm. No entanto, as intensidades de sinais de DC na presença de GO

tornaram-se mais fracas do que as observadas para a lipase pura, evidenciando que, embora a estrutura secundária da lipase fosse preservada, a estrutura da lipase é menos estável na presença de GO do que na presença de G. Tal efeito é uma possível explicação para a maior eficiência catalítica (ξ) na presença de G e a menor eficiência catalítica na presença de GO. O sinal de DC desaparece para ambos em misturas de lipase e GO em $0,25 \text{ g L}^{-1}$, razão 1:1 de massa de lipase e GO, evidenciando a desnaturação. Comportamento similar foi observado para misturas de lipase e VC (SILVA; CARMONA-RIBEIRO; PETRI, 2013).

Figura 25: Espectro de DC determinado para lipase pura $1,0 \text{ g L}^{-1}$ (linha negra) e misturas de lipase e G (a) ou GO (b). A concentração de lipase foi mantida constante em $1,0 \text{ g L}^{-1}$, enquanto que a concentração de grafeno foi de $0,012 \text{ g L}^{-1}$ (linha cinza), $0,025 \text{ g L}^{-1}$ (linha vermelha) e $0,1 \text{ g L}^{-1}$ (linha azul). A mistura de lipase $0,25 \text{ g L}^{-1}$ e G $0,25 \text{ g L}^{-1}$ (linha verde) também foi testado.

A Figura 26a mostra os espectros de DC de Chox na presença de G. Chox pura a $1,0 \text{ g L}^{-1}$ apresentou as características típicas α -hélice com mínimos a 209 nm e 220 nm (VRIELINK; GHISLA, 2009); o sinal de DC para Chox a $0,03 \text{ g L}^{-1}$, que era a concentração utilizada para a oxidação do colesterol, era muito fraco. A adição de G

(acima de $0,06 \text{ g L}^{-1}$) à solução Chox a $1,0 \text{ g L}^{-1}$ enfraqueceu o sinal de DC, particularmente em quantidades mais elevadas, indicando a desnaturação parcial da proteína. Estes resultados explicam a menor eficiência catalítica (ξ) de Chox na presença de G, embora o valor $V_{\max}$ tenha sido maior na presença de partículas de G. Possivelmente a aproximação entre o sítio ativo da Chox e do colesterol era mediado pelo G, favorecendo a catálise. Por outro lado, as moléculas de Chox perderam completamente a sua estrutura secundária nativa na presença de GO (figura 26b); o sinal de DC desapareceu mesmo na presença de pequenas quantidades de GO. Estes resultados explicam a ausência de atividade observada para ensaios Chox na presença de GO.

Figura 26: Espectros de DC determinados para Chox pura $1,0 \text{ g L}^{-1}$ (linha cinza) e misturas de Chox e G (a) ou GO (b). A concentração de Chox foi mantida constante em $1,0 \text{ g L}^{-1}$, enquanto que a concentração de grafeno ou grafeno oxidado foi de $0,012 \text{ g L}^{-1}$ (linha preta), $0,025 \text{ g L}^{-1}$ (linha vermelha) e $0,060 \text{ g L}^{-1}$ (linha roxa).

6.3 - Interações entre enzimas e G ou GO estudadas por espectroscopia de fotoluminescência

A fim de obter mais conhecimento sobre as interações entre enzimas e G ou GO, as misturas de enzimas e G ou GO foram investigados por meio de espectroscopia de fotoluminescência (FL). Primeiro G e GO foram caracterizados por espectroscopia Raman. Na Figura 27 está apresentado o espectro Raman do G com bandas características em 1322 cm^{-1} , 1570 cm^{-1} e 2649 cm^{-1} devido às bandas D, G e 2D das estruturas do grafeno, correspondendo ao modo fônon de desordem induzida, estrutura grafitizada e processo de dupla ressonância, respectivamente. No espectro do GO as bandas em 1343 cm^{-1} e 1594 cm^{-1} devido às bandas D e G foram observadas (LUO et al., 2009; IACAZIO; PÉRISSOL; FAURE, 2000; GOKUS et al., 2009). A intensa banda G (1570 cm^{-1}) está relacionada em todas as vibrações sp^2 de materiais carbonílicos, enquanto que a banda D (1322 cm^{-1}) está associada a defeitos nas estruturas do grafeno. A banda ampla e intensa D em 1343 cm^{-1} observada no espectro do GO confirma a presença de redução de ligação simétrica devido ao processo de oxidação. Folhas planas de GO de 2 nm de espessura podem ser observadas por AFM (Figura 28a), enquanto que G formou agregados (imagem não mostrada). A Figura 28b mostra a seção de corte correspondendo à linha verde.

Figura 27: Espectro Raman do grafeno (G) (linha azul) e grafeno oxidado (GO) (linha vermelha) na fase sólida ($\lambda_{\text{exc}} = 632,8 \text{ nm}$).

Figura 28: (a) Imagem topográfica de AFM obtida para GO disperso em água e depositado sobre lâmina de Si e (b) seção de corte correspondendo à linha verde.

Espectros de FL dos materiais de partida obtidos por técnica de micro-Raman estão apresentados nas Figuras 29a, 29b e 29c respectivamente. Lipase pura e Chox pura apresentaram três bandas de emissão máxima em aproximadamente 585 nm, 651 nm e 733 nm. GO apresenta sinal forte de FL centrado em 721 nm e uma banda menor com máximo em 838 nm quando excitado a 514 nm, enquanto puro G não mostra

nenhum sinal de luminescência aparente, como relatado na literatura (LUO et al., 2009; IACAZIO; PÉRISSOL; FAURE, 2000). A fim de avaliar a interação entre as estruturas de grafeno e as enzimas, espectros de FL adquiridos em cinco pontos diferentes foram calculados e espectros representativos estão apresentados nas Figuras 29a, 29b e 29c. As bandas de FL foram decompostas em gaussianas.

A Figura 29a mostra que a adição de pequenas quantidades de G (até $0,025 \text{ g L}^{-1}$) não causou alteração significativa nos níveis de energia eletrônicos da lipase, uma vez que os espectros de FL obtidos para estas misturas foram semelhantes às aquelas observadas para a lipase pura. A mistura contendo lipase a $1,0 \text{ g L}^{-1}$ e G a $0,1 \text{ g L}^{-1}$ não apresentou nenhuma mudança nas duas primeiras bandas de FL características da lipase, exceto um aumento sutil na intensidade banda em 651 nm relativo à banda de 585 nm e um deslocamento para o vermelho ($\Delta = 24 \text{ nm}$) da banda centrada a 733 nm para 757 nm, evidenciando que a redução nos níveis de energia eletrônicos da lipase no composto resultante pode ser devido à deslocalização da carga. Os espectros de FL obtidos para as misturas de lipase e G, ambos a $0,25 \text{ g L}^{-1}$, apresentaram dois deslocamentos para o vermelho das bandas FL, ou seja, de 651 nm para 702 nm ($\Delta = 51 \text{ nm}$) e de 733 nm para 821 nm ($\Delta = 88 \text{ nm}$). Este comportamento revelou que as misturas com concentrações equivalentes de lipase e G apresentaram efeitos batocrômico mais intensos do que aqueles com grande excesso de lipase. Geralmente, os deslocamentos batocrômico observados nos espectros de FL podem ser originados por efeitos de transferência de carga (JIN et al., 2013; XIONG et al., 2010; SOARES et al., 2007), associação intermolecular ou agregação (EDWIN; JAGANNADHAM, 2000). Os espectros de DC na Figura 25a indicou a preservação da estrutura secundária de lipase na presença de G. Assim, efeitos batocrômico observados nos espectros de FL (Figura 29a) podem não

estar correlacionados com agregação ou desnaturação da enzima, mas pode ser atribuída a redução dos níveis eletrônicos de moléculas de lipase, em virtude da bioconjugação com G (MARTÍN-PALMA; MANSO; TORRES-COSTA, 2009). Tal processo de ligação também influenciou os níveis de energia de G nas misturas, quando o teor em G era maior do que $0,1 \text{ g L}^{-1}$; as bandas Raman emergentes D, G e G' deslocou para 1350 cm^{-1} ($\Delta = 28 \text{ cm}^{-1}$), 1579 cm^{-1} ($\Delta = 9 \text{ cm}^{-1}$) e 2714 cm^{-1} ($\Delta = 65 \text{ cm}^{-1}$). Estes resultados corroboram com a melhora nas propriedades catalíticas de lipase na presença de G mostrados na Tabela 4.

As interações entre Chox e G também foram evidenciadas pelos espectros de FL na figura 29b. Da mesma forma que a lipase pura, espectro decomposto de FL da Chox pura apresentou bandas de FL centrada em aproximadamente 585 nm, 651 nm e 733 nm. Duas amostras na presença de G $0,0125 \text{ g L}^{-1}$ e $0,1 \text{ g L}^{-1}$ apresentaram um deslocamento de FL para o vermelho da banda máxima em 651 nm a aproximadamente 677 nm e a banda em 733 nm para comprimentos de onda acima de 900 nm (máximo estimado em 987 nm). O sinal de DC na Figura 26a para as amostras com $0,012 \text{ g L}^{-1}$ e $0,080 \text{ g L}^{-1}$ de G foram mais fracas do que as observadas para Chox $1,0 \text{ g L}^{-1}$. A combinação dos resultados de DC e FL sugere (i) perda parcial da estrutura secundária da Chox observado por um sinal fraco de DC resultante de características α -hélices causados pela ligação da Chox com G (Figura 26a) e / ou (ii) formação de conjugados de Chox e G com estruturas mais abertas (bobina aleatória), o que facilita a aproximação do substrato. Este último poderia explicar o aumento dos valores de $V_{\max}$ determinados para misturas de Chox e G se comparados com aqueles encontrados para Chox livre. Comportamento semelhante foi observado para a atividade enzimática da celulase na presença de ácido ferúlico (TIAN; JIANG; OU, 2013). As misturas

contendo $0,25 \text{ g L}^{-1}$ de ambas Chox e G apresentaram uma banda de emissão muito intensa em 733 nm, enquanto a banda de 651 nm apresentou uma intensidade muito mais baixa. Sob essas condições, a ligação da Chox com G pode ter induzido a mudanças conformacionais mais intensas; e nenhum espectro de DC foi obtido porque em baixa concentração de Chox ($0,25 \text{ g L}^{-1}$) o sinal de DC era muito fraco.

Os espectros de FL obtidos para as misturas de lipase e GO (Figura 29C) indicaram que a superfície oxidada de grafeno tem um efeito mais forte sobre os níveis de energia da lipase do que o grafeno primitivo. A adição de $0,01 \text{ g L}^{-1}$ ou $0,012 \text{ g L}^{-1}$ de GO na lipase a $1,0 \text{ g L}^{-1}$ causou o deslocamento para o vermelho da banda FL em 733 nm a 786 nm ($\Delta = 53 \text{ nm}$) e nenhuma mudança aparente nas outras bandas de maior energia da lipase pura (em 585 e 651 nm), exceto por um aumento sutil na intensidade relativa da banda em 651 nm. Embora GO apresente uma banda de emissão em 721 nm, bandas da lipase predominam porque a quantidade de GO é muito baixa (cerca de 1%). Considerando a preservação da estrutura secundária de lipase na presença de GO a $0,01 \text{ g L}^{-1}$ ou $0,012 \text{ g L}^{-1}$ (Figura 25b), o efeito batocrômico observado no espectro de FL pode ser atribuído à transferência de energia entre a lipase e GO devido à deslocalização de elétrons provocada por uma interação química entre a enzima e GO, a qual é mais evidente em baixas concentrações. Os espectros obtidos para misturas de lipase a $1,0 \text{ g L}^{-1}$ com GO $0,025 \text{ g L}^{-1}$ e para as misturas de quantidades equivalentes de lipase e GO (ambas a $0,25 \text{ g L}^{-1}$) foram semelhantes; as bandas características de emissão de FL da lipase em 585 nm e 651 nm estavam ausentes e uma larga banda de baixa intensidade energética de FL com máximo em 750 nm apareceu. A banda ampla e intensa que emerge em 750 nm pode ser correlacionada com um efeito batocrômico da banda de FL do GO e/ou uma relaxação da lipase sobre o GO, o que levou a mudanças

na estrutura secundária lipase, como evidenciado pelo fraco sinal de DC para a lipase $1,0 \text{ g L}^{-1}$ e GO em $0,025 \text{ g L}^{-1}$ ou para misturas de quantidades equivalentes de lipase e GO (Figura 25b). Portanto, as bandas de emissão de FL em 585 nm e 651 nm podem ser usadas para avaliar a desnaturação da lipase. As interações ácido-base entre os grupos de ácido carboxílico do GO e grupos amino terminais da lipase, podem ter reduzido a “band gap” do GO causando o deslocamento para o vermelho nas bandas FL, as quais podem justificar a desnaturação da lipase.

Figura 29: Espectro de FL obtido para (a) G, lipase e suas misturas; (b) G, Chox e suas misturas; (c) GO, lipase e suas misturas; empregando técnica de micro Raman com $\lambda_{\text{exc}} = 514,5 \text{ nm}$.

6.4 – Conclusões Parciais

Lipase e Chox, são enzimas importantes para o desenvolvimento de kits de diagnóstico, têm substratos hidrofóbicos (ésteres e colesterol) e ambos catalisam reações em interfaces. G, que tem uma natureza hidrofóbica, tem a capacidade de formar conjugados com lipase e Chox apenas por mistura física, como revelado pelos estudos espectroscópicos. A formação de tais conjugados possivelmente favorece a exposição de sítios ativos da lipase e da Chox para os substratos correspondentes, aumentando a sua eficiência catalítica. Por outro lado, na presença de partículas de GO, o qual possui em seus planos basais grupos hidrofílicos, ocorreu à desativação da Chox de tal maneira que a estrutura nativa foi perdida. No caso de lipase e GO, em baixas quantidades de GO ($<0,012 \text{ g L}^{-1}$), os bioconjugados apresentaram menor eficiência catalítica que os sistemas contendo G, mas os grupos hidrofílicos ligados ao GO possivelmente favoreceram a afinidade pelo substrato, tal como indicado pela diminuição dos valores de K_m . Em quantidades maiores de GO, lipase desnatura parcialmente, como revelado pelo fraco sinal de DC e pelo desaparecimento de bandas típicas de FL da lipase. Assim, a combinação de espectroscopia de FL e DC são fundamentais para a compreensão do comportamento catalítico de enzimas na presença de adjuvantes. Para fins catalíticos, G provou ser um melhor adjuvante para lipase e Chox que GO.

7 - Referências Bibliográficas

AHMADALINEZHAD; CHEN. High-performance electrochemical biosensor for the detection of total cholesterol. *Biosensors and Bioelectronics*, v. 26, n. 11, p. 4508-4513, 2011.

AKDIM , F.; VISSER, M. E.; TRIBBLE, D. L.; BAKER, B. F.; STROES, E. S.G.; YU, R.; FLAIM, J. D.; SU, J.; STEIN, E. A.; KASTELEIN, J. J. P. Effect of mipomersen, an apolipoprotein B synthesis inhibitor, on low-density lipoprotein cholesterol in patients with familial hypercholesterolemia. *The American journal of cardiology*, v. 105, n. 10, p. 1413-1419, 2010.

AKKAYA, Berrin et al. Functional polymeric supports for immobilization of cholesterol oxidase. *Biochemical Engineering Journal*, v. 43, n. 3, p. 333-337, 2009.

ALLEN, M. J.; TUNG, V. C.; KANER, R. B. Honeycomb carbon: a review of graphene. *Chemical reviews*, v. 110, n. 1, p. 132-145, 2009.

ANSARI, A. A.; KAUSHIK, A.; SOLANKI, P. R.; MALHOTRA, B. D. Electrochemical Cholesterol Sensor Based on Tin Oxide-Chitosan Nanobiocomposite Film. *Electroanalysis*, v. 21, n. 8, p. 965-972, 2009.

AZZAM, R. M. A.; BASHARA, N. M. Ellipsometry and Polarized light, north holland personal library: Amsterdam, The netherlands, 1996.

BASU, D.; LEI, X.; JOSEKUTTY, J.; HUSSAIN, M. M.; JIN, W. Measurement of the phospholipase activity of endothelial lipase in mouse plasma. *Journal of lipid research*, v. 54, n. 1, p. 282-289, 2013.

BAYRAMOĞLU, G.; HAZER, B.; ALTINTAŞ, B.; ARICA, M. Y. Covalent immobilization of lipase onto amine functionalized polypropylene membrane and its application in green apple flavor (ethyl valerate) synthesis. *Process Biochemistry*, v. 46, n. 1, p. 372-378, 2011.

BELLUSCI, M.; FRANCOLINI, I.; MARTINELLI, A.; D'ILARIO, L.; PIOZZI, A. Lipase immobilization on differently functionalized vinyl-based amphiphilic polymers: Influence of phase segregation on the enzyme hydrolytic activity. *Biomacromolecules*, v. 13, n. 3, p. 805-813, 2012.

BENJAMIN, S.; PANDEY, A. Isolation and characterization of three distinct forms of lipases from *Candida rugosa* produced in solid state fermentation. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, v. 43, n. 5, p. 453-460, 2000.

BLACHECHEN, L. S.; SILVA, J. O.; BARBOSA, L. R.; ITRI, R.; PETRI, D. F. S. Hofmeister effects on the colloidal stability of poly (ethylene glycol)-decorated nanoparticles. *Colloid and Polymer Science*, v. 290, n. 15, p. 1537-1546, 2012.

BONFA, A., SAITO, R. S., FRANÇA, R. F., FONSECA, B. A., & PETRI, D. F. S. Poly (ethylene glycol) decorated poly (methylmethacrylate) nanoparticles for protein adsorption. *Materials Science and Engineering: C*, v. 31, n. 3, p. 562-566, 2011.

BOSCOLO, B.; TROTTA, F.; GHIBAUDI, E. High catalytic performances of *Pseudomonas fluorescens* lipase adsorbed on a new type of cyclodextrin-based nanosponges. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 62, n. 2, p. 155-161, 2010.

BRENA, Beatriz M.; BATISTA-VIERA, Francisco. Immobilization of enzymes. In: *Immobilization of enzymes and cells*. Humana Press, p. 15-30, 2006.

CACACE, M. G.; LANDAU, E. M.; RAMSDEN, J. J. The Hofmeister series: salt and solvent effects on interfacial phenomena. *Quarterly reviews of biophysics*, v. 30, n. 03, p. 241-277, 1997.

CASTRO, L. B. R.; SOARES, K. V.; NAVES, A. F.; CARMONA-RIBEIRO, A. M.; PETRI, D. F. S. Synthesis of stable polystyrene and poly (methyl methacrylate) particles in the presence of carboxymethyl cellulose. *Industrial & engineering chemistry research*, v. 43, n. 24, p. 7774-7779, 2004.

CAUGLIA, F.; CANEPA, P. The enzymatic synthesis of glucosylmyristate as a reaction model for general considerations on 'sugar esters' production. *Bioresource technology*, v. 99, n. 10, p. 4065-4072, 2008.

CHEN, Y. Z.; YANG, C. T.; CHING, C. B.; XU, R. Immobilization of lipases on hydrophobilized zirconia nanoparticles: highly enantioselective and reusable biocatalysts. *Langmuir*, v. 24, n. 16, p. 8877-8884, 2008.

CHERN, C. S. Emulsion polymerization mechanisms and kinetics. *Progress in polymer science*, v. 31, n. 5, p. 443-486, 2006.

CHIBATA, I. Immobilized enzymes, research and development. Kodansha Ltda, Japan, 1978.

CHILDS, R. E.; BARDSLEY, W. G. The steady-state kinetics of peroxidase with 2, 2'-azino-di-(3-ethyl-benzthiazoline-6-sulphonic acid) as chromogen. *Biochemical Journal*, v. 145, p. 93-103, 1975.

CHOI, O.; KIM, B. C.; AN, J. H.; MIN, K.; KIM, Y. H.; UM, Y.; SANG, B. I. A biosensor based on the self-entrapment of glucose oxidase within biomimetic silica

nanoparticles induced by a fusion enzyme. *Enzyme and microbial technology*, v. 49, n. 5, p. 441-445, 2011.

CHONG, A. S. M.; ZHAO, X. S. Functionalized nanoporous silicas for the immobilization of penicillin acylase. *Applied Surface Science*, v. 237, n. 1, p. 398-404, 2004.

COULOMBE, R.; YUE, K. Q.; GHISLA, S.; VRIELINK, A. Oxygen access to the active site of cholesterol oxidase through a narrow channel is gated by an Arg-Glu pair. *Journal of Biological Chemistry*, v. 276, n. 32, p. 30435-30441, 2001.

CYGLER, M.; SCHRAG, J. D. Structure and conformational flexibility of *Candida rugosa* lipase. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids*, v. 1441, n. 2, p. 205-214, 1999.

DA SILVA, M. P.; SOEIRA, L. S.; DAGHASTANLI, K. R. P.; MARTINS, T. S.; CUCCOVIA, I. M.; FREIRE, R. S.; ISOLANI, P. C. CeO₂-catalyzed ozonation of phenol. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, v. 102, n. 3, p. 907-913, 2010.

DAS, K.; MAITI, S.; GHOSH, M.; MANDAL, D.; DAS, P. K. Graphene oxide in cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) reverse micelle: A befitting soft nanocomposite for improving efficiency of surface-active enzymes. *Journal of colloid and interface science*, v. 395, p. 111-118, 2013.

DE MARTINEZ, S. G.; GREEN, C. The action of cholesterol oxidase on cholesterol in vesicles and micelles proceedings. *Biochemical Society transactions*, v. 7, n. 5, p. 978, 1979.

DESPRÉS, JEAN-PIERRE; GOLAY, ALAIN; SJÖSTRÖM, LARS. Effects of rimonabant on metabolic risk factors in overweight patients with dyslipidemia. *New England Journal of Medicine*, v. 353, n. 20, p. 2121-2134, 2005.

DIAZ, O.; DELERS, F.; MAYNARD, M.; DEMIGNOT, S.; ZOULIM, F.; CHAMBAZ, J.; ANDRÉ, P. Preferential association of Hepatitis C virus with apolipoprotein B48-containing lipoproteins. *Journal of general virology*, v. 87, n. 10, p. 2983-2991, 2006.

DOUKYU, N. Characteristics and biotechnological applications of microbial cholesterol oxidases. *Applied microbiology and biotechnology*, v. 83, n. 5, p. 825-837, 2009.

DU, H.; CHANDAROY, P.; HUI, S. W. Grafted poly-(ethylene glycol) on lipid surfaces inhibits protein adsorption and cell adhesion. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, v. 1326, n. 2, p. 236-248, 1997.

EDWIN, F.; JAGANNADHAM, M. V. Anion-induced folding of rabbit muscle pyruvate kinase: Existence of multiple intermediate conformations at low pH. *Archives of biochemistry and biophysics*, v. 381, n. 1, p. 99-110, 2000.

EGGINS, B. R. Biosensors: An Introduction, West Sussex : John Wiley & Sons, 1996.

FABIAN, J.; HARTMANN, H. Azo Dyes. In: *Light Absorption of Organic Colorants*. Springer Berlin Heidelberg, p. 42-79, 1980.

FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; ARMISÉN, P.; SABUQUILLO, P.; FERNÁNDEZ-LORENTE, G.; GUISÁN, J. M. Immobilization of lipases by selective adsorption on hydrophobic supports. *Chemistry and physics of lipids*, v. 93, n. 1, p. 185-197, 1998.

FERNÁNDEZ-LORENTE, G.; PALOMO, J. M.; FUENTES, M.; MATEO, C.; GUIBAN, J. M.; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R. Self-assembly of *Pseudomonas fluorescens* lipase into bimolecular aggregates dramatically affects functional properties. *Biotechnology and bioengineering*, v. 82, n. 2, p. 232-237, 2003.

FUJISHIRO, K.; UCHIDA, H.; SHIMOKAWA, K.; NAKANO, M.; SANO, F.; OHTA, T.; UWAJIMA, T. Purification and properties of a new *Brevibacterium sterolicum* cholesterol oxidase produced by *E. coli* MM294/pnH10. *FEMS microbiology letters*, v. 215, n. 2, p. 243-248, 2002.

GARCIA-GALAN, C.; BERENGUER-MURCIA, Á.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; RODRIGUES, R. C. Potential of different enzyme immobilization strategies to improve enzyme performance. *Advanced Synthesis & Catalysis*, v. 353, n. 16, p. 2885-2904, 2011.

GARRET, R. H.; GRISHAM, C. M. *Biochemistry*, Saunders College Publishing. Orlando, 1995. p. 539-541.

GEIM, A. K.; NOVOSELOV, K. S. The rise of graphene. *Nature materials*, v. 6, n. 3, p. 183-191, 2007.

GILBERT, R. *Emulsion Polymerization: a Mechanistic Approach* Academic Press, London, 1995.

GODDARD, J. M.; HOTCHKISS, J. H. Polymer surface modification for the attachment of bioactive compounds. *Progress in polymer science*, v. 32, n. 7, p. 698-725, 2007.

GOKUS, T.; NAIR, R. R.; BONETTI, A.; BOHMLER, M.; LOMBARDO, A.; NOVOSELOV, K. S.; HARTSCHUH, A. Making graphene luminescent by oxygen plasma treatment. *ACS nano*, v. 3, n. 12, p. 3963-3968, 2009.

GOLDSTEIN, L. Kinetic behavior of immobilized enzyme systems. *Methods in enzymology*, v. 44, p. 397-443, 1976.

GOMATHI, P.; RAGUPATHY, D.; CHOI, J. H.; YEUM, J. H.; LEE, S. C.; KIM, J. C.; DO GHIM, H. Fabrication of novel chitosan nanofiber/gold nanoparticles composite towards improved performance for a cholesterol sensor. *Sensors and Actuators B: Chemical*, v. 153, n. 1, p. 44-49, 2011.

GOPALAN, A. I.; LEE, K. P.; RAGUPATHY, D. Development of a stable cholesterol biosensor based on multi-walled carbon nanotubes–gold nanoparticles composite covered with a layer of chitosan–room-temperature ionic liquid network. *Biosensors and Bioelectronics*, v. 24, n. 7, p. 2211-2217, 2009.

GRABOWSKI, E. F.; MORRISON, I. D. *In* Measurements of suspended particle by quase elastic light-scattering Particle size distributions from analysis of quase-elastic light-scattering data, B. Dahncke (ed.), Wiley-Interscience, NY, 1983.

GRIFFITHS, M. S.; BOSLEY, J. A. Assessment of macroporous polystyrene-based polymers for the immobilization of *Citrobacter freundii*. *Enzyme and microbial technology*, v. 15, n. 2, p. 109-113, 1993.

GROCHULSKI, P.; LI, Y.; SCHRAG, J. D.; CYGLER, M. Two conformational states of *Candida rugosa* lipase. *Protein Science*, v. 3, n. 1, p. 82-91, 1994.

GU, X.; YANG, G.; ZHANG, G.; ZHANG, D.; ZHU, D. A new fluorescence turn-on assay for trypsin and inhibitor screening based on graphene oxide. *ACS applied materials & interfaces*, v. 3, n. 4, p. 1175-1179, 2011.

GUIMARÃES, R.; STEDILE, F. C.; DOS SANTOS, J. H. Z. Ethylene polymerization with catalyst systems based on supported metallocenes with varying steric hindrance. *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical*, v. 206, n. 1, p. 353-362, 2003.

GUYÁDODSON, G. Structural and evolutionary relationships in lipase mechanism and activation. *Faraday discussions*, v. 93, p. 95-105, 1992.

HAMID, S. B. S.; OMAR, I. C. Determination of Total Cholesterol in Serum by Cholesterol Oxidase and Cholesterol Esterase Co-immobilized on to Cellulose Acetate Membrane. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, v. 6, n. 15, p. 1340-1344, 2003.

HATZINIKOLAOU, D. G.; KOURENTZI, E.; STAMATIS, H.; CHRISTAKOPOULOS, P.; KOLISIS, F. N.; KEKOS, D.; MACRIS, B. J. A novel lipolytic activity of *Rhodotorula glutinis* cells: production, partial characterization and application in the synthesis of esters. *Journal of bioscience and bioengineering*, v. 88, n. 1, p. 53-56, 1999.

HIRSH, S. L.; BILEK, M. M. M.; NOSWORTHY, N. J.; KONDYURIN, A.; DOS REMEDIOS, C. G.; MCKENZIE, D. R. A comparison of covalent immobilization and physical adsorption of a cellulase enzyme mixture. *Langmuir*, v. 26, n. 17, p. 14380-14388, 2010.

HLAVACEK, W. S.; POSNER, R. G.; PERELSON, A. S. Steric effects on multivalent ligand-receptor binding: exclusion of ligand sites by bound cell surface receptors. *Biophysical journal*, v. 76, n. 6, p. 3031-3043, 1999.

IACAZIO, G.; PÉRISSOL, C.; FAURE, B. A new tannase substrate for spectrophotometric assay. *Journal of microbiological methods*, v. 42, n. 3, p. 209-214, 2000.

IWUNZE, M. O. Aqueous Photophysical Parameters of Congo Red. *Spectroscopy Letters*, v. 43, n. 1, p. 16-21, 2010.

JIN, S. H.; KIM, D. H.; JUN, G. H.; HONG, S. H.; JEON, S. Tuning the photoluminescence of graphene quantum dots through the charge transfer effect of functional groups. *Acs Nano*, v. 7, n. 2, p. 1239-1245, 2013.

JOSEPH, K. S.; HAGE, David S. Characterization of the binding of sulfonylurea drugs to HSA by high-performance affinity chromatography. *Journal of Chromatography B*, v. 878, n. 19, p. 1590-1598, 2010.

JUNG, S. Y.; LIM, S. M.; ALBERTORIO, F.; KIM, G.; GURAU, M. C.; YANG, R. D.; CREMER, P. S. The Vroman effect: a molecular level description of fibrinogen displacement. *Journal of the American Chemical Society*, v. 125, n. 42, p. 12782-12786, 2003.

KADNIKOVA, E. N.; KOSTIĆ, N. M. Oxidation of ABTS by hydrogen peroxide catalyzed by horseradish peroxidase encapsulated into sol-gel glass.: Effects of glass matrix on reactivity. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 18, n. 1, p. 39-48, 2002.

KADOKAWA, JUN-ICHI; KOBAYASHI, SHIRO. Polymer synthesis by enzymatic catalysis. *Current opinion in chemical biology*, v. 14, n. 2, p. 145-153, 2010.

KASS, I. J.; SAMPSON, N. S. The importance of Glu 361 position in the reaction catalyzed by cholesterol oxidase. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, v. 8, n. 19, p. 2663-2668, 1998.

KATCHALSKI-KATZIR, E.; KRAEMER, D. M. Eupergit® C, a carrier for immobilization of enzymes of industrial potential. *Journal of molecular catalysis B: enzymatic*, v. 10, n. 1, p. 157-176, 2000.

KAZUSHIGE, Y.; ANDREW D, F.; AMANDA R, A.; DANIEL R, W.; RUEL E, M. Spectroscopic and calorimetric studies of Congo red dye-amyloid peptide complexes. *Journal of Biophysical Chemistry*, v. 2010, 2010.

KHAKH, B. S.; MICHEL, A.; HUMPHREY, P. P. Estimates of antagonist affinities at P 2X purinoceptors in rat vas deferens. *European journal of pharmacology*, v. 263, n. 3, p. 301-309, 1994.

KHURANA, R.; UVERSKY, V. N.; NIELSEN, L.; FINK, A. L. Is Congo red an amyloid-specific dye? *Journal of Biological Chemistry*, v. 276, n. 25, p. 22715-22721, 2001.

KLIBANOV, A. M. Stabilization of enzymes against thermal inactivation. *Advances in Applied Microbiology*, v. 29, n. 1, p. 28, 1983.

KOSAKA, P. M.; KAWANO, Y.; EL SEOUD, O. A.; PETRI, D. F. S. Catalytic activity of lipase immobilized onto ultrathin films of cellulose esters. *Langmuir*, v. 23, n. 24, p. 12167-12173, 2007.

- KOUASSI, G. K.; IRUDAYARAJ, J.; MCCARTY, G. Examination of cholesterol oxidase attachment to magnetic nanoparticles. *Journal of Nanobiotechnology*, v. 3, n. 1, 2005.
- KREIT, J.; SAMPSON, N. S. Cholesterol oxidase: physiological functions. *Febs Journal*, v. 276, n. 23, p. 6844-6856, 2009.
- KWON, O. H.; ITO, Y. Bioconjugation for enzyme technology. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*, v. 18, n. 1, p. 237-263, 2001.
- LADAM, G.; SCHAAF, P.; CUISINIER, F. J.; DECHER, G.; VOEGEL, J. C. Protein adsorption onto auto-assembled polyelectrolyte films. *Langmuir*, v. 17, n. 3, p. 878-882, 2001.
- LENDEL, C.; BERTONCINI, C. W.; CREMADES, N.; WAUDBY, C. A.; VENDRUSCOLO, M.; DOBSON, C. M.; TOTH, G. On the mechanism of nonspecific inhibitors of protein aggregation: dissecting the interactions of α -synuclein with Congo red and Lacmoid. *Biochemistry*, v. 48, n. 35, p. 8322-8334, 2009.
- LI, L.; FENG, W.; PAN, K. Immobilization of lipase on amino-cyclodextrin functionalized carbon nanotubes for enzymatic catalysis at the ionic liquid–organic solvent interface. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v. 102, p. 124-129, 2013.
- LI, Q.; FAN, F.; WANG, Y.; FENG, W.; JI, P. Enzyme immobilization on carboxyl-functionalized graphene oxide for catalysis in organic solvent. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, v. 52, n. 19, p. 6343-6348, 2013.

LI, ZAI JUN; XIA, QIAN FANG. Recent advances on synthesis and application of graphene as novel sensing materials in analytical chemistry. *Reviews in Analytical Chemistry*, v. 31, n. 1, p. 57-81, 2012.

LIMA, VALTER C. Coronary angiography and angioplasty in diabetic patients. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia*, v. 51, n. 2, p. 299-304, 2007.

LUO, Z.; VORA, P. M.; MELE, E. J.; JOHNSON, A. C.; KIKKAWA, J. M. Photoluminescence and band gap modulation in graphene oxide. *Applied physics letters*, v. 94, n. 11, p. 111909, 2009.

LYKLEMA, J.; NORDE, W. Interfacial behaviour of biomacromolecules. *Interfaces, Surfactants and Colloids in Engineering*. Steinkopff, p. 9-17, 1996.

MAGNUSSON, J. P.; BERSANI, S.; SALMASO, S.; ALEXANDER, C.; CALICETI, P. In Situ Growth of Side-Chain PEG Polymers from Functionalized Human Growth Hormone—A New Technique for Preparation of Enhanced Protein–Polymer Conjugates. *Bioconjugate chemistry*, v. 21, n. 4, p. 671-678, 2010.

MARTÍN-PALMA, R. J.; MANSO, M.; TORRES-COSTA, V. Optical biosensors based on semiconductor nanostructures. *Sensors*, v. 9, n. 7, p. 5149-5172, 2009.

MATEO, C.; PALOMO, J. M.; FERNANDEZ-LORENTE, G.; GUIBAN, J. M.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 40, n. 6, p. 1451-1463, 2007.

MORAES, M. L.; DE SOUZA, N. C.; HAYASAKA, C. O.; FERREIRA, M.; RODRIGUES FILHO, U. P.; RIUL, A.; OLIVEIRA, O. N. Immobilization of

cholesterol oxidase in LbL films and detection of cholesterol using ac measurements. *Materials Science and Engineering: C*, v. 29, n. 2, p. 442-447, 2009.

MORRISON, I. D.; GRABOWSKI. Particle size distributions from analyses of quasi-elastic light-scattering data, in: B. E. Dahneke (Ed.), *Measurement of Suspended Particles by Quase-Elastic Ligth Scattering*, Wiley, New York, p.199-236, 1983.

NAPPER, D. H. Steric stabilization and the Hofmeister series. *Journal of Colloid and Interface Science*, v. 33, n. 3, p. 384-392, 1970.

NAUCK, M.; MÄRZ, W.; WIELAND, H. Is lipoprotein (a) cholesterol a significant indicator of cardiovascular risk?. *Clinical chemistry*, v. 46, n. 3, p. 436-437, 2000.

NEL, A. E.; MÄDLER, L.; VELEGOL, D.; XIA, T.; HOEK, E. M. V.; SOMASUNDARAN, P.; KLAESSIG, F.; CASTRANOVA, V.; THOMPSON, M. Understanding biophysicochemical interactions at the nano-bio interface. *Nature Materials*. V. 8, p. 543-557, 2009.

NEL, A. E.; MÄDLER, L.; VELEGOL, D.; XIA, T.; HOEK, E. M.; SOMASUNDARAN, P.; THOMPSON, M. Understanding biophysicochemical interactions at the nano–bio interface. *Nature materials*, v. 8, n. 7, p. 543-557, 2009.

NETO, A. C.; GUINEA, F.; PERES, N. M. R.; NOVOSELOV, K. S.; GEIM, A. K. The electronic properties of graphene. *Reviews of modern physics*, v. 81, n. 1, p. 109, 2009.

NISHA, S.; KARTHICK, A. S.; GOBI, N. A review on methods, application and properties of immobilized enzyme. *Chemical Science Review and Letters*, v. 1, p. 148-155, 2012.

OZYILMAZ, G.; GEZER, E. Production of aroma esters by immobilized *Candida rugosa* and porcine pancreatic lipase into calcium alginate gel. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 64, n. 3, p. 140-145, 2010.

PALOMO, J. M.; FUENTES, M.; FERNÁNDEZ-LORENTE, G.; MATEO, C.; GUISAN, J. M.; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R. General trend of lipase to self-assemble giving bimolecular aggregates greatly modifies the enzyme functionality. *Biomacromolecules*, v. 4, n. 1, p. 1-6, 2003.

PALOMO, J. M.; ORTIZ, C.; FERNÁNDEZ-LORENTE, G.; FUENTES, M.; GUISÁN, J. M.; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R. Lipase–lipase interactions as a new tool to immobilize and modulate the lipase properties. *Enzyme and microbial technology*, v. 36, n. 4, p. 447-454, 2005.

PALOMO, J. M.; ORTIZ, C.; FUENTES, M.; FERNANDEZ-LORENTE, G.; GUISAN, J. M.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Use of immobilized lipases for lipase purification via specific lipase–lipase interactions. *Journal of Chromatography A*, v. 1038, n. 1, p. 267-273, 2004.

PANCERA, S. M.; DA SILVA, L. H.; LOH, W.; ITRI, R.; PESSOA, A.; PETRI, D. F. S. The effect of poly (ethylene glycol) on the activity and structure of glucose-6-phosphate dehydrogenase in solution. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v. 26, n. 4, p. 291-300, 2002.

PANCERA, S. M.; ITRI, R.; PETRI, D. F. S. Small-Angle X-Ray Scattering on Solutions of Carboxymethylcellulose and Bovine Serum Albumin. *Macromolecular bioscience*, v. 5, n. 4, p. 331-336, 2005.

PANCERA, S. M.; PETRI, D. F. S.; ITRI, R. The effect of poly (ethylene glycol) on the activity, structural conformation and stability of yeast hexokinase. In: *Surface and Colloid Science*. Springer Berlin Heidelberg, p. 178-183, 2004.

PAVLIDIS, I. V.; VORHABEN, T.; GOURNIS, D.; PAPADOPOULOS, G. K.; BORNSCHEUER, U. T.; STAMATIS, H. Regulation of catalytic behaviour of hydrolases through interactions with functionalized carbon-based nanomaterials. *Journal of Nanoparticle Research*, v. 14, n. 5, p. 1-10, 2012.

PECORA, R. Dynamic light scattering measurement of nanometer particles in liquids. *Journal of nanoparticle research*, v. 2, n. 2, p. 123-131, 2000.

PEREIRA, E. B.; ZANIN, G. M.; CASTRO, H. F. Immobilization and catalytic properties of lipase on chitosan for hydrolysis and esterification reactions. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, v. 20, n. 4, p. 343-355, 2003.

PIERRE, S. J.; THIES, J. C.; DUREAULT, A.; CAMERON, N. R.; VAN HEST, J. C.; CARETTE, N.; WEBERSKIRCH, R. Covalent enzyme immobilization onto photopolymerized highly porous monoliths. *Advanced Materials*, v. 18, n. 14, p. 1822-1826, 2006.

PIGORSCH, E.; ELHADDAOUI, A.; TURRELL, S. Studies of the binding mechanism of Congo red to poly (L-lysine) by absorption and circular dichroism spectroscopy. *Journal of molecular structure*, v. 348, p. 61-64, 1995.

POLIZELLI, P. P.; TIERA, M. J.; BONILLA-RODRIGUEZ, G. O. Effect of surfactants and polyethylene glycol on the activity and stability of a lipase from oilseeds of *Pachira aquatica*. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, v. 85, n. 8, p. 749-753, 2008.

PRASAD, J.; JOSHI, A.; JAYANT, R. D.; SRIVASTAVA, R. Cholesterol biosensors based on oxygen sensing alginate-silica microspheres. *Biotechnology and bioengineering*, v. 108, n. 9, 2011.

QUINTÃO, E.; GRUNDY, S. M.; AHRENS, E. H. Effects of dietary cholesterol on the regulation of total body cholesterol in man. *Journal of lipid research*, v. 12, n. 2, p. 233-247, 1971.

RABE, M.; VERDES, D.; SEEGER, S. Understanding protein adsorption phenomena at solid surfaces. *Advances in colloid and interface science*, v. 162, n. 1, p. 87-106, 2011.

RAM, M. K.; BERTONCELLO, P.; DING, H.; PADDEU, S.; NICOLINI, C. Cholesterol biosensors prepared by layer-by-layer technique. *Biosensors and Bioelectronics*, v. 16, n. 9, p. 849-856, 2001.

RECHENDORFF, K.; HOVGAARD, M. B.; FOSS, M.; ZHDANOV, V. P.; BESENBACHER, F. Enhancement of protein adsorption induced by surface roughness. *Langmuir*, v. 22, n. 26, p. 10885-10888, 2006.

REN, Y. P.; KONG, X. J.; HU, X. Y.; SUN, M.; LONG, L. S.; HUANG, R. B.; ZHENG, L. S. Influence of steric hindrance of organic ligand on the structure of Keggin-based coordination polymer. *Inorganic chemistry*, v. 45, n. 10, p. 4016-4023, 2006.

REN, Y.; RIVERA, J. G.; HE, L.; KULKARNI, H.; LEE, D. K.; MESSERSMITH, P. B. L. Facile, high efficiency immobilization of lipase enzyme on magnetic iron oxide nanoparticles via a biomimetic coating. *BMC biotechnology*, v. 11, n. 1, p. 63, 2011.

RIDKER, P. M.; RIFAI, N.; ROSE, L.; BURING, J. E.; COOK, N. R. Comparison of C-reactive protein and low-density lipoprotein cholesterol levels in the prediction of first cardiovascular events. *New England journal of medicine*, v. 347, n. 20, p. 1557-1565, 2002.

RODRIGUES, R. C.; ORTIZ, C.; BERENGUER-MURCIA, Á.; TORRES, R.; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R. Modifying enzyme activity and selectivity by immobilization. *Chemical Society Reviews*, v. 42, n. 15, p. 6290-6307, 2013.

Sacks, F. M.; Alaupovic, P.; Moye, L. A.; Cole, T. G.; Sussex, B.; Stampfer, M. J.; Braunwald, E. VLDL, apolipoproteins B, CIII, and E, and risk of recurrent coronary events in the Cholesterol and Recurrent Events (CARE) trial. *Circulation*, v. 102, n. 16, p. 1886-1892, 2000.

SAFAVI, A.; FARJAMI, F. Electrodeposition of gold–platinum alloy nanoparticles on ionic liquid–chitosan composite film and its application in fabricating an amperometric cholesterol biosensor. *Biosensors and Bioelectronics*, v. 26, n. 5, p. 2547-2552, 2011.

SAJJADI, S.; BROOKS, B. W. Unseeded semibatch emulsion polymerization of butyl acrylate: bimodal particle size distribution. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*, v. 38, n. 3, p. 528-545, 2000.

SAJJADI, S.; JAHANZAD, F. Comparative study of monomer droplet nucleation in the seeded batch and semibatch miniemulsion polymerisation of styrene. *European polymer journal*, v. 39, n. 4, p. 785-794, 2003.

SALIMI, A.; HALLAJ, R.; SOLTANIAN, S. Fabrication of a Sensitive Cholesterol Biosensor Based on Cobalt-oxide Nanostructures Electrodeposited onto Glassy Carbon Electrode. *Electroanalysis*, v. 21, n. 24, p. 2693-2700, 2009.

SAMPSON, N. S.; KASS, I. J.; GHOSHROY, K. B. Assessment of the role of an Ω loop of cholesterol oxidase: a truncated loop mutant has altered substrate specificity. *Biochemistry*, v. 37, n. 16, p. 5770-5778, 1998.

Santos, R. D.; Gagliardi, A. C. M.; Xavier, H. T.; Magnoni, C. D.; Cassani, R.; Lottenberg, A. M. I Diretriz sobre o consumo de gorduras e saúde cardiovascular. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*, v. 100, n. 1, p. 1-40, 2013.

SASSOLAS, A.; BLUM, L. J.; LECA-BOUVIER, B. D. Immobilization strategies to develop enzymatic biosensors. *Biotechnology Advances*, v. 30, n. 3, p. 489-511, 2012.

SAXENA, U.; CHAKRABORTY, M.; GOSWAMI, P. Covalent immobilization of cholesterol oxidase on self-assembled gold nanoparticles for highly sensitive amperometric detection of cholesterol in real samples. *Biosensors and Bioelectronics*, v. 26, n. 6, p. 3037-3043, 2011.

SCHROËN; COHEN STUART; VOORT MAARSCHALK; PADT; RIET, K. VAN 'T. Influence of preadsorbed block copolymers on protein adsorption: surface properties, layer thickness, and surface coverage. *Langmuir*, v. 11, n. 8, p. 3068-3074, 1995.

SCHULZ, Isio. Tratamento das dislipidemias: como e quando indicar a combinação de medicamentos hipolipemiantes. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia*, v. 50, n. 2, p. 344-359, 2006.

SCHWARZ, S.; EICHHORN, K. J.; WISCHERHOFF, E.; LASCHEWSKY, A. Polyelectrolyte adsorption onto planar surfaces: a study by streaming potential and ellipsometry measurements. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, v. 159, n. 2, p. 491-501, 1999.

SEGER, B.; KAMAT, P. V. Electrocatalytically active graphene-platinum nanocomposites. Role of 2-D carbon support in PEM fuel cells. *The Journal of Physical Chemistry C*, v. 113, n. 19, p. 7990-7995, 2009.

SHARMA, R.; CHISTI, Y.; BANERJEE, U. C. Production, purification, characterization, and applications of lipases. *Biotechnology advances*, v. 19, n. 8, p. 627-662, 2001.

SHAW, D. J. introduction to Colloid and Surface Chemistry, ButterWorth & Co. (Publisher) Ltda, Oxford, U. K., 1992.

SHELDON, R. A. Enzyme immobilization: the quest for optimum performance. *Advanced Synthesis & Catalysis*, v. 349, n. 8-9, p. 1289-1307, 2007.

SHELDON, R. A.; VAN PELT, S. Enzyme immobilisation in biocatalysis: why, what and how. *Chemical Society Reviews*, v. 42, n. 15, p. 6223-6235, 2013.

SHIH, WEI-CHUNG; YANG, MEI-CHUN; LIN, MENG SHAN. Development of disposable lipid biosensor for the determination of total cholesterol. *Biosensors and Bioelectronics*, v. 24, n. 6, p. 1679-1684, 2009.

SILVA, R. A.; CARMONA-RIBEIRO, A. M.; PETRI, D. F. S. Catalytic behavior of lipase immobilized onto Congo red and PEG-decorated particles. *Molecules*, v. 19, n. 6, p. 8610-8628, 2014.

SILVA, R. A.; CARMONA-RIBEIRO, A. M.; PETRI, D. F. S. Enzymatic activity of cholesterol oxidase immobilized onto polymer nanoparticles mediated by Congo red. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v. 110, p. 347-355, 2011.

SILVA, R. A.; CARMONA-RIBEIRO, A. M.; PETRI, D. F. S. Enzymatic activity of cholesterol oxidase immobilized onto polymer nanoparticles mediated by Congo red. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v. 110, p. 347-355, 2013.

SILVA, R. A.; URZÚA, M. D.; PETRI, D. F. S.; DUBIN, P. L. Protein adsorption onto polyelectrolyte layers: Effects of protein hydrophobicity and charge anisotropy. *Langmuir*, v. 26, n. 17, p. 14032-14038, 2010.

SIZER, I. W. Effects of temperature on enzyme kinetics. *Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology*, v. 3, p. 35-62, 2006.

SOARES, V. A.; SEVERINO, D.; JUNQUEIRA, H. C.; TERSARIOL, I. L.; SHIDA, C. S.; BAPTISTA, M. S.; NANTES, I. L. Light-Driven Horseradish Peroxidase Cycle by Using Photo-activated Methylene Blue as the Reducing Agent. *Photochemistry and photobiology*, v. 83, n. 5, p. 1254-1262, 2007.

SOFIA, S. J.; PREMNATH, V.; MERRILL, E. W. Poly (ethylene oxide) grafted to silicon surfaces: grafting density and protein adsorption. *Macromolecules*, v. 31, n. 15, p. 5059-5070, 1998.

SOLANKI, P. R.; KAUSHIK, A.; ANSARI, A. A.; TIWARI, A.; MALHOTRA, B. D. Multi-walled carbon nanotubes/sol-gel-derived silica/chitosan nanobiocomposite for total cholesterol sensor. *Sensors and Actuators B: Chemical*, v. 137, n. 2, p. 727-735, 2009.

SONG, M. J.; KIM, J. H.; LEE, S. K.; LIM, D. S.; HWANG, S. W.; WHANG, D. Analytical Characteristics of Electrochemical Biosensor Using Pt-Dispersed Graphene on Boron Doped Diamond Electrode. *Electroanalysis*, v. 23, n. 10, p. 2408-2414, 2011.

SPOSITO, A. C.; CARAMELLI, B.; FONSECA, F. A.; BERTOLAMI, M. C.; AFIUNE NETO, A.; SOUZA, A. D.; SANTOS, F. IV Diretriz brasileira sobre dislipidemias e prevenção da aterosclerose: Departamento de Aterosclerose da Sociedade Brasileira de Cardiologia. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*, v. 88, p. 2-19, 2007.

STEFANICK, M. L.; MACKEY, S.; SHEEHAN, M.; ELLSWORTH, N.; HASKELL, W. L.; WOOD, P. D. Effects of diet and exercise in men and postmenopausal women with low levels of HDL cholesterol and high levels of LDL cholesterol. *New England Journal of Medicine*, v. 339, n. 1, p. 12-20, 1998.

STÖCKEL, J.; HARTL, F. U. Chaperonin-mediated de novo generation of prion protein aggregates. *Journal of molecular biology*, v. 313, n. 4, p. 861-872, 2001.

SU, L. C.; CHEN, R. C.; LI, Y. C.; CHANG, Y. F.; LEE, Y. J.; LEE, C. C.; CHOU, C. L. Detection of prostate-specific antigen with a paired surface plasma wave biosensor. *Analytical chemistry*, v. 82, n. 9, p. 3714-3718, 2010.

SUN, S.; BERNSTEIN, E. R. Aromatic van der Waals clusters: structure and nonrigidity. *The Journal of Physical Chemistry*, v. 100, n. 32, p. 13348-13366, 1996.

TAN, T.; LU, J.; NIE, K.; DENG, L.; WANG, F. Biodiesel production with immobilized lipase: a review. *Biotechnology Advances*, v. 28, n. 5, p. 628-634, 2010.

TANG, L.; WANG, Y.; LI, Y.; FENG, H.; LU, J.; LI, J. Preparation, structure, and electrochemical properties of reduced graphene sheet films. *Advanced Functional Materials*, v. 19, n. 17, p. 2782-2789, 2009.

THORMANN, E.; SIMONSEN, A. C.; HANSEN, P. L.; MOURITSEN, O. G. Interactions between a polystyrene particle and hydrophilic and hydrophobic surfaces in aqueous solutions. *Langmuir*, v. 24, n. 14, p. 7278-7284, 2008.

TIAN, YE; JIANG, YUE; OU, SHIYI. Interaction of cellulase with three phenolic acids. *Food chemistry*, v. 138, n. 2, p. 1022-1027, 2013.

TITOV, A. V.; KRÁL, PETR; PEARSON, R. Sandwiched graphene– membrane superstructures. *ACS nano*, v. 4, n. 1, p. 229-234, 2009.

TURBILL, P.; BEUGELING, T.; POOT, A. A. Proteins involved in the Vroman effect during exposure of human blood plasma to glass and polyethylene. *Biomaterials*, v. 17, n. 13, p. 1279-1287, 1996.

TÜZMEN, N.; KALBURCU, T.; DENIZLI, A. Immobilization of catalase via adsorption onto metal-chelated affinity cryogels. *Process Biochemistry*, v. 47, n. 1, p. 26-33, 2012.

UMAR, A.; RAHMAN, M. M.; VASEEM, M.; HAHN, Y. B. Ultra-sensitive cholesterol biosensor based on low-temperature grown ZnO nanoparticles. *Electrochemistry Communications*, v. 11, n. 1, p. 118-121, 2009.

VIDAL, J. C.; GARCIA-RUIZ, E.; ESPUELAS, J.; ARAMENDIA, T.; CASTILLO, J. R. Comparison of biosensors based on entrapment of cholesterol oxidase and cholesterol esterase in electropolymerized films of polypyrrole and diaminonaphthalene derivatives for amperometric determination of cholesterol. *Analytical and bioanalytical chemistry*, v. 377, n. 2, p. 273-280, 2003.

VRIELINK A.; GHISLA, S. Cholesterol oxidase: biochemistry and structural features. *Febs Journal*, v. 276, n. 23, p. 6826-6843, 2009.

WANG, Y.; LI, Y.; TANG, L.; LU, J.; LI, J. Application of graphene-modified electrode for selective detection of dopamine. *Electrochemistry Communications*, v. 11, n. 4, p. 889-892, 2009 b.

WANG, Y.; LI, Z.; WANG, J.; LI, J.; LIN, Y. Graphene and graphene oxide: biofunctionalization and applications in biotechnology. *Trends in biotechnology*, v. 29, n. 5, p. 205-212, 2011.

WANG, Y.; LU, J.; TANG, L.; CHANG, H.; LI, J. Graphene oxide amplified electrogenerated chemiluminescence of quantum dots and its selective sensing for glutathione from thiol-containing compounds. *Analytical chemistry*, v. 81, n. 23, p. 9710-9715, 2009 a.

WAUGH, N.; BLACK, C.; WALKER, S.; MCINTYRE, L.; CUMMINS, E.; HILLIS, G. S. The effectiveness and cost-effectiveness of computed tomography screening for coronary artery disease: systematic review. *Health Technology Assessment*, v. 10, n. 39, 2006.

WILSON, L.; PALOMO, J. M.; FERNÁNDEZ-LORENTE, G.; ILLANES, A.; GUISÁN, J. M.; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R. Effect of lipase–lipase interactions in the activity, stability and specificity of a lipase from *Alcaligenes* sp. *Enzyme and microbial technology*, v. 39, n. 2, p. 259-264, 2006.

WU, J. C.; HE, Z. M.; YAO, C. Y.; YU, K. T. Increased activity and stability of *Candida rugosa* lipase in reverse micelles formed by chemically modified AOT in

isooctane. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, v. 76, n. 9, p. 949-953, 2001.

Xiong, R.; Li, Z.; Mi, L.; Wang, P. N.; Chen, J. Y.; Wang, L.; Yang, W. L. Study on the intracellular fate of Tat peptide-conjugated quantum dots by spectroscopic investigation. *Journal of fluorescence*, v. 20, n. 2, p. 551-556, 2010.

YAHYA, A.; ANDERSON, W.; MOO-YOUNG, M. Ester synthesis in lipase-catalyzed reactions. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 23, n. 7, p. 438-450, 1998.

YAMAKI, S. B.; BARROS, D. S.; GARCIA, C. M.; SOCOLOSKI, P.; OLIVEIRA, O. N.; ATVARIS, T. D. Spectroscopic studies of the intermolecular interactions of Congo red and tinopal CBS with modified cellulose fibers. *Langmuir*, v. 21, n. 12, p. 5414-5420, 2005.

YE, P.; HAN, Z. P.; XU, Y. J.; HU, P. C.; TONG, J. J. Effect of support surface chemistry on lipase adsorption and activity. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 94, p. 69-76, 2013.

YU, J.; WEI, X.; ZHANG, L.; FANG, X.; YANG, T.; HUANG, F.; LIANG, W. Poly (ethylene glycol)-Mediated Conformational Alteration of α -Chymotrypsin Prevents Inactivation of Insulin by Stabilizing Active Intermediates. *Molecular pharmaceuticals*, v. 11, n. 10, p. 3361-3370, 2014.

ZHANG, DONG-HAO; YUWEN, LI-XIA; PENG, LI-JUAN. Parameters affecting the performance of immobilized enzyme. *Journal of Chemistry*, v. 2013, p. 1-8, 2013.

ZHANG, J.; ZHANG, F.; YANG, H.; HUANG, X.; LIU, H.; ZHANG, J.; GUO, S. Graphene oxide as a matrix for enzyme immobilization. *Langmuir*, v. 26, n. 9, p. 6083-6085, 2010.

ZHANG, Y.; CREMER, P. S. Interactions between macromolecules and ions: the Hofmeister series. *Current opinion in chemical biology*, v. 10, n. 6, p. 658-663, 2006.

ZHANG, Y.; TAN, Y. W.; STORMER, H. L.; KIM, P. Experimental observation of the quantum Hall effect and Berry's phase in graphene. *Nature*, v. 438, n. 7065, p. 201-204, 2005.

Parte B: Sensores Nanomecânicos

Capítulo I: Estudo do Comportamento de intumescimento e desintumescimento de filmes finos de PHEMA por sensores nanomecânicos.

Capítulo II: Detecção de biomarcador cancerígeno em sangue por meio de um sensor nanomecânico

1 - Introdução

A Parte B desta tese descreve as atividades realizadas durante o estágio de Doutorado Sanduiche em cooperação com o grupo liderado por Tamayo e colaboradores no Instituto de Microeletrônica de Madri, Espanha. Este grupo possui expertise no desenvolvimento de sensores nanomecânicos baseados em *microcantilevers* (MCs).

MCs como sensores nanomecânicos tem se tornado uma ferramenta promissora na detecção de eventos físico-químicos com elevada precisão, e a transdução desses eventos pode ser realizada por avaliação de mudanças de massa, temperatura e estresse de superfície (MARTÍNEZ et al., 2010). Estes nanosensores surgiram por meio da técnica de Microscopia de Força Atômica (*Atomic Force Microscopy*, AFM) (FRITZ, 2008), porém os MCs usados como sensores se diferenciam dos utilizados no AFM por não possuírem ponta, ao passo que a morfologia não é o parâmetro de interesse e sim as variações de frequência de ressonância e/ou de deflexão causadas por interações de forças intermoleculares entre a sua superfície sólida e as moléculas adsorvidas (CARRASCOSA et al., 2006). MCs são fabricados em materiais poliméricos, silício ou nitreto de silício (TAMAYO et al., 2013; CALLEJA et al., 2006; SADEGHIAN et al., 2008). Materiais poliméricos são interessantes na confecção dos MCs por fornecerem maior sensibilidade em medidas de deflexão estática (será discutida mais profundamente) e por fornecerem também módulo de Young menores (CALLEJA et al., 2006). No caso dos MCs fabricados em silício ou nitreto de silício, a reprodutibilidade no perfil de camada de moléculas imobilizadas faz desses materiais os mais utilizados no desenvolvimento de biosensores, bem como as excelentes propriedades mecânicas exibidas, tais como elevada elasticidade, rigidez, resistência à fratura e a fadiga,

estabilidade e condutividade térmica, as quais podem influenciar significativamente na constante de mola e no módulo de Young (MAUTE et al., 1999; FRITZ, 2008). Apesar das dimensões dos MCs estarem na escala micrométrica, devido ao seu deslocamento nanométrico são geralmente chamados de sensores nanomecânicos. Estes deslocamentos nanométricos podem ser mensurados por feixe ótico, piezo resistividade, piezoelectricidade, interferometria, capacitância e tunelamento elétrico (DAO et al., 2010).

Sensores nanomecânicos podem ser operados no modo estático (Figura 1b) ou no modo dinâmico (Figura 1c) (SADEGHIAN et al., 2008). No modo estático, variações de deflexão do MC estão relacionadas com a diferença na tensão superficial em suas duas faces, os quais são mensurados. Neste modo de operação medem-se mudanças na energia livre superficial decorrente de forças intermoleculares ou reorganização de cargas. O modo estático pode ser usado como um mecanismo de detecção funcionalizando-se apenas uma superfície do MC como camada detectora. Isso se faz necessário para maximizar o decréscimo da densidade de energia livre superficial em somente um lado do MC e, desta forma, criar um microambiente favorável a mudanças no estresse de superfície, o qual será compensado por meio de eventos de deflexão. Um deslocamento da posição do MC (Figura 1b) irá, assim, indicar se o material interagiu com a superfície (KOSAKA et al., 2013). No modo dinâmico, as mudanças nos valores de frequência de ressonância são causadas pelo aumento da massa do MC. As mudanças na frequência ocorrem como consequência da massa do material adicionado em qualquer superfície do MC e, em muitos casos, também pode ocorrer devido a alterações da rigidez da camada detectora (CRAIGHEAD, 2007).

Para avaliar eventos físico-químicos devido à funcionalização dos MCs, medidas de frequência de ressonância são avaliadas através da incidência de um feixe de laser centrado na extremidade final livre de um MC, o qual é refletido até um fotodetector sensível (CRAIGHEAD, 2007). À medida que o chip é excitado por um piezoeleto, ocorrem variações na posição do feixe de laser refletido no fotodetector devido a oscilações da extremidade livre do MC, e consequentemente obtemos através de um feedback com um computador valores correspondentes a frequência de ressonância do MC. No caso da deflexão, o estresse de superfície causa mudança na curvatura do MC, o qual é mensurado pelo laser refletido no fotodetector. A frequência de ressonância, f , de um MC oscilante pode ser expressa conforme a equação 1:

$$f = \frac{1}{2\pi} \sqrt{\frac{k}{m^*}} \quad (1)$$

onde K é a constante de mola e m^* é a massa efetiva do cantilever, respectivamente.

A massa efetiva do MC, m_b , pode ser relacionada com a sua geometria, através da relação $m^* = n \cdot m_b$, onde n é um parâmetro de geometria. Portanto, a frequência de ressonância pode mudar devido a mudanças de massa e mudanças na constante de mola (PALIK, 1998).

A variação do estresse de superfície, $\Delta\sigma$, é obtida por meio da medida da mudança de curvatura de um MC pela aplicação da equação de Stoney, equação 2, (CRAIGHEAD, 2007), a qual relaciona o estresse de superfície ($\Delta\sigma$) e a mudança de curvatura (Δz):

$$\Delta z = \frac{6(1-\nu)}{Eh^2} \Delta\sigma \quad (2)$$

onde ν representa o coeficiente de Poisson, h a espessura do cantilever e E o módulo de Young. A Figura 1a mostra o esquema experimental de detecção montado em uma

câmara ambiental e as Figuras 1b e 1c ilustram os modos de operação estático e dinâmico respectivamente.

Figura 1 – (a) Esquema do sistema experimental. Modos de operação dos sensores nanomecânicos: (b) modo estático e (c) modo dinâmico.

Os sensores baseados nos MCs dependem fortemente da especificidade da camada do receptor imobilizado e do comportamento exibido pela molécula alvo durante o processo de imobilização, a qual causará uma resposta nanomecânica resultante da interação do substrato com o adsorbato e consequentemente originará mudanças de deformação (deflexões) ou de frequência de ressonância (SHU et al., 2005; Stoney, 1909). A deformação é normalmente relacionada com as mudanças no estresse de superfície, e consequentemente depende das interações das forças intermoleculares entre o complexo molecular ancorado e a superfície do MC, tais como, forças de van der Waals, forças eletrostáticas, interações hidrofóbicas, ligações de hidrogênio e forças estéricas, as quais requerem um recobrimento somente em um lado do sensor para atuarem significativamente (GODIN et al., 2010), conforme comentado anteriormente. Existem dois mecanismos para gerar o estresse de superfície, sendo o primeiro causado pelo surgimento de uma redistribuição das nuvens eletrônica ao redor dos átomos da superfície, que modificam as interações interatômicas (SHIH; CHEN; WU, 2014). Esta

fonte de estresse de superfície ocorre significativamente em processos de quimissorção, onde a transferência de elétrons entre o adsorbato e os átomos da superfície pode ocorrer mais facilmente, e isto faz com que o estresse de superfície por este mecanismo seja linearmente proporcional a área da superfície recoberta (HAGAN; MAJUMDAR; CHAKRABORTY, 2002). O segundo mecanismo se deve as interações no plano entre o complexo molecular e a superfície do adsorbato, causada por forças eletrostáticas, ligações de hidrogênio, forças induzidas pela perda entrópica e interações de dessolvatação (HAGAN; MAJUMDAR; CHAKRABORTY, 2002). As mudanças da frequência de ressonância, sendo a ressonância flexural a de interesse, ocorrem como consequência da massa adicionada sobre a superfície do sensor e em muitos casos podem ser influenciadas pelas mudanças na rigidez mecânica do MC (SADER, 2001). A adsorção de uma molécula em um lado do sistema nanomecânico induz a um estresse de superfície (superfície ativa), o qual aumenta com a ligação de uma molécula alvo. O estresse de superfície é explicado pela quantidade de trabalho reversível por unidade de área necessária para ampliar uma superfície (TAMAYO et al., 2006).

A chave para o uso dos MCs para a detecção de eventos físico-químicos é a sua habilidade de ser funcionalizado. No capítulo I da Parte B desta tese recobrimos os nanosensores com material polimérico. A utilização de polímeros como revestimento de sensores apresenta-se promissor devido à sua capacidade de absorver uma grande variedade de diferentes moléculas (TANCHAK; BARRETT, 2004). No caso de polímeros que sofrem intumescimento, os mesmos são interessantes, pois as flexibilidades de suas cadeias poliméricas podem facilitar que determinadas moléculas possam ser facilmente adsorvidas pela rede tridimensional do polímero (DAI et al., 2001), podendo no caso de biomoléculas, como por exemplo, enzimas, proteínas, DNA

e RNA; conservar a sua estrutura nativa ou minimizar possíveis mudanças conformacionais em suas estruturas terciárias que podem vir a causar a perda de sua atividade catalítica (CHIBATA, 1978). O polímero escolhido para ser revestido sobre os MCs foi poli (2-hidroxietil metacrilato) (PHEMA), o qual possui a capacidade de formar hidrogel em água através de seu intumescimento, tornando a sua aplicação na produção de lentes de contato flexíveis, uma das mais relevantes (BRANDA et al., 2001). Devido à rotação em torno de seu carbono central quando forma hidrogel em contato com água, o grupo metila (grupo apolar) da molécula de PHEMA se orienta para a interface sólido-ar, fazendo com que o material frágil e flexível pode ser polido como lente corretiva de visão, e sua elevada hidratação o tornam confortável quando em contato com o globo ocular (STANG; KEILHOFF; FANSA, 2009). Lentes de contato para a correção da visão têm sido usadas a mais de 30 anos como alternativa ao uso de óculos. Apesar de muitos avanços para melhorar o conforto e a biocompatibilidade das lentes de contato, as propriedades interfaciais ainda não são bem compreendidas. Um exemplo é o estado de hidratação do PHEMA, o qual está diretamente relacionado com a permeabilidade do oxigênio e as propriedades mecânicas deste polímero (CHROMECEK et al., 1981; WANG et al., 2008). Ainda que muitas estratégias tenham sido desenvolvidas para mensurar a água contida na matriz polimérica, essas técnicas são demoradas e geralmente fornecem estimativas aproximadas do estado de hidratação de biopolímeros (GHI; HILL; WHITTAKER, 2002; HOFFMAN, 2012). Portanto, a compreensão do comportamento de determinados polímeros frente a situações que induzem ao seu intumescimento ou desintumescimento são interessantes, pois podemos relacionar as suas propriedades físico-químicas com uma ampla variedade de aplicações, tais como retardamento da metástase tumoral (CHUNG; RUBNER, 2002),

liberação controlada de fármaco (SHI; CARUSO, 2001), e biopolímeros como suporte para o crescimento de ossos artificiais (MENDELSON et al., 2003).

Tendo em vista a influência significativa do processo de intumescimento nos eventos de deflexão e mudanças na frequência de ressonância dos MCs recobertos com PHEMA, uma discussão mais profunda se faz necessária. O processo de intumescimento resulta na absorção de solvente entre as redes das cadeias poliméricas, o qual induz aumento de sua massa e volume, sendo esse comportamento fortemente dependente da estrutura química do polímero (TSUI, 2008). Como o PHEMA possui grupos polares em sua estrutura química, como grupos hidroxilas e carbonilas durante o processo de intumescimento devem ocorrer possivelmente formação de ligações de hidrogênio entre as moléculas de água e os resíduos polares da cadeia polimérica. Quando o intumescimento da matriz polimérica é causado pela penetração de água, como no caso do PHEMA, a interação deste solvente com o polímero resulta em hidrogel (STANG; KEILHOFF; FANSA, 2009). Hidrogéis têm atraído grande atenção como biomateriais devido à semelhança de suas propriedades físicas com os tecidos vivos, tais como elevado conteúdo de água, consistência elástica e baixa tensão superficial (SOUZA; ANDRADE, 2000). Os hidrogéis são adequados para uma vasta gama de aplicações biomédicas e farmacêuticas como, por exemplo, cateteres, substratos de culturas de microrganismos, membranas de hemodiálise, imobilização de enzimas, lentes de contato flexíveis, entre outros. A biocompatibilidade em longo prazo e funcionalidade depende fortemente da capacidade de intumescimento do gel e de interação com o fluido circundante (OPDAHL et al., 2003). Dados reportados na literatura evidenciam que a água em hidrogel é descrita pela existência de três estados, água ligada, água intermediária e água livre, sendo este modelo proposto por Jhon e

Andrade (JHON; ANDRADE, 1973), baseado na estrutura da água próxima a interface sólido-líquido e em géis macromoleculares. A água ligada é associada com moléculas de água que formam ligações de hidrogênio com grupos polares da cadeia polimérica, ou que interage fortemente com resíduos iônicos destas cadeias (SEKINE; IKEDA-FUKAZAWA, 2009). A água livre consiste das moléculas de água que possuem uma estrutura similar com a água do **bulk**, e sua interação com o polímero é negligenciável. A água intermediária está entre a água verdadeiramente ligada e a água livre, e interage fracamente com as cadeias poliméricas (SEKINE; IKEDA-FUKAZAWA, 2009). Bumbu e colaboradores (BUMBU et al., 2007) reportaram seus estudos cinéticos sobre o comportamento de intumescimento e desintumescimento do poli (metacrilato de metila) (PMMA) em MCs, e verificaram a dependência deste comportamento (deflexão do MC) com a qualidade do solvente (mistura de solvente e não solvente) em diferentes razões de mistura de acetato de etila e isopropanol. Eles concluíram que a evolução da espessura polimérica resulta do significativo aumento de pressão osmótica dentro da matriz polimérica. Entretanto, nenhuma avaliação do PHEMA em diferentes massas molares baseados em MCs em ciclos de umidade controlada foi realizada até então.

Para efeito de avaliação e comparação, poliestireno (PS) foi utilizado como controle sob as mesmas condições experimentais na resposta da deflexão do MC. Sabe-se que o PS possui característica hidrofóbica, com ângulo de contato de aproximadamente 85° com a água, que não favorece intumescimento por este solvente (FAGHIHNEJAD; ZENG, 2012). Deste modo, este polímero mostra-se com um excelente candidato.

Outro fator importante na confecção de filmes finos de PHEMA e PS para sensores baseados em MCs é a evaporação do solvente, a qual possui uma função muito

importante na uniformidade de filmes produzidos por *spin coating*, e consequentemente os balanços das interações formadas pela superfície de silício do MC, pelo polímero e pelo solvente não devem ser negligenciados (AMIM JR; KOSAKA; PETRI, 2008). Devido à hidrofobicidade do PS, as interações superfície-polímero são desfavoráveis, e as cadeias poliméricas tendem a minimizar o contato com superfície do MC, fazendo com que qualquer defeito no filme cause seu desprendimento. Neste caso as interações polímero-solvente são mais fortes que as interações polímero-superfície, e desta forma as cadeias poliméricas se distanciam o máximo possível da superfície (AMIM JR et al., 2009). Entretanto, no caso do PHEMA, sua estrutura química é rica em grupos polares como hidroxilas e grupos carbonilas, espera-se que estes grupos formem pontes de hidrogênio com os grupos silanóis da superfície dos MCs. Neste caso as interações polímero-superfície são mais fortes que as interações superfície-solvente, as cadeias do polímero irão interagir preferencialmente com a superfície de silício.

O fenômeno de intumescimento do PHEMA em diferentes massas molares foi extensivamente estudado neste trabalho. Devido a interações favoráveis na superfície ativa do MC recoberto com PHEMA, o intumescimento ocorre em razão da hidratação em condições controladas de umidade relativa do ar (UR), gerando estresse de compressão e consequentemente a deflexão do MC. A vantagem dos sensores nanomecânicos reside na sua capacidade de medir pequenos deslocamentos com uma precisão muito elevada. O monitoramento múltiplo de propriedades físicas de quantidades extremamente pequenas do polímero utilizando uma única técnica é muito atraente para a rápida caracterização do material. No capítulo I da Parte B deste trabalho, o comportamento de intumescimento de filmes finos de PHEMA por água foi investigado por elipsometria e resposta nanomecânica. Os ângulos elipsométricos foram

medidos em função de diferentes valores de umidade relativa do ar (UR) (25 - 96%) à temperatura ambiente. A absorção de água foi estudada baseando-se nas mudanças da espessura do filme e índice de refração. A resposta nanomecânica do filme fino de PHEMA foi investigada por medidas dos valores de frequência de ressonância dos MCs em função de diferentes valores de umidade relativa (0 - 82%) e seguindo a deflexão dos MCs em ciclos de umidade (0-82% UR). Os resultados apontam um aumento de 4% da massa do MC e deflexões de $\sim 60 \pm 5 \mu\text{m}$ devido à hidratação do filme fino polimérico.

No capítulo II da Parte B, sob a supervisão de Javier Tamayo, o aluno colaborou no desenvolvimento de um biosensor ultrasensível para a detecção e dosagem de um biomarcador cancerígeno. Durante o estágio, o aluno atuou na modificação química da superfície de silício dos MCs, inserindo grupos funcionais reativos para a imobilização de elementos de bioreconhecimento. Portanto, enfatiza-se que a contribuição exercida pelo doutorando no trabalho refere-se à funcionalização da superfície dos MCs e das nanopartículas de ouro com anticorpos altamente específicos, caracterização dos MCs por microscopia eletrônica de varredura (MEV), microscopia ótica de campo claro e campo escuro, bem como os bioensaios realizados para a detecção e dosagem do biomarcador cancerígeno em tampão e em amostras de soro, os quais foram avaliados por mudança de frequência de ressonância do MC devido ao aumento de massa.

O biomarcador empregado no biosensor foi "carcinogenic embryonic antigen" (CEA), o qual foi detectado e dosado em concentrações traços em tampão e em amostras de soro. A principal vantagem no desenvolvimento de biosensores ultrasensíveis para biomarcadores presentes em fluidos corporais está no diagnóstico precoce de inúmeras enfermidades com elevada precisão, reduzindo substancialmente

os custos de tratamentos clínico-médicos e aumentando consideravelmente as chances de sucesso na cura do paciente (TOTHILL, 2009; WARD, 2002).

Os biomarcadores são categorizados em três tipos principais: exposição, suscetibilidade e resposta (WÜNSCH FILHO; GATTÁS, 2001; ASCIERTO et al., 2013). Os biomarcadores de exposição correspondem à expressão de um agente ambiental ou de seus metabólitos no organismo dos indivíduos (HERNÁNDEZ-MORENO et al., 2010). Os de suscetibilidade indicam indivíduos mais ou menos propensos a desenvolver câncer quando expostos a substâncias cancerígenas (BOOGAARD; VAN SITTEERT, 1996). Os biomarcadores de resposta indicam alterações presentes em tumores; são tardios e possuem elevado potencial em aplicações oncológicas, incluindo avaliações de risco, diagnóstico diferencial, determinação de prognóstico, predição de resposta ao tratamento e monitoramento de progressão da doença (ZHU et al., 2008). Relacionado a essas aplicações pode-se considerar também a compreensão do mecanismo inicial da enfermidade, do processo de agravamento, desenvolvimento do método de diagnóstico e tratamento clínico (BAYLIN; OHM, 2006). Um biomarcador pode ser uma proteína, fragmento de proteína, DNA ou RNA (HENRY; HAYES, 2012). Ao lado do desenvolvimento de tecnologias proteômicas, muitos biomarcadores baseados em proteínas têm sido descobertos para muitos tipos de câncer, tendo um destaque especial para CEA (HENRY; HAYES, 2012). CEA é uma glicoproteína com 180 kDa de massa molar, a qual é expressa na mucosa intestinal e em outros epitélios. A sobre expressão desta glicoproteína está diretamente relacionada com câncer do tecido colorretal, e em menor extensão em câncer estomacal, mama e pulmão. CEA pode ser dosado em baixas concentrações no soro de indivíduos saudáveis. Níveis séricos moderadamente elevados estão correlacionados com doença benigna do fígado

ou pancreatite, enquanto que níveis altamente elevados podem ser causados pelas neoplasias malignas supracitadas, associadas com atividade e disseminação da enfermidade (MOLDRICH; LANGE; STRIK, 2010). Portanto, a utilização dos MCs para a dosagem em níveis séricos do CEA em concentrações traços apresenta-se interessante por fornecer elevada sensibilidade na detecção desta proteína quando secretada por tumores nos seus estágios iniciais, quando os sintomas ainda não foram desenvolvidos e o tratamento é mais efetivo.

Para o biosensor nanomecânico de CEA, a transdução de sinal ocorre devido a eventos de reconhecimento biológico quando a superfície funcionalizada interage com amostras que contém esta molécula alvo (CARRASCOSA et al., 2006). As superfícies modificadas desses biosensores baseados em MCs aproveitam a capacidade de algumas biomoléculas (receptores) em se ligar especificamente (reconhecer) a biomoléculas complementares (ligantes). A modificação da superfície do MC compreende (i) a modificação química da superfície a fim de se obter grupos funcionais reativos que se liguem fortemente a elementos de bioreconhecimento, (ii) a imobilização de elementos de bioreconhecimento, e finalmente (iii) se restar áreas da superfície do MC não funcionalizada, as mesmas devem ser bloqueadas com moléculas que dificultem ou minimizem a formação de adsorção não específica (TAMAYO et al., 2013).

Como os sensores nanomecânicos são baseados nas mudanças de frequência de ressonância e consequentemente nas variações de massa adicionada, o bloqueio da superfície dos MCs contra adsorções não específicas são cruciais na especificidade e na robustez do biosensor desenvolvido. Existem na literatura inúmeros métodos para reduzir interações não específicas em amostras clínicas. Esses métodos podem ser aplicados individualmente ou em combinação, tais como o recobrimento de mistura de

monocamadas auto associadas que contem unidade de etileno glicol, superfície de carboximetil dextrana, uso de aditivos no ensaio de tampão, uso de agentes de bloqueio como, por exemplo, leite e certos polímeros. Um excelente candidato é o uso de polímeros com cadeias etoxiladas que criam um impedimento estérico devido à hidratação nas regiões não ocupadas pelos elementos de bioreconhecimento. Sabe-se da eficiência de polímeros derivados de polietileno glicol (PEG) no bloqueio de superfícies contra interações não específicas, bem como o uso de glicina (um aminoácido) nesse auxílio sinérgico (ULUDAG; TOTHILL, 2012; STREULI; BAILEY; BISSELL, 1991).

Para se obter sucesso no biosensor nanomecânico desenvolvido, os elementos de bioreconhecimento deverão manter sua atividade biológica, serem reprodutíveis, possuírem camadas de receptores homogêneas para as moléculas alvo e serem robustos (TEMPLIN et al, 2002). Os MCs são excelentes candidatos para o desenvolvimento de biosensores, pois exibem ótimos atributos mecânicos para a transdução de sinal de reconhecimento biomolecular, apresentando sobre a sua superfície ligações de nanoescala (modo estático) e variações nas propriedades de vibração (modo dinâmico) via mecanismo físico induzido por forças biomoleculares, massa adsorvida e rigidez de biomoléculas (SADEGHIAN et al., 2008). Os elementos de bioreconhecimento utilizado foram os anticorpos, que possuem um papel de destaque nos avanços tecnológicos em ensaios de diagnósticos e têm sido extensivamente usados exames de interesse clínico (GUPTA et al., 2006). A tática proposta neste trabalho envolve um ensaio sanduiche de reconhecimento do biomarcador CEA presente no soro sanguíneo primeiro pelo anticorpo monoclonal ancorado na superfície da nanopartícula de ouro, seguido posteriormente pelo reconhecimento da molécula alvo por outro anticorpo monoclonal anteriormente ancorado na superfície modificada do MC. Prefere-se o

ensaio sanduiche na detecção direta de analitos em concentrações traços tanto em tampão como em amostras clínicas para a eliminação de efeitos de matriz, causados por diferenças de viscosidade e de índice de refração, como também por aumentar a sensibilidade do sensor devido a maior densidade das nanopartículas de ouro (ULUDAG; TOTHILL, 2012). No Capítulo II da Parte B deste trabalho usamos o modo dinâmico e mensuramos a frequência de ressonância do MC, o qual decaiu linearmente em função da massa de nanopartículas de ouro adicionada.

O crescente interesse em biosensores nanomecânicos é motivado pela sua habilidade de detecção *label-free*, elevada sensibilidade, pequena área do sensor que garante o uso de pouco reagente e consumo de pouca amostra (ÁLVAREZ; TAMAYO, 2005; VOINOVA; JONSON; KASEMO, 2002). Essas características fazem dos MCs ótimos suportes para a imobilização de moléculas bioativas, principalmente no diagnóstico de neoplasias, doenças infectocontagiosas, desordens hormonais, entre outras. Sabe-se que o método de detecção para os ensaios biológicos depende fortemente da camada de receptor imobilizada e que uma imobilização apropriada pode aumentar a seletividade do sensor. A adsorção química de proteínas sobre a superfície dos MCs pode depender de uma ampla variedade de procedimentos químicos, porém deve-se assegurar a reprodutibilidade e a estabilidade da proteína imobilizada. Entretanto, a principal desvantagem da adsorção química é que alguns grupos funcionais das proteínas podem se orientar aleatoriamente, dificultando a ligação do analito com o sitio ativo da proteína. Portanto, é de suma importância que o procedimento escolhido para a imobilização evite situações que possam induzir ao bloqueio do sitio ativo ou mesmo a mudanças conformacionais que possam causar

redução das velocidades de atividade do receptor protéico (GRIESHABER et al., 2008; BALLARD-BARBASH et al., 2012; CHANG; DONOVAN; TAN, 2013).

Algumas estratégias podem ser empregadas, porém existe uma dependência crucial com as características do substrato de imobilização. Por exemplo, em MCs recobertos com uma fina camada de ouro, a imobilização covalente do alcanotiol com acila terminal é muito interessante, pois pode ser seguido pela esterificação de grupos carboxila por meio do 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida (EDC) e N-hidroxisuccinimida (NHS). EDC é um derivado de carbodiimida solúvel em água que catalisa a formação de ligação amida entre grupamentos de ácidos carboxílicos e aminas pela ativação de grupos acilas com a formação de um derivado de *O*-ureia. Este derivado reage rapidamente com nucleófilos. NHS é frequentemente usado para auxiliar no acoplamento da carbodiimida. Outra opção é a ligação direta na superfície do MC recoberto com ouro por meio de pontes de dissulfetos presentes nas biomoléculas (BALAMURUGAN et al., 2008; LU; SMYTH; O'KENNEDY, 1996).

Para as superfícies de silício ou nitreto de silício, muitas opções no emprego de diferentes conjugações químicas podem ser realizadas. No entanto, a escolha da estratégia de funcionalização da superfície é fortemente dependente de qual tipo de grupo funcional terminal deseja que se liguem as biomoléculas. Proteínas podem ser imobilizadas quimicamente sobre os MCs por grupo amino, biotina, carboxila ou tiol. Os três grupos funcionais terminais mais comuns empregados na imobilização de moléculas bioativas são hidroxila, amina e carboxila. Para se obter os grupos funcionais requeridos para a imobilização covalente é necessário à funcionalização do óxido de Si da superfície dos MCs usando trialcoxissilano (por exemplo, trimetoxissilano ou trietoxissilano), o qual poderá incorporar moléculas de aminopropil ou glicidoxipropil.

MCs amino-funcionalizados podem ser usados diretamente para os subsequentes paços de conjugação com as proteínas, porém, o grupo glicidoxipropil é geralmente hidrolisado com solução ácida para formar grupo dihidroxi, o qual pode ser modificado posteriormente (BALAMURUGAN et al., 2008). As imobilizações de anticorpos por meio da formação de uma ligação amida com auxílio dos reagentes estão descritos detalhadamente em materiais e métodos da Parte B. Anticorpos são proteínas usadas pelo sistema imunológico para identificar e neutralizar corpos estranhos como bactérias, vírus ou células tumorais (JAYASENA, 1999). Um anticorpo reconhece um alvo específico, o antígeno, presente nas células estranhas ao organismo. Cada anticorpo dispõe de dois sítios, chamados de parátomos, que se liga a uma parte especificam do antígeno, o epítipo. O reconhecimento dos anticorpos dos diversos antígenos presentes em diferentes patógenos (bactérias, vírus, fungos e parasitas) envolvem ligações reversíveis e não covalentes como pontes de hidrogênio, interações hidrofóbicas e de van der Waals e ligações iônicas. A força de ligação entre anticorpo e antígeno em uma única região de ligação (epítipo) é denominada afinidade (BORREBAECK, 2000; CHANG; SUN; SUN, 1996; KOPROWSKI; HERLYN; DE FREITAS, 1991). Os anticorpos podem apresentar uma especificidade impressionante para um antígeno, distinguindo pequenas diferenças nas suas estruturas químicas. Baseando-se na especificidade da reação da CEA com os anticorpos monoclonais foi desenvolvido o biosensor nanomecânico ultrasensível. Anticorpos monoclonais (*Monoclonal antibody*, Mab) são produzidos por um único clone de um linfócito B parental, sendo, portanto, idênticos em relação às suas propriedades físico-químicas e biológicas (MARX et al., 1997; REUVENY et al., 1986; JAMES; BELL, 1987). Esses Mabs podem ser gerados em laboratório para reconhecer e se ligar a qualquer antígeno de interesse. O

procedimento foi relatado em 1975 em artigo publicado na revista *Nature* pelos cientistas César Milstein e Georges Köhler (KÖHLER; MILSTEIN, 1975). Por esse feito, ambos foram os laureados pelo Prêmio Nobel de Medicina no ano de 1984 com o dinamarquês Niels Kaj Jerne. Disponível em: <http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/1984/> Acesso em: 01 de março de 2015. Os anticorpos monoclonais são produzidos em laboratório a partir de linfócitos B gerados por camundongos cujos sistemas imunológicos foram estimulados pelos antígenos de interesse. O anticorpo monoclonal de captura (MAb 3C6) foi imobilizado quimicamente sobre a superfície do MC. Quando o MC entra em contato com o analito de interesse, neste caso a proteína CEA presente no plasma sanguíneo, ocorre à captura deste antígeno. O antígeno capturado é reconhecido pelo segundo anticorpo (MAb 3C1), anticorpo de detecção, o qual está quimicamente imobilizado sobre as nanopartículas de ouro, conforme o procedimento citado em *Materias e Métodos*, formando um ensaio sanduiche altamente usado em imunossensores baseados em testes ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*, Ensaio de Imunoabsorção Ligado a Enzima (DE LA RICA; STEVENS, 2012)).

Para avaliar a eficiência do biosensor na detecção e dosagem de CEA, realizaram-se ensaios controles sob as mesmas condições experimentais de exposição dos MCs em tampão e em plasma sanguíneo contra molécula alvo. Seguindo o mesmo protocolo, imobilizou-se quimicamente sob MCs de referência o anticorpo da *anti-horseradish peroxidase* (anti-HRP), expondo-os contra CEA tanto em tampão como contra plasma, e posteriormente expondo-os contra as nanopartículas de ouro funcionalizadas com Mab 3C1. A frequência de ressonância mensurada não acusou variações devido à adição de massa, evidenciando a especificidade dos anticorpos

escolhidos, bem como a sensibilidade do biosensor desenvolvido. Quando os MCs funcionalizados com anti-HRP interagiram com a enzima *horseradish peroxidase* (HRP) verificou-se o bioreconhecimento do sensor (KOSAKA et al., 2013). Portanto a especificidade do sensor foi sistematicamente estudada, mostrando que o biosensor de CEA é altamente sensível e específico, apresentando condições primordiais para aplicações em ensaios de interesse clínico-analíticos na dosagem de CEA presente no plasma, minimizando a ocorrência de falsos positivos e falsos negativos em diagnósticos.

2 - Materiais

Para o capítulo I, amostras de poli (2-hidroxietil metacrilato) (PHEMA) com massa molar viscosimétrica média (M_v) de 20,000 g mol⁻¹ (PHEMA-20), 300,000 g mol⁻¹ (PHEMA-300) e 1.000.000 g mol⁻¹ (PHEMA-1000), poliestireno (PS) com M_v de 300,000 g mol⁻¹, tolueno e metanol grau analítico foram adquiridos da Sigma-Aldrich (EUA). Soluções de 30 g de L⁻¹ de PHEMA e PS foram preparadas em metanol e tolueno, respectivamente, em um banho de ultrassom durante 5 minutos. Arranjos de *microcantilevers* de silício (MC) (*Mikromasch*, Estonia) foram usados como suporte dos filmes finos de PHEMA.

Para o capítulo II, O ácido sulfúrico (reagente ACS, 95-98%), peróxido de hidrogênio (H₂O₂ 30%), (3-glicidiloxipropil) trimetoxisilano (98%), Na α , Na-Bis (carboximetil) - L-lisina hidratado (97%, TLC), tolueno seco (99,8%), N-hidroxissulfosuccinimida sódica (sulfo-NHS), hidrocloreto de N-(3-dimetilamino propil) -N'-etilcarbodiimida (EDC), (aminoetil) polietileno glicol (5000 Da), ácido 2-(N-morfolino) etanossulfônico (MES), anticorpo anti-peroxidase produzidos em coelho (anti-HRP), solução tampão de bicarbonato, fosfato tamponado salino (PBS), cloreto de sódio, fosfato de sódio dibásico, fosfato de sódio monobásico e Tween-20 foram adquiridos a partir de Sigma-Aldrich (St. Louis, EUA). Kit de diálise com faixa de corte de 8 kDa de peso molecular foi adquirida da GE Healthcare (Little Chalfont, Reino Unido). Além disso, kit de Ensaio Coomassie Plus (Bradford) foi adquirido a partir de Thermo Scientific (Waltham, EUA). Soro fetal bovino (FBS), origem brasileira, estéril filtrada para cultura de células, foi adquirido a partir de Lonza (Verviers, Bélgica). Nanopartículas esféricas de ouro de 100 nm de diâmetro revestidas com 5 nm de espessura com carboxi-polímero (C11-100-TC-50) foram adquiridos a

partir de NanopartzTM (Loveland, EUA). As nanopartículas de ouro foram fornecidas com concentração de $6,34 \cdot 10^9$ nanopartículas mL^{-1} em 18 Água MEG DI. Os arranjos de cantilever de silício foram adquiridos da Concentris GmbH (Basileia, Suíça). Antígeno monoclonal proveniente de camundongos (3C6 e 3C1), antígeno carcinoembrionário (CEA) obtido a partir do tecido do cólon de um único paciente com carcinoma metastático de fígado. No imunoensaio sanduíche foi utilizado para a detecção de CEA os anticorpos monoclonais 3C1 e 3C6, os quais são os anticorpos de captura e de detecção, respectivamente.

3 - Métodos

Antes da sua funcionalização, os arranjos de MCs foram limpos com solução piranha (3 H_2SO_4 : 1 H_2O_2) para remover todos os resíduos orgânicos sobre a superfície (cuidado: solução piranha é extremamente corrosiva, reativa e potencialmente explosiva) durante 15 minutos à temperatura ambiente. Os MCs foram lavados três vezes com água Milli-Q e secos com jatos de nitrogênio. No capítulo I, os arranjos de MC foram lavados em solução piranha e usados como transdutores mecânicos. Os MC possuem 400 μm de comprimento, 100 μm de largura e 1 μm de espessura. As variações de frequências de ressonância dentro de uma matriz foram menores que 1%, indicando propriedades mecânicas similares. Soluções de 30 g L^{-1} com os polímeros PHEMA-20, PHEMA-300 e PHEMA-1000 recobriram os MC por spin-coating (recobrimento rotacional) num aparelho SÜSS Microtec Delta +10 em 10000 rpm por 30 segundos, onde o chip foi fixado com o auxílio de uma fita de carbono, a qual é também usada em microscopia eletrônica de varredura, devido a sua inércia sob condições extremas de vácuo e feixes de elétrons. No caso de PHEMA-300, os filmes

foram depositados não só em MCs puros, mas também em MCs previamente revestidos com um filme fino de PS (~ 40 nm de espessura); estes filmes foram codificados como PS/PHEMA-300. Os filmes poliméricos foram homogeneamente depositados sobre os MCs (Figura 1). Deve-se notar que soluções poliméricas com concentração maior que 30 g L^{-1} não são adequadas porque levam a filmes poliméricos descontínuos e não geram estresse de superfície uniforme. PHEMA ou PS foram removidos do lado oposto do MC por tratamento de plasma (80 W , $7,5 \times 10^{-9} \text{ Torr}$, O_2 em 20 sccm , RIEOxford Instruments Plasmalab 80 PLUS), caso contrário não haverá nenhuma deflexão do cantilever. Deve-se notar que o tratamento com plasma não causa reticulação, afinamento do filme, ou mudanças na rugosidade da superfície. A Figura 2 mostra imagens topográficas obtidas por Microscopia de Força Atômica (*Atomic Force Microscopy*, AFM) ($10 \mu\text{m} \times 10 \mu\text{m}$) para PHEMA-300 antes e depois de tratamento com plasma, com os correspondentes valores médios de rugosidade (rms).

Figura 2: Imagens topográficas de AFM ($10 \mu\text{m} \times 10 \mu\text{m}$) obtidas para PHEMA-300 antes e após tratamento com plasma, com os correspondentes valores de medida de rms.

No capítulo II, os MCs foram mergulhados numa solução a 0,2% de (3-glicidiloxipropil) trimetoxisilano em tolueno seco *overnight* a temperatura ambiente. As amostras foram lavadas com tolueno, água Milli-Q e secas com jatos de nitrogênio. Posteriormente os MCs foram incubados *overnight* a 25 ° C sob agitação suave em uma solução de 100 mM de NTA em tampão carbonato 50 mM (pH 9,5). A funcionalização dos MCs com NTA é um método de duas etapas que compreende (i) inserção de epoxissilano 3- (2,3-epoxipropoxi) propiltrimetoxisilane à superfície microcantilever limpo e (ii) ligação do NTA através dos grupos epóxi (os grupos epóxi na superfície reagem com os grupos amina do NTA a pH básico). Os MCs foram então lavados com tampão carbonato 50 mM pH 9,5, água Milli-Q e secos com jatos de N₂. Os grupos carboxilas na superfície do cantilever foram ativados pela imersão em uma solução mista de 100 mM de EDC e 150 mM de sulfo-NHS, ambos dissolvidos em 10 mM de MES pH 5,5. Os MCs foram incubados durante 45 minutos a 37 ° C, sob suave agitação. Imediatamente após este período, as amostras foram extensivamente lavadas com 10 mM de MES.

3.1 - Deflexão em função do tempo e medidas de frequência de ressonância (Capítulo I)

A frequência de ressonância e a deflexão do MC recoberto com polímero foram monitoradas em função da umidade relativa do ar (UR) conforme a configuração experimental representada na Figura 3. A resposta nanomecânica dos MCs foi realizada por medidas de um feixe de laser óptico incidente em um sistema de medidas montado no laboratório equipado com uma câmara ambiental que permite o controle da temperatura e da UR. A técnica de leitura combina o método óptico de varredura bidimensional automatizada que permite seguir o movimento (deflexão) do MC em

tempo real e também permite medir a frequência de ressonância dos MCs (MARTÍNEZ et al., 2010). O feixe de laser de diodo vermelho de 3 mW (Edmund Optics) focou-se na extremidade final do MC, onde o feixe refletido foi coletado por um detector linear de posição bidimensional (PSD). O sistema de controle da UR é equipado com uma sonda de umidade Hygrosens (sensor) e dois controlados de fluxo de massa (MFC) da Aalborg. A câmara de medida tem uma entrada para $N_2(g)$ seco/úmido. Um dos MFC fornece um fluxo de $N_2(g)$ seco, e o outro fornece um fluxo de $N_2(g)$ úmido, o qual é obtido pela passagem do gás através de um balão cheio de água destilada. Ambos os gasodutos são misturados numa pré-câmara antes de atingir a câmara de medidas. O sistema de controle de temperatura foi equipado com um detector de temperatura padrão PT 100 resistance localizado próximo ao arranjo de MCs na câmara de medidas e um ambientizador (Huber Kaeltemaschinenbau GmbH), como mostrado na Figura 3. Para os ciclos de umidade, a umidade relativa variou de 0% a 80%, enquanto a temperatura foi mantida constante em $25 \pm 1^\circ\text{C}$. Os ciclos de umidade foram concluídos em 8 min, 15 min ou 60 min. A frequência de ressonância dos MCs foi medida a 0% e 80% de UR após a estabilização ambiental da câmara de medida na UR desejada por 10 minutos.

Figura 3: Esquema da montagem experimental utilizada para os experimentos. Chip é montado num atuador 2D voice-coil para deslocamento do chip na direção dos eixos X e Y. O deslocamento para fora do plano do sistema mecânico é o eixo Z. O feixe de laser incidente é orientado ortogonalmente para o feixe de laser refletido com um eixo no plano X-Z. O sistema possui também uma câmara ambiental com controle automático de UR e temperatura.

3.2 - Medidas de perfilometria (Capítulo I)

Lâminas de silício (University Wafers, USA) foram cortadas em $1,0 \text{ cm}^2$ de dimensão e limpas com solução piranha e água deionizada e posteriormente secas com jatos de N_2 . Metade da área das lâminas de silício foi recoberta com uma fita resistente a tolueno e a metanol. Soluções poliméricas foram depositadas sobre as lâminas de silício por recobrimento rotacional (SÜSS Microtec Delta +10), $\omega = 10,000 \text{ rpm}$, 30 s. A fita foi removida e os valores de espessura dos filmes medidos por perfilometria (Veeco Dektak 150). As medidas foram realizadas no mínimo em três diferentes regiões da amostra.

3.3 - Medidas de elipsometria (Capítulo I)

As medidas de elipsometria foram realizadas em ar usando um elipsômetro vertical controlado por computador DRE-EL02 (Ratzeburg, Alemanha), com ângulo de incidência de 70° e laser de He-Ne com $\lambda = 632,8$ nm. As medidas de espessura (d) e o índice de refração (n) do PHEMA foram determinados independentemente usando um modelo de multicamadas composto pelo substrato, a camada desconhecida e o ar. Os valores de espessura (d) e o índice de refração (n) da camada desconhecida podem ser calculados a partir dos ângulos elipsométricos, Δ e Ψ , usando a equação fundamental da elipsometria e cálculos iterativos com as matrizes de Jones (AZZAM; BASHARA, 1988),

$$\tan \Psi e^{i\Delta} = R_p R_s = f(n, d, \lambda, \varphi) \quad (3)$$

onde R_p e R_s são os coeficientes de reflexão total para as ondas perpendiculares e paralelas, respectivamente. Eles são uma função do ângulo de incidência (φ), comprimento de onda (λ), índice de refração e espessura de cada camada do modelo. A espessura da camada de SiO_2 foi determinada em ar, considerando-se os índices de refração para Si como $n_{\text{Si}} = (3,88 - 0,018 i)$ (PALIK, 1985), $n_{\text{ar}} = 1,00$ e $n_{\text{SiO}_2} = 1,462$ (PALIK, 1985) e a espessura "infinita" para as camadas de Si e de ar. A espessura média para SiO_2 foi $(2,0 \pm 0,1)$ nm. A espessura média e índice de refração determinados em ar para filmes finos de PS depositados sobre Si (136 ± 5) nm e $(1,587 \pm 0,004)$, respectivamente. PHEMA recoberto sobre lâminas de Si previamente revestidas com PS foram inseridos numa célula especial feito de poli (metacrilato de metila) e janelas de quartzo com inclinação de 70° (FUJIMOTO; PETRI, 2001). A UR dentro da célula elipsométrica foi controlada por mistura a seco N_2 e N_2 úmido mensurado por um medidor de humidade / temperatura Lutron HT 3006A. No primeiro

conjunto de experiências, um valor de UR desejado foi ajustado dentro da cela e os ângulos elipsométricos foram medidos após 4 h. No segundo conjunto de experimentos, os valores de UR foram constantes os ângulos elipsométricos foram medidos em função do tempo. Todas as medidas foram realizadas em $(24,0 \pm 0,5) ^\circ\text{C}$.

3.4 Conjugações de anticorpos sobre nanopartículas de ouro recobertas com carboxi-polímero (Capítulo II)

A detecção dos anticorpos pelo antígeno monoclonal anti-carcinoembryonic 3C1 (MAb3C1), imobilizado na superfície das nanopartículas de ouro revestidos com carboxi-polímero seguiu o procedimento fornecido pela NanopartzTM (<http://www.nanopartz.com/>). Em primeiro lugar, 100 μL de nanopartículas de Au 2,5 mg mL^{-1} em PBS foram misturados com 100 μL de anticorpos de detecção 1 mg mL^{-1} em PBS. Então, 1 mL de água mili-Q foi adicionada e a solução foi submetida à vortex durante 1 minuto a 25 $^\circ\text{C}$ (solução A). Imediatamente 100 μL de EDC 1 mg mL^{-1} e 150 μL de sulfo-NHS 1 mg mL^{-1} em água Milli-Q foi adicionado à Solução A. A mistura foi incubada a 25 $^\circ\text{C}$ durante 1 hora e, em seguida, separadas por centrifugação. O sobrenadante foi removido e o volume reduzido para menos de 50 μL e a solução restante foi completada com 1,5 mL de tampão PBS. Este passo foi repetido duas vezes. Depois, as nanopartículas foram centrifugadas novamente e o sedimento formado foi misturado com 1,5 mL de BSA 1 mg mL^{-1} em PBS, a qual foi incubada durante 1 hora a 25 $^\circ\text{C}$ para bloquear os espaços vazios não revestidos sobre a nanopartícula de ouro para evitar a formação de interações não específicas. A solução foi então centrifugada. O sobrenadante foi removido e o volume reduzido para menos de 50 μL e a solução

restante foi completada com 1,5 mL de tampão PBS. Este passo foi repetido duas vezes. A amostra foi armazenada a 4 °C até a sua utilização.

3.5 - Funcionalização dos microcantilevers (Capítulo II)

Antes da sua funcionalização, os arranjos de MCs foram limpos com solução piranha (3 H₂SO₄: 1 H₂O₂) para remover todos os resíduos orgânicos sobre a superfície (cuidado: solução é piranha extremamente corrosiva, reativa e potencialmente explosiva) durante 15 minutos à temperatura ambiente (RT). Os MCs foram lavados três vezes com água Milli-Q e secos com jatos de nitrogênio. Os MCs foram mergulhados numa solução a 0,2% de (3-glicidiloxipropil) trimetoxisilano em tolueno seco *overnight* a temperatura ambiente. As amostras foram lavadas com tolueno, água Milli-Q e secas com jatos de nitrogênio. Posteriormente os MCs foram incubados *overnight* a 25 °C sob agitação suave sem uma solução de 100 mM de NTA em tampão carbonato 50 mM (pH 9,5). A funcionalização dos MCS com NTA é um método de duas etapas que compreende (CHEVALIER et al., 2010) (i) inserção de epoxissilano 3-(2,3-epoxipropoxi) propiltrimetoxisilano à superfície microcantilever limpo e (ii) ligação do NTA através dos grupos epóxi (os grupos epóxi na superfície reagem com os grupos amina do NTA a pH básico). Os MCs foram então lavados com tampão carbonato 50 mM pH 9,5, água Milli-Q e secos com jatos de N₂. Os grupos carboxilas na superfície do cantilever foram ativados pela imersão em uma solução mista de 100 mM de EDC e 150 mM de sulfo-NHS, ambos dissolvidos em 10 mM de MES pH 5,5. Os MCs foram incubados durante 45 minutos a 37 °C, sob suave agitação. Imediatamente após este período, as amostras foram extensivamente lavadas com 10 mM de MES.

3.6 - A imobilização dos anticorpos de reconhecimento e controle sobre os MCs

(Capítulo II)

Antes da imobilização de anticorpos sobre os MCs, 1 mL de solução de anti-HRP 4 mg mL⁻¹ em água Milli-Q foi dialisada *overnight* a 4 °C. A concentração da solução de anti-HRP depois da diálise foi determinada utilizando o método de Bradford (BRADFORD, 1976). Uma curva de calibração foi feita utilizando albumina sérica bovina (BSA) como proteína padrão. O intervalo de linearidade do ensaio foi de 5 µg mL⁻¹ a 2500 µg mL⁻¹. A anti-HRP foi imobilizada sobre as superfícies dos MCs utilizados como amostras controle seguindo o mesmo protocolo aplicado para os anticorpos de reconhecimento, conforme o descrito a seguir. Logo após a etapa de ativação de superfície, os anticorpos foram imobilizados apenas no lado de cima dos MCs, utilizando o método reportado na literatura (KOSAKA et al., 2013). O procedimento de funcionalização envolve imobilização covalente e orientação do anticorpo com capacidade de reconhecimento superior a 90% (KOSAKA et al., 2013). Uma solução de 50 µg mL⁻¹ de controle ou anticorpos de reconhecimento (monoclonal anti-antígeno carcinoembrionário 3C6 (MAb3C6) foi preparado em 10 mM de MES (pH 5,5)). Os MCs foram incubados durante 2 horas a 37 °C. Depois disso, as amostras foram lavadas com MES 10 mM (pH 5,5) e incubadas durante 45 minutos a 37 °C com 10 mM de tampão fosfato de sódio (pH 8,0) com NaCl 0,3 M para dessorver os anticorpos que não estão covalentemente ligados à superfície. A superfície do cantilever foi subsequentemente bloqueada para evitar adsorções não específicos; os MCs foram mergulhados numa solução de 1 mg mL⁻¹ de (aminoetil) polietileno glicol (PEG) em MES 10 mM com 0,05% de Tween 20 ® (pH 5,5) *overnight* a 4 °C. Posteriormente, as amostras foram lavadas com MES pH 5,5 com 0,05% de Tween 20 ® (pH 5,5).

3.7 - Reconhecimento do biomarcador e ensaio de sanduíche (Capítulo II)

Os MCs foram incubados durante 1 hora a 37 °C em 1 ml de soluções de CEA com concentrações que variam de 1 pg mL⁻¹ até 10 ag mL⁻¹ em solução PBS com 0,05% de Tween 20®, pH 7,4 (PBST) e FBS para simular uma amostra real. Experimentos de controle rigorosos foram realizados com os MCs de controle funcionalizados com o anticorpo de anti-peroxidase e concentrações muito altas de 1 µg mL⁻¹ de CEA. Logo depois, os MCs foram lavados duas vezes com PBST e uma vez com PBS pH 7,4. Depois disso, as amostras foram lavadas com água Milli-Q e secas com jatos de N₂. Para o ensaio de sanduíche, os MCs foram mergulhados em 1 mL de uma solução de nanopartículas de ouro funcionalizada com o anticorpo de detecção de 1 ug mL⁻¹ (MAb3C1), preparado em MES pH 5,5 com 0,05% de Tween 20® (MEST). As amostras foram incubadas a 37 ° C durante 1 hora, sob agitação suave, lavadas três vezes com MEST, duas vezes com MES, extensivamente lavado com água Milli-Q e secas com jatos de N₂.

3.8 - Microscopia de campo claro/escuro (Capítulo II)

As imagens de campo claro do cantilever em diferentes comprimentos de onda foram realizadas com um microscópio (Nikon, ECLIPSE LV150A) equipado com uma câmera de ultra-alta definição de cor arrefecida (Nikon, DS-R11). Vários filtros de luz colocados ao longo do braço de iluminação do microscópio foram usados para ajustar o comprimento de onda de iluminação. Imagem de campo escuro foi realizada com um microscópio Zeiss (Axioskop 2 MAT) equipado com uma câmera colorida de alta definição (Zeiss, AxioCam MRc 5). As medidas foram realizadas em reflexão de campo escuro com Epiplan NeofluarR em ampliação de 50X (Zeiss, NA 0,8). O tamanho das

imagens foram $220 \times 297 \mu\text{m}^2$. A intensidade do canal vermelho das imagens de campo escuro foi utilizada para quantificar a intensidade de dispersão numa escala típica de 8 bits (0 a 255). Os dados brutos foram processados com uma rotina personalizada desenvolvida com Matlab® que calcula o componente vermelho significativo de cada imagem de campo escuro normalizados para o componente vermelho médio de uma superfície de silício limpo. Na Figura 4 estão apresentadas imagens dos cantilever para amostra controle (anti-HRP_1 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de CEA), e para o ensaio de detecção de CEA em concentrações que variaram de 1 ag mL^{-1} a 100 fg mL^{-1} . Os ensaios foram realizados em plasma.

Figura 4: Imagens de campo escuro do cantilever após a etapa de reconhecimento com os anticorpos ancorados nas nanopartículas para o experimento controle (anti-HRP na presença de 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de CEA) e para o ensaio de detecção de CEA, cuja concentração variou de (1 ag mL^{-1} a 100 fg mL^{-1}).

3.9 - Microscopia eletrônica de varredura (MEV) (Capítulo II)

A densidade de nanopartículas de ouro na superfície do MC e do *preclamping* foi mensurada com precisão por MEV (Hitachi S-800 FESEM). Cerca de 100 imagens, como mostrado na Figura 5 do capítulo II (Parte B), foram adquiridas em diferentes regiões de cada *cantilever* e *preclamping* para cada concentração de CEA. Um algoritmo baseado no sinal de contraste implementado pelo software Matlab foi usada para avaliar a densidade de nanopartículas de ouro da superfície e analisar a distribuição do nanopartículas em aglomerados.

Capítulo I: Estudo do Comportamento de intumescimento e desintumescimento de filmes finos de PHEMA por sensores nanomecânicos

4 - Resultados e discussão

4.1 - Histerese da deflexão dos MCs em função do ciclo de umidade

O procedimento para o polímero revestir os MCs deve considerar as frágeis estruturas mecânicas do material a fim de evitar mudanças nas suas propriedades mecânicas. Vários métodos podem ser utilizados para o revestimento de MCs com camadas homogêneas de polímeros, mas a escolha depende do sistema. Por exemplo, o método de deposição “*ink-jet*” foi usado para a deposição do poli (álcool vinílico), enquanto que para o poli (vinil butiral-*co*-acetato de vinila-*co*-álcool vinílico), e poli (cloreto de vinilo-*co*-acetato de vinilo-*co*-2 hidroxipropil acrilato) em microarranjos de “*spotting pins*” foram aplicados (SNOW et al., 2007). Os polímeros podem ser polimerizados sobre os MCs por meio de polimerização por plasma (IGARASHI et al., 2006; LIU et al., 2011) ou podem ser funcionalizados para permitir a enxertia de *brushes* de polímero (BUMBU et al., 2007; BRADLEY et al., 2009) ou de partículas coloidais de polímero (LIU et al., 2011). No capítulo I da Parte B, PHEMA foi depositado por *spin-coating* sobre os MCs e MCs previamente revestidos com um filme fino de PS. Os resíduos poliméricos do lado oposto do MC foram removidos por tratamento com plasma. As razões para a escolha desta técnica de revestimento sobre a superfície dos MCs são:

- (i) Necessidade de recobrir somente um lado do MC para mensurar o estresse de superfície e,
- (ii) A qualidade e a reprodutibilidade do filme de polímero depositado por revestimento rotacional.

Como mostrado em micrografias óticas típicas na Figura 5, filmes poliméricos homogêneos e contínuos foram depositados sobre os MCs usando um método rápido e simples.

Figura 5: Micrografias óticas de campo claro dos filmes poliméricos obtidos por spin-coating sobre os MCs, (a) PS, (b) PHEMA-20, (c) PHEMA-300, (d) PS/ PHEMA-300 e (e) PHEMA-1000.

O arranjo experimental para medir a deflexão do MC está esquematicamente apresentado na seção experimental 3.1 da Parte B. Os lados dos MCs recobertos funcionam como transdutores mecânicos, e a leitura da deflexão do sistema confinado ocorrem numa câmara com temperatura e umidade relativa do ar (UR) controlado. A Figura 6a mostra deflexões típicas de MCs recobertos com PHEMA-20, PHEMA-300 e PHEMA-1000, em função de ciclos de UR a $(25 \pm 1) ^\circ\text{C}$. Como referência, as deflexões dos MCs recobertos com PS também foram medidas (Figura 6a). PS foi escolhido como referência devido a sua hidrofobicidade.

Figura 6: Resposta do MC para ciclos de umidade de 15 minutos: (a) PS, PHEMA-20, PHEMA-300, PHEMA-1000 E (b) PHEMA-300, PS/PHEMA-300, PS. (c) Resposta dos MCs recobertos com PHEMA-300 para ciclos de umidade de 8 minutos, 15 minutos e 60 minutos. PS recobertos sobre os MC foram usados como amostra referência devido a sua hidrofobicidade.

Os deslocamentos (deflexões) resultam do estresse diferencial gerado entre os lados opostos dos MCs. Ao aumentar UR, as cadeias do PHEMA sofrem intumescimento, aumentando a viscoelasticidade (CHATZANDROULIS;

GOUSTOURIDIS; RAPTIS, 2005; KOFFAS et al., 2003) e a pressão osmótica (BRADLEY et al., 2009; LIU et al., 2011). Este efeito causa estresse de compressão no lado do MC recoberto e, conseqüentemente, os MCs se curvam. A Figura 6 mostra claramente que o aumento dos valores de UR de 0% a 80% causam deflexão dos MCs recobertos com PHEMA, onde este efeito sofre redução com o aumento da massa molar do polímero (PHEMA-20 > PHEMA-300 > PHEMA-1000). Esses resultados podem ser explicados com base no fato de que a mudança de entropia devido ao intumescimento nas cadeias curtas de polímero é maior do que para as cadeias longas (BUMBU et al., 2007). Este efeito é aliviado no MC que sofre grande curvatura em cadeias poliméricas mais curtas.

A rampa de desintumescimento mostrou que em aproximadamente 20% de UR a posição original do MC revestido com PHEMA foi alcançado. Para valores de UR menores que 20% os MCs revestido com PHEMA-20, PHEMA-300 e PHEMA-1000 mantiveram a flexão para cima com valores máximos de $9 \pm 1 \mu\text{m}$ em aproximadamente 2% de UR, $6,6 \pm 0,5 \mu\text{m}$ em aproximadamente 2,5 % UR e $1,5 \pm 0,5 \mu\text{m}$ em aproximadamente 3.5% de UR, respectivamente. O estresse de tensão indica que forças atrativas dominam a interação intermolecular sobre a superfície do MC. É esperado que a espessura da camada de polímero fique mais fina no intervalo de UR de 2,5% a 3,5%. Durante o aumento de UR as moléculas de água tendem a ocupar os espaços vazios da matriz polimérica, direcionando ao relaxamento das cadeias poliméricas. Entretanto, a 0% de UR, as cadeias poliméricas adotam uma conformação mais estendida, justificando nesta situação a redução observada na espessura do filme polimérico. Comportamento similar foi observado e teoricamente modelado em monocamadas auto associadas de ssDNA, um polímero com uma forte afinidade por moléculas de água

(MERTENS et al., 2008; WU et al., 2001; WAGMAN; MEDALION; RABIN, 2012).

Rabin e colaboradores (WAGMAN; MEDALION; RABIN, 2012) propuseram um modelo para explicar a redução de monocamadas polieletrólitos devido à adsorção de água; eles consideraram que a baixas concentrações de vapor de água, a adsorção de água é acompanhada por redução de espaços vazios, e assim, resultando numa compressão da monocamada. Ciclos de intumescimento e desintumescimento foram também realizados para os MCs revestidos com PS como experimento controle (Figura 6a). As deflexões foram insignificantes, indicando que o comportamento observado para PHEMA-20, PHEMA-300 e PHEMA-1000 na Figura 6a deve-se a interações favoráveis entre SiO_2 /PHEMA, SiO_2 /água e PHEMA/água.

A Figura 6b mostra os ciclos de intumescimento e desintumescimento determinados para PHEMA-300, PS e PS/PHEMA-300 revestidos sobre os MCs. As deflexões observadas para PS/PHEMA-300 foram muito menos pronunciadas que as observadas para PHEMA-300. Esses resultados indicam a existência de uma camada de água interfacial entre SiO_2 (MC puro) e PHEMA e uma fina camada interfacial água entre PS (depositado sobre o MC) e PHEMA que desempenha um papel substancial na transdução do sinal.

A Figura 6a e 6b mostra a respostas MC para ciclos de umidade de 15 minutos. Para efeito de comparação do período de tempo definido para os ciclos de intumescimento e desintumescimento sobre as deflexões do MC, as respostas dos PHEMA-300 revestido sobre MC foram realizados para os ciclos de umidade de 8 minutos, 15 minutos e 60 minutos (Figura 6c). Os sistemas se comportaram de forma semelhante, indicando que o tempo necessário para trocar a atmosfera na câmara

ambientalizada parece ser curta em comparação com os períodos de tempo de 8 minutos e 60 minutos utilizada para os ciclos de umidade.

4.2 - Dependência da frequência de ressonância do MC em função da massa molar do PHEMA

Ressonadores nanomecânicos são baseados na mudança de vibração em escala nanométrica de um MC suspenso quando moléculas adsorvem na sua superfície. A variação de massa pode ser determinada com precisão por frequência de ressonância do MC, se:

- (i) As propriedades elásticas do MC permanecem inalteradas durante a adsorção de moléculas e,
- (ii) Se efeitos de amortecimento são negligenciáveis (WAGGONER; CRAIGHEAD, 2007).

A frequência de ressonância muda sensivelmente em proporção de massa de moléculas adsorvidas sobre o MC. Além disso, os MC utilizados neste estudo são homogeneamente recobertos com filmes de PS ou PHEMA (Figura 2 da seção experimental) e considerando que a absorção de água também é homogênea em todo o filme, o modelo do oscilador harmônico simples pode ser aplicado para estimar a quantidade de água absorvida pelos filmes poliméricos quando exposto a alta umidade. A Tabela 1 mostra a diferença no estresse de superfície entre os lados superior e inferior dos MCs, $\Delta\sigma$, calculado pela equação de Stoney modificada (BRADLEY et al., 2009). Δz está relacionada com a deflexão do microcantilever, L , o comprimento do cantilever,

ν , o coeficiente de Poisson, E , módulo de elasticidade (módulo de Young médio), e a espessura do cantilever, h :

$$\Delta z = \frac{3(1-\nu)L^2}{Eh^2} \Delta\sigma \quad (4)$$

Tabela 1: Diferença no estresse superficial entre os lados superior e inferior da MCs calculada através da equação 4 para máximo Δz , $\Delta\sigma_{\max}$. A mudança da frequência relativa (Δf) é a diferença entre a frequência de ressonância determinada a 80% de UR e a 0% de UR; aumento da massa relativa determinada com Δf (equação 5).

Recobrimento	$\Delta\sigma_{\max}$ (N/m)*	Δf (kHz)	Aumento relativo de massa (%)	Espessura (nm)
<i>PHEMA-20</i>	10 ± 1	$-(0,20 \pm 0,03)$	$5,1 \pm 0,8$	106 ± 4
<i>PHEMA-300</i>	7 ± 1	$-(0,13 \pm 0,02)$	$3,2 \pm 0,4$	220 ± 14
<i>PS/PHEMA-300</i>	$0,9 \pm 0,3$	$-(0,12 \pm 0,04)$	$2,9 \pm 0,6$	207 ± 10
<i>PHEMA-1000</i>	$1,4 \pm 0,3$	$-(0,06 \pm 0,01)$	$1,5 \pm 0,4$	233 ± 17
<i>PS</i>	$0,004 \pm 0,003$	$-(0,003 \pm 0,002)$	$0,09 \pm 0,06$	223 ± 15

*Calculado para máximo Δz , $E_{\text{médio}} = 160$ GPa, $\nu = 0,22$, $L = 400$ μm and $h = 1,0$ μm (dados do fornecedor). Temperatura foi mantida constante em (25 ± 1) °C.

A frequência de ressonância foi determinada para cada MC recoberto com PHEMA após a interação em atmosfera controlada. A Tabela 1 mostra a mudança de frequência de ressonância relativa (Δf), a qual é a diferença entre a frequência de ressonância do MC em 80% de UR e em 0% de UR. Elevados valores de Δf foram observados para PHEMA-20 e o menor deles para PHEMA-1000, corroborando com o

comportamento de deflexão observado na Figura 6a. Valores negativos de Δf observados estão relacionados com o aumento de massa devido ao intumescimento do polímero:

$$\Delta f = \frac{1}{2\pi} \left(\frac{k}{\Delta m} \right)^{1/2} \quad (5)$$

onde k é a constante de mola do cantilever. Os aumentos da massa relativa estão apresentados na Tabela 1; o maior valor foi determinado para o MC revestido com PHEMA-20 como $(5,1 \pm 0,8) \%$. A dependência de Δf e os valores de aumento de massa relativa em função da massa molar do PHEMA estão apresentados nas Figuras 8a e 8b, respectivamente. Embora existam somente dados de três pontos, Δf e o aumento dos valores de massa relativa sugerem que o intumescimento do PHEMA tende a aumentar exponencialmente com o decréscimo da massa molar. Os valores de Δf e de massa relativa determinada para PHEMA-300 e PS/PHEMA-300 são próximos, embora os valores de $\Delta\sigma$ sejam bastante diferentes, isto indica que a quantidade de água é aproximadamente a mesma nas duas situações, porém as moléculas de água na interface de SiO_2 /PHEMA estão ordenadas de uma maneira diferente das moléculas de água da interface PS/PHEMA. Além disso, a organização das moléculas de água no sistema polímero/MC não depende da espessura da camada de polímero porque PHEMA-300 e PHEMA-1000 possuem espessuras semelhantes, apesar de possuírem valores de $\Delta\sigma$, Δf e aumento de massa relativa bem diferente. PHEMA-300 foi depositado sobre os MCs previamente recobertos com PS, apresentando retração (dewetting) dos filmes de PHEMA-20, impedindo seu uso nas curvas de deflexão sobre os ciclos de umidade. Micrografias óticas de campo claro dos filmes poliméricos de PS/PHEMA-20,

PS/PHEMA-300, PS/PHEMA-1000 e PHEMA-20 após 5, 38, 100, 308 e 1085 minutos de exposição em elevada umidade relativa do ar estão apresentadas na Figura 7.

Figura 7: Micrografias óticas de campo claro dos filmes poliméricos de PS/PHEMA-20, PS/PHEMA-300, PS/PHEMA-1000 e PHEMA-20 após 5, 38, 100, 308 e 1085 minutos de exposição em elevada umidade relativa do ar.

Figura 8: Dependência da (a) variação de frequência do microcantilever (Δf) e (b) aumento de valores relativos de massa com a massa molar de PHEMA devido ao aumento da umidade relativa do ar (UR). Os valores de Δf foram obtidos a partir das frequências de ressonância do MC determinadas a 80% de UR e a 0% de UR.

A histerese observada nas isotermas de intumescimento e desintumescimento para PHEMA-20, PHEMA-300 e PHEMA-1000 ocorrem quando o teor de água no intumescimento é maior do que no desintumescimento, indicando retenção de água no sistema polímero/MC (*Roos, 2003*). Em baixa umidade relativa o comprimento de persistência do polímero aumenta e a entropia diminui. Portanto, durante o processo de deflexão em elevada umidade relativa às cadeias poliméricas exploram mudanças conformacionais mais amplas e, assim, a entropia precisa ser equilibrada por um arranjo maior na deflexão do MC.

4.3 - Efeitos interfaciais da camada de hidratação na deflexão do MC

A orientação da camada de água interfacial e o tamanho das cadeias poliméricas parecem controlar as deflexões dos MCs, uma vez que elas dão origem ao estresse diferencial de superfície gerada entre os lados opostos do MCs. No caso do substrato

hidrofílico, como SiO_2 , a água interage com ambos, substrato e PHEMA, por ligação de hidrogênio. Os grupos hidroxilas do PHEMA tendem a se orientar para água presente na superfície do SiO_2 , conforme esquematicamente representado na Figura 9a. Tal efeito é favorecido para PHEMA de baixa massa molar, o qual tem restrição entrópica menor. Por outro lado, os substratos hidrofóbicos, como PS, não interagem com água e espera-se que os grupos metílicos do PHEMA se orientem para o substrato, situação governada por fracas forças de dispersão, como mostrado na Figura 9b. Assim, a camada interfacial de água entre o SiO_2 (superfície do MC puro) e PHEMA é mais fortemente ligada do que no caso da camada de água interfacial entre PS (depositado em MC), resultando na diferença de transdução de sinal.

Figura 9: Esquema de disposição da camada interfacial de água em alta e baixa UR, quando (a) filme fino de PHEMA foi depositada sobre um substrato hidrofílico (SiO_2) e (b) filme fino de PHEMA foi depositado num substrato hidrofóbico (PS). O retângulo cinza representa o microcantilever de silício, as esferas azuis são as moléculas de água, as linhas verdes são representam o filme de PHEMA polímero e da linha laranja é o PS.

Elipsometria é uma técnica óptica muito sensível para variações de espessura (d) e índice de refração (n) de filmes finos, foi utilizada para obter evidências experimentais adicionais para o modelo proposto. Para condições ambientais com UR <80%, as mudanças nos ângulos elipsométricos (Δ e ψ) mensurados para filmes poliméricos foram muito pequenos, mesmo depois de 4 h em contato com a umidade. Medidas elipsométricas foram feitas com sucesso para PHEMA-300 a 80% de UR em função do

tempo. As Figuras 10a e 10b mostram a dependência média linear dos valores de d e n determinados para PHEMA-300 sobre lâminas de Si como uma função da raiz quadrada do tempo. Este tipo de comportamento é típico de mecanismo difusional Fickiano, que descreve o transporte de moléculas em direção a matriz sem quaisquer interações específicas entre as moléculas o líquido e a matriz polimérica.

Figura 10: Dependência média da (a) espessura e do (b) índice de refração, n , em função da raiz quadrada do tempo determinada para PHEMA-300 em 80% de UR em $(24 \pm 1)^\circ\text{C}$.

As equações 6 e 7 permitem estimar os valores de d e n durante 15 minutos como sendo 358,5 nm e 1,4536, respectivamente. O aumento no valor d corresponde a 1.3% do valor inicial, o que é devido ao intumescimento. No entanto, não é possível correlacionar diretamente com a quantidade de água na camada de PHEMA.

$$d \text{ (nm)} = 353,7 + 1,2389t^{0,5} \quad (6)$$

$$n = 1,4652 - 0,003t^{0,5} \quad (7)$$

O grau de intumescimento pode ser estimado pelas mudanças no índice de refração da camada de PHEMA.

$$n_x = n_{\text{PHEMA}}\Phi_{\text{PHEMA}} + n_{\text{água}}\Phi_{\text{água}} \quad (8)$$

$$\Phi_{\text{PHEMA}} + \Phi_{\text{água}} = 1 \quad (9)$$

onde n_x é o índice de refração de uma camada de PHEMA intumescida, n_{PHEMA} e $n_{\text{água}}$ são os índices de refração do PHEMA ($n = 1,465 \pm 0,005$) determinada após o *spin-coating* e da água destilada ($n = 1,3334 \pm 0,0005$), determinado com um refratômetro Abbé em $(24 \pm 1)^\circ\text{C}$, respectivamente. Φ_{PHEMA} e $\Phi_{\text{água}}$ representam a fração de volume de PHEMA e água na camada, respectivamente. Substituindo n_x por 1,4536 na equação 8 e combinando com a equação 9, o valor de $\Phi_{\text{água}}$ de 8,8% foi calculado. Isto corresponde a aproximadamente três vezes a quantidade de água estimada por Δf na Tabela 1. Por outro lado, a exposição PHEMA-1000 durante 4 h a 80% UR levou a mudanças na ordem da precisão das medições elipsométricas ($\Delta \pm 0.1^\circ$ $\psi \pm 0.05^\circ$), corroborando com as pequenas deflexões observadas para MC revestidos com PHEMA-1000. Medidas elipsométricas para PHEMA-20 não foram bem-sucedidas, pois os filmes tornaram-se irregulares (não homogêneo) (Figura 7) e o feixe de laser se espalhava a partir da superfície para todas as direções. O ambiente do *spin-coater* foi condicionado com N_2 seco, para que logo após o revestimento rotacional as curtas cadeias de PHEMA-20, em particular as da camada superior, que possuem maior mobilidade que PHEMA-300 ou PHEMA-1000, expusessem os grupos metilas hidrofóbicos à baixa umidade do ambiente controlado (Figura 11a). Na cela elipsométrica sob alta umidade relativa os grupos hidroxilas tendem a orientar para o ar húmido (Figura 11b), provocando a segregação molecular na superfície e criando a morfologia não homogênea observada na Figura 7. Não foi possível monitorar por

elipsometria a evolução da espessura ou do índice de refração para quaisquer filmes PHEMA depositados sobre lâminas de Si previamente recobertas com PS. Os filmes de PHEMA sofreram dewetting ou tornaram-se demasiados irregulares (Figura 7).

Figura 11: Representação esquemática da orientação dos grupos metilas e hidroxilas do PHEMA em (a) baixa UR e (b) alta UR.

As limitações da elipsometria se comparada com a detecção de resposta nanomecânica são:

- (i) O baixo contraste óptico entre SiO_2 e PHEMA, que restringiram os experimentos para o intumescimento substancial comum a níveis elevados de umidade relativa e,
- (ii) Baixa reprodutibilidade quando os filmes não são homogêneos.

Assim, os sensores de MC são vantajosos porque as mudanças físicas nos filmes poliméricos podem ser detectadas num período de tempo muito menor e num amplo intervalo de UR, independentemente da morfologia do filme.

4.4 – Conclusões Parciais

Sensores nanomecânicos baseados em *microcantilevers* são excelentes sensores de fenômenos físicos de superfície e têm grande potencial como uma ferramenta sensível para a caracterização rápida de filmes finos de diversos materiais. Neste trabalho estudou-se sistematicamente o intumescimento e desintumescimento de filmes de PHEMA com três diferentes massas molares, os quais foram depositados sobre MCs puros ou previamente recobertos com poliestireno (PS) e as deflexões resultantes do estresse diferencial de superfícies sob ciclos de umidade foram monitoradas. Observou-se que o intumescimento do PHEMA tende a aumentar exponencialmente com a diminuição do peso molecular, uma vez que as curtas cadeias de polímero possuem maior grau de liberdade do que as cadeias poliméricas mais longas. Medidas elipsométricas evidenciaram que o comportamento do intumescimento de filmes de PHEMA-300 sob 80% UR segue o modelo difusional de Fickian. No entanto, devido ao fraco contraste óptico ou a não homogeneidade dos filmes com cadeias poliméricas mais curtas ou mais longas do que PHEMA-300 não puderam ser investigados por elipsometria. Dewetting de filmes de PHEMA depositados sobre superfícies recobertas com PS também não foram monitorados por elipsometria. Portanto, em comparação com elipsometria, o monitoramento do comportamento de intumescimento do PHEMA por respostas nanomecânicos provou ser mais rápido e menos restritivo.

Capítulo II: Detecção de biomarcador cancerígeno em sangue por meio de um sensor nanomecânico

5 - Resultados e Discussão

5.1 - Representação esquemático do sensor nanomecânico

O sangue contém a maioria dos biomarcadores protéicos, e a detecção e dosagem dessas biomoléculas em estágio precoce da doença é crucial no sucesso do tratamento (LIOTTA; FERRARI; PETRICON, 2003; SIMPSON et al., 2008; HANASH; PITTERI; FACA, 2008; SCHIESS; WOLLSCHIED; AEBERSOLD, 2009). Sensores nanomecânicos baseados em MC de silício ou nitreto de silício são interessantes, pois respondem no estresse de superfície devido à adsorção de biomoléculas (KOSAKA, et al., 2013). A vantagem dos sensores nanomecânicos reside na sua capacidade de medir pequenos deslocamentos com uma precisão muito elevada. Um ponto-chave nestes nanosensores é a sua capacidade em detectar biomarcadores com elevada reprodutibilidade em concentrações de pelo menos um milhão de vezes mais baixo do que o resto das proteínas presentes no sangue (STERN et al., 2010; SWIERCZEWSKA et al., 2012; DE LA RICA; STEVENS, 2012). No trabalho apresentado, a técnica desenvolvida baseia-se na detecção em concentrações traços do biomarcador cancerígeno antígeno carcinoembrionário (CEA ~ 190 kDa) em solução tamponada e em plasma sanguíneo. Este biomarcador é usado no diagnóstico, prognóstico e monitoramento de câncer de colón (TOTHILL, 2002.). Para o ensaio sanduiche, a proteína é primeiramente reconhecida pelo anticorpo ancorado na superfície das nanopartículas de ouro e posteriormente identificado pelo biomarcador de

captura presente na superfície dos MCs funcionalizados. Os *cantilevers* utilizados exibem excelentes atributos mecânicos na avaliação de reconhecimento de biomoléculas sobre sua superfície, tanto em ligações de nanoescala (modo estático) como em variações das propriedades de vibração (modo dinâmico). Para a detecção de CEA utilizou-se o modo dinâmico e mensurou-se a mudança da frequência de ressonância do cantilever, que decai linearmente em função da massa de nanopartícula adicionada, medida a qual foi avaliada pelo método ótico descrito na seção experimental 3.1 da Parte B. A representação esquemática do ensaio sanduiche sobre os *cantilevers* e do efeito sobre a frequência de ressonância esta apresentada nas Figuras 12a e 12d. A Figura 12b mostra micrografia obtida por MEV dos *cantilevers* de silício utilizados neste biosensor. A Figura 12c mostra o método de medida ótico da avaliação da frequência de ressonância por meio de um feixe monocromático de luz incidente na extremidade final livre do cantilever.

Figura 12: (a) Representação esquemática do ensaio sanduiche sobre os MCs, (b) micrografia obtida por MEV dos *cantilevers* de silício utilizados (500 μm de comprimento, 100 μm de largura e 1 μm de espessura), (c) esquema do método ótico de deflexão mensurado pela incidência de um feixe de laser sobre a extremidade final livre do cantilever e (d) Esquema do efeito da adição de massa de nanopartículas aderidas por bioreconhecimento sobre a frequência de ressonância do cantilever, onde o decréscimo da frequência é proporcional à massa adicionada.

5.2 - Funcionalização das nanopartículas de ouro e dos MCs

A funcionalização do cantilever com o anticorpo de captura contra o biomarcador compreende as etapas de silanização, ligação do anticorpo somente sobre um lado da superfície e bloqueio contra interações não-específicas com polietileno

glicol. A imersão do MC sobre amostra de soro permite que a imunorreacção entre o biomarcador e o anticorpo de captura ocorra. Finalmente, a imunorreacção é avaliada pela exposição do anticorpo de detecção contra o biomarcador que está aderido nas nanopartículas de ouro de 100 nm de diâmetro. A detecção do anticorpo reconhece a região específica livre do biomarcador. A variação da frequência de ressonância pela deflexão do feixe de laser causado pela vibração do cantilever é avaliado pela medida do *position-sensitive photodetector* (PSD), sendo a direita e a esquerda correspondentes a fotocorrentes mensuradas pelo PSD que permitem a determinação das coordenadas do feixe de laser refletido sobre o fotodetector e assim avaliar a deflexão do cantilever. O esquema dos passos envolvidos na funcionalização das nanopartículas de ouro e dos MCs para os passos posteriores de imobilização dos anticorpos de reconhecimento (nanopartícula de ouro) e de captura (cantilever) estão apresentados nas Figuras 13a e 13b, respectivamente.

Figura 13: (a) Esquema de funcionalização das nanopartículas de ouro com 100 nm de diâmetro revestidos com carboxi-polímero e posterior imobilização covalente dos anticorpos de detecção (MAb3C1), e (b) Esquema de funcionalização do cantilever por meio da silanização com (3-glicidiloxipropil) trimetoxisilano e posteriores reações de ativação de grupos funcionais e imobilização do anticorpo de captura (MAb3C6).

5.3 - Ensaio sanduiche

O ensaio sanduiche envolveu dois passos de bioreconhecimento para aumentar a seletividade e amplificar a resposta do sensor, onde (i) o cantilever funcionalizado é imerso em 1 mL de amostra de fluido (soro) por 1 hora a 37 °C, permitindo o reconhecimento da molécula alvo (CEA) pelos anticorpos de captura (MAb3C6) imobilizados na superfície do cantilever, e (ii) após lavagem exaustiva e bloqueio

((aminoetil) polietileno glicol) para a minimização de adsorções não específicas, o cantilever é imerso em 1 mL de $1\mu\text{g mL}^{-1}$ de solução de nanopartículas de ouro funcionalizada com os anticorpos MAb3C1 a 37 °C por 1 hora.

5.4 - Medidas das assinaturas de massa

A avaliação do sensor de massa foi realizada pelo estudo prévio das características exibidas pelas propriedades mecânicas dos arranjos dos MCs (Figura 1b), que exibem frequência de ressonância fundamental de $5,08 \pm 0,18$ KHz e fator de qualidade de $17,0 \pm 1,8$ (dados estatísticos de 400 *cantilevers*). A frequência de ressonância do modo fundamental do *cantilever* foi medida em ar antes e após a exposição do cantilever funcionalizado com as nanopartículas de ouro funcionalizadas para a detecção da CEA. O aumento de massa devido à imobilização das nanopartículas de ouro causa decréscimo da frequência de ressonância (TAMAYO et al., 2013; WAGGONER; VARSHNEY; CRAIGHEAD, 2009), conforme o ilustrado na Figura 12d. O intrínseco limite massa-deteção para este dispositivo em ar é de aproximadamente 1 pg (10^{-12} g) (EKINCI; YANG; ROUKES, 2004), e o mínimo de nanopartículas detectadas foi de aproximadamente 100. Apesar de ressonadores nanomecânico miniaturizados poderem detectar em vácuo massas adicionadas na região de zeptogramas (10^{-21} g) (EKINCI; YANG; ROUKES, 2004; HANAY, et al., 2012; CHASTE, et al., 2012), ou valores menores. Enfatiza-se que esta aproximação não fornece nenhum benefício em aplicações biológicas devido a ruídos de fundo causados por interações não específicas, sendo que em nosso biosensor é de aproximadamente 50 pg, correspondendo a aproximadamente 0,1 nanopartícula μm^{-2} . Vantajosamente, MC relativamente grandes podem ser manuseados facilmente e mensurados com simples

instrumentação. Transporte difusivo de massa definem os limites de detecção que se adapta com a área do sensor (SQUIRES; MESSINGER; MANALIS, 2008; ARLETT; MYERS, 2011). Na verdade, detecção de concentrações traços de proteínas com sensores em nanoescala requereriam impraticáveis longas horas, e em alguns casos dias.

5.5 - Detecção nanomecânica do biomarcador de câncer

A Figura 14 mostra a detecção nanomecânica do biomarcador CEA. Para avaliarmos a discriminação do sinal de bioreconhecimento de interações não específicas, para cada ensaio de detecção realizou-se um rigoroso experimento controle que compreendia a substituição do anticorpo de captura pelo anticorpo da antiperoxidase (anti-HRP) não específico para CEA, usando uma alta concentração de solução de CEA ($1 \mu\text{g mL}^{-1}$) como amostra. Os anticorpos de detecção de CEA foram mantidos ancorados nas nanopartículas de ouro para os ensaios controles. As amostras controles não exibem o fenômeno de mudança de frequência de ressonância devido ao não reconhecimento da CEA pela anti-peroxidase e consequentemente a não imobilização de nanopartículas de ouro, em detrimento ao observado para os *cantilevers* recobertos com os anticorpos de captura ($[\text{CEA}] = 1 \text{ pg mL}^{-1}$). A Figura 14a ilustra o comportamento observado para os ensaios de controle e os de detecção de CEA. A Figura 13b mostra as respostas mecânicas para o CEA em concentrações traços que variam de 10 ng mL^{-1} ($10 \cdot 10^{-18} \text{ g mL}^{-1}$) a 1 pg mL^{-1} ($1 \cdot 10^{-12} \text{ g mL}^{-1}$) diluído em tampão PBS e em soro. Estes resultados apresentados compreendem a resposta de 345 *cantilevers* para os ensaios de CEA, mostrando uma excelente concordância que confirma que a mudança de frequência de ressonância surge com a massa de nanopartículas adicionada. As mudanças de frequência de ressonância relativa para o

controle experimental estão apresentadas na região sombreada em cinza que representa os valores médios somados ao desvio padrão dos dados obtidos.

Figura 14: Detecção nanomecânica do biomarcador CEA. (a) Frequência de ressonância nanomecânica do cantilever de Si antes a após os passos de bioreconhecimento, com detecção dos anticorpos ancorados nas nanopartículas de ouro para controle experimental e para o ensaio de detecção de CEA (1 pg mL^{-1} em tampão PBS). Medidas foram realizadas em ar em temperatura ambiente. (b) Mudança de frequência de ressonância relativa do modo de vibração fundamental em função da concentração do biomarcador em amostras de tampão e soro (símbolo vermelho). Os valores médios e os erros foram calculados por análise estatística Gaussiana dos dados para diferentes cantilever. As linhas são somente guias para os olhos. As mudanças de frequências de ressonância medidas em solução tampão foram comparados com as mudanças de frequências de ressonância teórica predita pela distribuição de nanopartículas sobre o *cantilever* obtido por MEV (símbolo azul). As mudanças de frequência de ressonância relativa para o controle experimental estão apresentadas na região sombreada em cinza que representa os valores médios somados ao desvio padrão.

Ambos os experimentos (Figuras 14a e 14b) foram realizados em PBS. Para a Figura 14a no experimento controle, os picos da frequência de ressonância antes e após o passo de reconhecimento das nanopartículas são quase indistinguíveis, enquanto que no ensaio de detecção do CEA observa-se uma mudança significativa no pico de frequência de ressonância para valores menores. No caso da Figura 14b observamos uma excelente concordância entre os valores teóricos e experimentais baseados na massa das nanopartículas ligadas no cantilever e quantificadas através de micrografias obtidas por MEV (Figura 15), sendo a mudança da frequência de ressonância avaliada em função da concentração de CEA em PBS (direita) e diluída em soro (esquerda). Os níveis de ruído de fundo causados pelas interações não específicas obtidas dos ensaios controles também estão plotados para os ensaios em PBS e em soro. Os limites de detecção nestas curvas de calibração são $0,1 \text{ fg mL}^{-1}$ em tampão e uma ordem de magnitude maior que o soro devido à enorme quantidade de competições de interações não específicas. É interessante observar o limite de detecção pela técnica benchmark em diagnósticos clínicos, enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) ($\sim 1 \text{ ng mL}^{-1}$) (ZHOU, et al., 2012).

Figura 15: Micrografias obtidas por MEV na região do cantilever e do *preclamping* após o ensaio sanduiche no experimento controle e no ensaio de detecção de 1 fg mL^{-1} de CEA em soro.

5.7 - Influência do limite difusional

Os sinais nanomecânicos mostram um estreito intervalo dinâmico, e exibe uma dependência próxima a concentrações acima de 10 fg mL^{-1} . Este potencial limitado é justificado pelos limites de detecção extremamente baixos, os quais podem ser usados para determinar a presença de biomarcadores raros, caso contrário permaneceria identificável com as técnicas atuais utilizadas em diagnósticos clínicos (DE LA RICA; STEVENS, 2012). A rápida saturação do sinal sugere que as interações nanopartícula-nanopartícula e nanopartícula-superfície definem um máximo de densidade de nanopartículas na superfície. Para confirmar esta hipótese, analisou-se por MEV a distribuição de nanopartículas sobre a superfície do cantilever e do preclamping/chip (seção experimental 3.9 Parte B). Análise de densidade e distribuição de nanopartículas

sobre a superfície (Figura 16a) mostra a densidade de nanopartículas na superfície do *preclamping* e do cantilever obtida a partir da análise das imagens de MEV. Uma característica importante obtida a partir dos dados mostrados na Figura 16a é que o número de nanopartículas satura rapidamente para concentrações superiores a 1 fg mL^{-1} . A Figura 16b mostra a quantidade relativa de nanopartículas de ouro distribuídas como monômeros e aglomerados (dímeros, trímeros, etc). Para concentrações inferiores a 1 fg mL^{-1} , a maior parte das nanopartículas está ligada a superfície do ressonador nanomecânico como monômero (aproximadamente 80%). No entanto, para concentrações mais elevadas, surge uma transição abrupta na distribuição de nanopartículas. As nanopartículas que formam aglomerados são cerca de 60% do total de nanopartículas sobre a superfície. A distribuição das nanopartículas segue um padrão semelhante no cantilever, *preclamping* e chip. São observadas diferenças entre as distribuições de nanopartículas obtidas em PBS e soro.

Figura 16: (a) Densidade de nanopartículas de ouro sobre o cantilever e chip em soro, (b) Distribuição relativa de nanopartículas de ouro como monômeros e aglomerados.

A distribuição de nanopartículas apresentada na Figura 15 exibe um comportamento intrigante. Para baixas concentrações detectáveis, 10 ag mL^{-1} , as nanopartículas se distribuem preferencialmente como monômeros, sendo aproximadamente 80 % do total de nanopartículas. Com o aumento da concentração do biomarcador, a densidade de monômeros na superfície atinge rapidamente a saturação, e as nanopartículas formam preferencialmente dímeros sobre a superfície. Similarmente, como a concentração do biomarcador aumenta a densidade de dímeros de nanopartículas na superfície, ocorre rapidamente uma saturação, e as nanopartículas rapidamente formam trímeros sobre a superfície. Este comportamento não foi observado nos experimentos controles, os quais claramente indicam que extraordinariamente a distribuição de nanopartículas encontrada nos ensaios de CEA é desencadeado por um pequeno evento de reconhecimento biomolecular sobre a superfície do cantilever. Nenhuma diferença foi observada entre a distribuição de nanopartículas no chip, preclamping e cantilever. Este comportamento foi observado em ensaios com PBS. Determinar o mecanismo básico que origina este padrão de distribuição é um formidável desafio. Apesar da complexidade deste problema, é claro que interações de curto alcance e longo alcance entre as nanopartículas, biomarcador e cantilever desempenham uma função favorável na amplificação de quantidades extremamente pequenas de eventos de bioreconhecimento que superam os limites de detecção preditos pela simples consideração baseada em transportes de difusão e convecção (NAIR; ALAM, 2006; SQUIRES; MESSINGER; MANALIS, 2008).

5.8 – Conclusões Parciais

Cantilever de silício podem ser usados em transdução de sinal nanomecânico para bioensaios sanduiche funcionalizadas com nanopartículas de ouro. Utilizando *cantilevers* simples e comercialmente disponíveis e instrumentação não sofisticada pode-se identificar e dosar concentrações traços de biomarcadores cancerígenos presentes no sangue com elevada precisão e ultrassensibilidade. Este trabalho em colaboração com o grupo espanhol direcionou para o desenvolvimento de um biosensor híbrido, sensor nanomecânico (mudança de frequência de ressonância devido à adição de massa) e optoplasmônico (devido ao comportamento de fluorescência exibidas pelas nanopartículas de ouro após o processo de bioreconhecimento). O biosensor híbrido apresenta-se interessante por reduzir a presença de eventos falsos positivos e falsos negativos em diagnósticos de interesse clínico-analítico.

Referências Bibliográficas

< www.nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/1984/, acessado em 01/03/2015>

ÁLVAREZ, M.; TAMAYO, J. Optical sequential readout of microcantilever arrays for biological detection. *Sensors and Actuators B: Chemical*, v. 106, n. 2, p. 687-690, 2005.

AMIM JR, J.; KOSAKA, P. M.; PETRI, D. F. S. Characteristics of thin cellulose ester films spin-coated from acetone and ethyl acetate solutions. *Cellulose*, v. 15, n. 4, p. 527-535, 2008.

AMIM JR, J.; PETRI, D. F. S.; MAIA, F. C.; MIRANDA, P. B. Solution behavior and surface properties of carboxymethylcellulose acetate butyrate. *Cellulose*, v. 16, n. 5, p. 773-782, 2009.

ARLETT, J. L.; MYERS, E. B.; ROUKES, M. L. Comparative advantages of mechanical biosensors. *Nature nanotechnology*, v. 6, n. 4, p. 203-215, 2011.

ASCIERTO, P. A.; KALOS, M.; SCHAEER, D. A.; CALLAHAN, M. K.; WOLCHOK, J. D. Biomarkers for immunostimulatory monoclonal antibodies in combination strategies for melanoma and other tumor types. *Clinical Cancer Research*, v. 19, n. 5, p. 1009-1020, 2013.

AZZAM, R. M.; BASHARA, N. M. Ellipsometry and Polarized Light. Amsterdam, North Holland, 1988.

BALAMURUGAN, S.; OBUBUAFO, A.; SOPER, S. A.; SPIVAK, D. A. Surface immobilization methods for aptamer diagnostic applications. *Analytical and bioanalytical chemistry*, v. 390, n. 4, p. 1009-1021, 2008.

BALLARD-BARBASH, R.; FRIEDENREICH, C. M.; COURNEYA, K. S.; SIDDIQI, S. M.; MCTIERNAN, A.; ALFANO, C. M. Physical activity, biomarkers, and disease outcomes in

cancer survivors: a systematic review. *Journal of the National Cancer Institute*, v. 104, n. 11, p. 815-840, 2012.

BAYLIN, S. B.; OHM, J. E. Epigenetic gene silencing in cancer—a mechanism for early oncogenic pathway addiction?. *Nature Reviews Cancer*, v. 6, n. 2, p. 107-116, 2006.

BOOGAARD, P. J.; VAN SITTERT, N. J. Suitability of S-phenyl mercapturic acid and trans-trans-muconic acid as biomarkers for exposure to low concentrations of benzene. *Environmental health perspectives*, v. 104, n. Suppl 6, p. 1151, 1996.

BORREBAECK, C. A. K. Antibodies in diagnostics—from immunoassays to protein chips. *Immunology today*, v. 21, n. 8, p. 379-382, 2000.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, v. 72, n. 1, p. 248-254, 1976.

BRADLEY, C.; JALILI, N.; NETT, S. K.; CHU, L.; FÖRCH, R.; GUTMANN, J. S.; BERGER, R. Response characteristics of thermoresponsive polymers using nanomechanical cantilever sensors. *Macromolecular chemistry and physics*, v. 210, n. 16, p. 1339-1345, 2009.

BRANDA, F.; COSTANTINI, A.; LUCIANI, G.; AMBROSIO, L. Improvement of swelling properties of poly (2-hydroxyethyl methacrylate) hydrogel by means of biomimetic method. *Journal of biomedical materials research*, v. 57, n. 1, p. 79-83, 2001.

BUMBU, G. G.; WOLKENHAUER, M.; KIRCHER, G.; GUTMANN, J. S.; BERGER, R. Micromechanical cantilever technique: A tool for investigating the swelling of polymer brushes. *Langmuir*, v. 23, n. 4, p. 2203-2207, 2007.

CALLEJA, M.; TAMAYO, J.; NORDSTRÖM, M.; BOISEN, A. Low-noise polymeric nanomechanical biosensors. *Applied Physics Letters*, v. 88, n. 11, p. 113901, 2006.

CARRASCOSA, L. G.; MORENO, M.; ÁLVAREZ, M.; LECHUGA, L. M. Nanomechanical biosensors: a new sensing tool. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, v. 25, n. 3, p. 196-206, 2006.

CHANG, T.; SUN, B. N.; SUN, C. R. Anti-idiotypic antibodies specific for the paratope of antibodies which bind to IgE-bearing B cells but not basophils. *Biotechnology Advances*, v. 14, n. 3, p. 369-369, 1996.

CHANG, Y. M.; DONOVAN, M. J.; TAN, W. Using aptamers for cancer biomarker discovery. *Journal of nucleic acids*, v. 2013, 2013.

CHASTE, J.; EICHLER, A.; MOSER, J.; CEBALLOS, G.; RURALI, R.; BACHTOLD, A. A nanomechanical mass sensor with yoctogram resolution. *Nature nanotechnology*, v. 7, n. 5, p. 301-304, 2012.

CHATZANDROULIS, S.; GOUSTOURIDIS, D.; RAPTIS, I. Polymeric film characterization for use in bimorph chemical sensors. *Microelectronic engineering*, v. 78, p. 118-124, 2005.

CHEVALIER, S.; CUESTAS-AYLLON, C.; GRAZU, V.; LUNA, M.; FERACCI, H.; DE LA FUENTE, J. M. Creating biomimetic surfaces through covalent and oriented binding of proteins. *Langmuir*, v. 26, n. 18, p. 14707-14715, 2010.

CHIBATA, I. Immobilized enzymes, research and development. Kodansha Ltd, Japan, 1978.

CHROMECEK, R. C.; DEICHERT, W. G.; FALCETTA, J. J. Oxygen-permeable, soft, flexible, hydrophilic, nonhydrolyzing, tough. U.S. Patent n. 4,276,402, 30 jun. 1981.

CHUNG, A. J.; RUBNER, M. F. Methods of loading and releasing low molecular weight cationic molecules in weak polyelectrolyte multilayer films. *Langmuir*, v. 18, n. 4, p. 1176-1183, 2002.

CRAIGHEAD, H. Nanomechanical systems: Measuring more than mass. *Nature nanotechnology*, v. 2, n. 1, p. 18-19, 2007.

DAI, J.; JENSEN, A. W.; MOHANTY, D. K.; ERNDT, J.; BRUENING, M. L. Controlling the permeability of multilayered polyelectrolyte films through derivatization, cross-linking, and hydrolysis. *Langmuir*, v. 17, n. 3, p. 931-937, 2001.

DAO, D. V.; NAKAMURA, K.; BUI, T. T.; SUGIYAMA, S. Micro/nano-mechanical sensors and actuators based on SOI-MEMS technology. *Advances in Natural Sciences: Nanoscience and Nanotechnology*, v. 1, n. 1, p. 013001, 2010.

DE LA RICA, R.; STEVENS, M. M. Plasmonic ELISA for the ultrasensitive detection of disease biomarkers with the naked eye. *Nature nanotechnology*, v. 7, n. 12, p. 821-824, 2012.

EKINCI, K. L.; YANG, Y. T.; ROUKES, M. L. Ultimate limits to inertial mass sensing based upon nanoelectromechanical systems. *Journal of applied physics*, v. 95, n. 5, p. 2682-2689, 2004.

FAGHIHNEJAD, A.; ZENG, H. Hydrophobic interactions between polymer surfaces: using polystyrene as a model system. *Soft Matter*, v. 8, n. 9, p. 2746-2759, 2012.

FAN, J. A.; BAO, K.; LASSITER, J. B.; BAO, J.; HALAS, N. J.; NORDLANDER, P.; CAPASSO, F. Near-normal incidence dark-field microscopy: applications to nanoplasmonic spectroscopy. *Nano letters*, v. 12, n. 6, p. 2817-2821, 2012.

FRITZ, Jürgen. Cantilever biosensors. *Analyst*, v. 133, n. 7, p. 855-863, 2008.

FUJIMOTO, J.; PETRI, D. F. S. Adsorption behavior of carboxymethylcellulose on amino-terminated surfaces. *Langmuir*, v. 17, n. 1, p. 56-60, 2001.

GHI, P. Y.; HILL, D. J. T.; WHITTAKER, A. K. PFG-NMR measurements of the self-diffusion coefficients of water in equilibrium poly (HEMA-co-THFMA) hydrogels. *Biomacromolecules*, v. 3, n. 3, p. 554-559, 2002.

GODIN, M.; TABARD-COSSA, V.; MIYAHARA, Y.; MONGA, T.; WILLIAMS, P. J.; BEAULIEU, L. Y.; GRUTTER, P. Cantilever-based sensing: the origin of surface stress and optimization strategies. *Nanotechnology*, v. 21, n. 7, p. 075501, 2010.

GÓMEZ-MARTÍNEZ, R.; HERNÁNDEZ-PINTO, A. M.; DUCH, M.; VÁZQUEZ, P.; ZINOVIEV, K.; ENRIQUE, J.; PLAZA, J. A. Silicon chips detect intracellular pressure changes in living cells. *Nature nanotechnology*, v. 8, n. 7, p. 517-521, 2013.

GRIESHABER, D.; MACKENZIE, R.; VOEROES, J.; REIMHULT, E. Electrochemical biosensors-sensor principles and architectures. *Sensors*, v. 8, n. 3, p. 1400-1458, 2008.

GUPTA, A. K.; NAIR, P. R.; AKIN, D.; LADISCH, M. R.; BROYLES, S.; ALAM, M. A.; BASHIR, R. Anomalous resonance in a nanomechanical biosensor. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 103, n. 36, p. 13362-13367, 2006.

HAGAN, M. F.; MAJUMDAR, A.; CHAKRABORTY, A. K. Nanomechanical forces generated by surface grafted DNA. *The Journal of Physical Chemistry B*, v. 106, n. 39, p. 10163-10173, 2002.

HANASH, S. M.; PITTERI, S. J.; FACA, V. M. Mining the plasma proteome for cancer biomarkers. *Nature*, v. 452, n. 7187, p. 571-579, 2008.

- HANAY, M. S.; KELBER, S.; NAIK, A. K.; CHI, D.; HENTZ, S.; BULLARD, E. C.; ROUKES, M. L. Single-protein nanomechanical mass spectrometry in real time. *Nature nanotechnology*, v. 7, n. 9, p. 602-608, 2012.
- HENRY, N. L.; HAYES, D. F. Cancer biomarkers. *Molecular oncology*, v. 6, n. 2, p. 140-146, 2012.
- HERNÁNDEZ-MORENO, D.; SOLER, F.; MÍGUEZ, M. P.; PÉREZ-LÓPEZ, M. Brain acetylcholinesterase, malondialdehyde and reduced glutathione as biomarkers of continuous exposure of tench, *Tinca tinca*, to carbofuran or deltamethrin. *SCIENCE OF THE TOTAL ENVIRONMENT*, v. 408, n. 21, p. 4976-4983, 2010.
- HOFFMAN, A. S. Hydrogels for biomedical applications. *Advanced drug delivery reviews*, v. 64, p. 18-23, 2012.
- IGARASHI, S.; ITAKURA, A. N.; TODA, M.; KITAJIMA, M.; CHU, L.; CHIFEN, A. N.; BERGER, R. Swelling signals of polymer films measured by a combination of micromechanical cantilever sensor and surface plasmon resonance spectroscopy. *Sensors and Actuators B: Chemical*, v. 117, n. 1, p. 43-49, 2006.
- JAMES, K.; BELL, G. T. Human monoclonal antibody production: current status and future prospects. *Journal of immunological methods*, v. 100, n. 1, p. 5-40, 1987.
- JAYASENA, S. D. Aptamers: an emerging class of molecules that rival antibodies in diagnostics. *Clinical chemistry*, v. 45, n. 9, p. 1628-1650, 1999.
- JHON, M. S.; ANDRADE, J. D. Water and hydrogels. *Journal of biomedical materials research*, v. 7, n. 6, p. 509-522, 1973.

KNIGHT, M. W.; WU, Y.; LASSITER, J. B.; NORDLANDER, P.; HALAS, N. J. Substrates matter: influence of an adjacent dielectric on an individual plasmonic nanoparticle. *Nano letters*, v. 9, n. 5, p. 2188-2192, 2009.

KOFFAS, T. S.; OPDAHL, A.; MARMO, C.; SOMORJAI, G. A. .Effect of equilibrium bulk water content on the humidity-dependent surface mechanical properties of hydrophilic contact lenses studied by atomic force microscopy. *Langmuir*, v. 19, n. 8, p. 3453-3460, 2003.

KÖHLER, G.; MILSTEIN, C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*, v. 256, n. 5517, p. 495-497, 1975.

KOPROWSKI, H.; HERLYN, D.; DE FREITAS, E. C. **Induction of antibody response to solid tumors with anti-idiotypic antibodies.** U.S. Patent n. 5,053,224, 1 out. 1991.

KOSAKA, P. M.; TAMAYO, J.; RUZ, J. J.; PUERTAS, S.; POLO, E.; GRAZU, V.; CALLEJA, M. Tackling reproducibility in microcantilever biosensors: a statistical approach for sensitive and specific end-point detection of immunoreactions. *Analyst*, v. 138, n. 3, p. 863-872, 2013.

LIOTTA, L. A.; FERRARI, M.; PETRICCINI, E. Clinical proteomics: written in blood. *Nature*, v. 425, n. 6961, p. 905-905, 2003.

LIU, C.; LOPES, M. C.; PIHAN, S. A.; FELL, D.; SOKULER, M.; BUTT, H. J.; BONACCURSO, E. Water diffusion in polymer nano-films measured with microcantilevers. *Sensors and Actuators B: Chemical*, v. 160, n. 1, p. 32-38, 2011.

LIU, T.; PIHAN, S.; ROTH, M.; RETSCH, M.; JONAS, U.; GUTMANN, J. S.; BERGER, R. Frequency Response of Polymer Films Made from a Precursor Colloidal Monolayer on a Nanomechanical Cantilever. *Macromolecules*, v. 45, n. 2, p. 862-871, 2011.

LU, B.; SMYTH, M. R.; O'KENNEDY, R. Tutorial review. Oriented immobilization of antibodies and its applications in immunoassays and immunosensors. *Analyst*, v. 121, n. 3, p. 29R-32R, 1996.

MARTÍNEZ, N. F.; KOSAKA, P. M.; TAMAYO, J.; RAMÍREZ, J.; AHUMADA, O.; MERTENS, J.; CALLEJA, M. High throughput optical readout of dense arrays of nanomechanical systems for sensing applications. *Review of scientific instruments*, v. 81, n. 12, p. 125109, 2010.

MARX, U.; EMBLETON, M. J.; FISCHER, R.; GRUBER, F. P.; HANSSON, U.; HEUER, J.; STRAUGHAN, D. W. Monoclonal antibody production. *ATLA-NOTTINGHAM*-, v. 25, p. 121-138, 1997.

MAUTE, M.; RAIBLE, S.; PRINS, F. E.; KERN, D. P.; WEIMAR, U.; GÖPEL, W. Fabrication and application of polymer coated cantilevers as gas sensors. *Microelectronic engineering*, v. 46, n. 1, p. 439-442, 1999.

MENDELSON, J. D.; YANG, S. Y.; HILLER, J. A.; HOCHBAUM, A. I.; RUBNER, M. F. Rational design of cytophilic and cytophobic polyelectrolyte multilayer thin films. *Biomacromolecules*, v. 4, n. 1, p. 96-106, 2003.

MERTENS, J.; ROGERO, C.; CALLEJA, M.; RAMOS, D.; MARTÍN-GAGO, J. A.; BRIONES, C.; TAMAYO, J. Label-free detection of DNA hybridization based on hydration-induced tension in nucleic acid films. *Nature nanotechnology*, v. 3, n. 5, p. 301-307, 2008.

MOCK, J. J.; HILL, R. T.; DEGIRON, A.; ZAUSCHER, S.; CHILKOTI, A.; SMITH, D. R. Distance-dependent plasmon resonant coupling between a gold nanoparticle and gold film. *Nano letters*, v. 8, n. 8, p. 2245-2252, 2008.

MOLDRICH, G.; LANGE, P.; STRIK, H. Carcinoembryonic antigen in the CSF of cancer patients--the value of intrathecal synthesis and correlation with IgA-diffusion dynamics. *Acta neurologica Belgica*, v. 110, n. 4, p. 314-320, 2010.

OPDAHL, A.; KIM, S. H.; KOFFAS, T. S.; MARMO, C.; SOMORJAI, G. A. Surface mechanical properties of pHEMA contact lenses: viscoelastic and adhesive property changes on exposure to controlled humidity. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, v. 67, n. 1, p. 350-356, 2003.

ÖZKUMUR, E.; NEEDHAM, J. W.; BERGSTEIN, D. A.; GONZALEZ, R.; CABODI, M.; GERSHONI, J. M.; ÜNLÜ, M. S. Label-free and dynamic detection of biomolecular interactions for high-throughput microarray applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 105, n. 23, p. 7988-7992, 2008.

PALIK, E. D. (Ed.). Handbook of optical constants of solids. Academic press, Maryland, 1998.

PERKINS, N. J.; SCHISTERMAN, E. F.; VEXLER, A. ROC curve inference for best linear combination of two biomarkers subject to limits of detection. *Biometrical Journal*, v. 53, n. 3, p. 464-476, 2011.

REUVENY, S.; VELEZ, D.; MACMILLAN, J. D.; MILLER, L. Factors affecting cell growth and monoclonal antibody production in stirred reactors. *Journal of immunological methods*, v. 86, n. 1, p. 53-59, 1986.

Roos, Y. H. *Water Activity - Principles and Measurements*. In Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition, B. Caballero, L. Trugo and P. Finglas (Eds.). Enciclopedia of Food Science and Nutrition, Elsevier, London, p. 6089-6094, 2003.

SADEGHIAN, H.; GOOSEN, J. F. L.; BOSSCHE, A.; VAN KEULEN, F. "A mechanistic model for adsorption-induced change in resonance response of submicron cantilevers." *MOEMS-MEMS 2008 Micro and Nanofabrication*. International Society for Optics and Photonics, p. 68850E-68850E-8, 2008.

SADER, J. E. Surface stress induced deflections of cantilever plates with applications to the atomic force microscope: Rectangular plates. *Journal of Applied Physics*, v. 89, n. 5, p. 2911-2921, 2001.

SCHIESS, R.; WOLLSCHIED, B.; AEBERSOLD, R. Targeted proteomic strategy for clinical biomarker discovery. *Molecular oncology*, v. 3, n. 1, p. 33-44, 2009.

SCHMIDT, M. A.; LEI, D. Y.; WONDRAKZEK, L.; NAZABAL, V.; MAIER, S. A. Hybrid nanoparticle–microcavity-based plasmonic nanosensors with improved detection resolution and extended remote-sensing ability. *Nature communications*, v. 3, p. 1108, 2012.

SEKINE, Y.; IKEDA-FUKAZAWA, T. Structural changes of water in a hydrogel during dehydration. *The Journal of chemical physics*, v. 130, n. 3, p. 034501, 2009.

SHI, X.; CARUSO, F. Release behavior of thin-walled microcapsules composed of polyelectrolyte multilayers. *Langmuir*, v. 17, n. 6, p. 2036-2042, 2001.

SHIH, YU-CHING; CHEN, CHUIN-SHAN; WU, KUANG-CHONG. First-principles surface stress calculations and multiscale deformation analysis of a self-assembled monolayer adsorbed on a micro-cantilever. *Sensors*, v. 14, n. 4, p. 7435-7450, 2014.

SHU, W.; LIU, D.; WATARI, M.; RIENER, C. K.; STRUNZ, T.; WELLAND, M. E.; MCKENDRY, R. A. DNA molecular motor driven micromechanical cantilever arrays. *Journal of the American Chemical Society*, v. 127, n. 48, p. 17054-17060, 2005.

SIMPSON, R. J.; BERNHARD, O. K.; GREENING, D. W.; MORITZ, R. L. Proteomics-driven cancer biomarker discovery: looking to the future. *Current opinion in chemical biology*, v. 12, n. 1, p. 72-77, 2008.

SNOW, D.; WEEKS, B. L.; KIM, D. J.; LOUI, A.; HART, B. R.; HOPE-WEEKS, L. J. Static deflection measurements of cantilever arrays reveal polymer film expansion and contraction. *Journal of colloid and interface science*, v. 316, n. 2, p. 687-693, 2007.

SOUZA, R. C. R.; ANDRADE, C. T. Investigação dos processos de gelatinização e extrusão de amido de milho. *Polímeros: Ciência e Tecnologia*, v. 10, n. 1, p. 24-30, 2000.

SQUIRES, T. M.; MESSINGER, R. J.; MANALIS, S. R. Making it stick: convection, reaction and diffusion in surface-based biosensors. *Nature biotechnology*, v. 26, n. 4, p. 417-426, 2008.

STANG, F.; KEILHOFF, G.; FANSA, H. Biocompatibility of different nerve tubes. *Materials*, v. 2, n. 4, p. 1480-1507, 2009.

STERN, E.; VACIC, A.; RAJAN, N. K.; CRISCIONE, J. M.; PARK, J.; ILIC, B. R.; FAHMY, T. M. Label-free biomarker detection from whole blood. *Nature nanotechnology*, v. 5, n. 2, p. 138-142, 2010.

STONEY, G. G. The transition of metallic films deposited by electrolysis. *Proceedings of the Royal Society London A*, v. 82, p. 172-175, 1909.

STREULI, C. H.; BAILEY, N.; BISSELL, M. J. Control of mammary epithelial differentiation: basement membrane induces tissue-specific gene expression in the absence of cell-cell interaction and morphological polarity. *The Journal of cell biology*, v. 115, n. 5, p. 1383-1395, 1991.

SWIERCZEWSKA, M.; LIU, G.; LEE, S.; CHEN, X. High-sensitivity nanosensors for biomarker detection. *Chemical Society Reviews*, v. 41, n. 7, p. 2641-2655, 2012.

TAMAYO, J.; KOSAKA, P. M.; RUZ, J. J.; SAN PAULO, Á.; CALLEJA, M. Biosensors based on nanomechanical systems. *Chemical Society Reviews*, v. 42, n. 3, p. 1287-1311, 2013.

TAMAYO, J.; RAMOS, D.; MERTENS, J.; CALLEJA, M. Effect of the adsorbate stiffness on the resonance response of microcantilever sensors. *Applied physics letters*, v. 89, n. 22, p. 224104, 2006.

TANCHAK, O. M.; BARRETT, C. J. Swelling dynamics of multilayer films of weak polyelectrolytes. *Chemistry of materials*, v. 16, n. 14, p. 2734-2739, 2004.

TEMPLIN, M. F.; STOLL, D.; SCHRENK, M.; TRAUB, P. C.; VÖHRINGER, C. F.; JOOS, T. O. Protein microarray technology. *Drug Discovery Today*, v. 7, n. 15, p. 815-822, 2002.

TOTHILL, I. E. Biosensors for cancer markers diagnosis. In: *Seminars in cell & developmental biology*. Academic Press, p. 55-62, 2009.

TSUI, O. K. C. *Polymer thin films*. World Scientific, Ahmerst, 2008.

ULUDAG, Y.; TOTHILL, I. E. Cancer biomarker detection in serum samples using surface plasmon resonance and quartz crystal microbalance sensors with nanoparticle signal amplification. *Analytical chemistry*, v. 84, n. 14, p. 5898-5904, 2012.

VOINOVA, M. V.; JONSON, M.; KASEMO, B. 'Missing mass' effect in biosensor's QCM applications. *Biosensors and Bioelectronics*, v. 17, n. 10, p. 835-841, 2002.

WAGGONER, P. S.; CRAIGHEAD, H. G. Micro-and nanomechanical sensors for environmental, chemical, and biological detection. *Lab on a Chip*, v. 7, n. 10, p. 1238-1255, 2007.

WAGGONER, P. S.; VARSHNEY, M.; CRAIGHEAD, H. G. Detection of prostate specific antigen with nanomechanical resonators. *Lab on a Chip*, v. 9, n. 21, p. 3095-3099, 2009.

WAGMAN, M.; MEDALION, S.; RABIN, Y. Anomalous swelling of polymer monolayers by water vapor. *Macromolecules*, v. 45, n. 23, p. 9517-9521, 2012.

WANG, Y.; TAN, G.; ZHANG, S.; GUANG, Y. Influence of water states in hydrogels on the transmissibility and permeability of oxygen in contact lens materials. *Applied surface science*, v. 255, n. 2, p. 604-606, 2008.

WARD, L. S. Entendendo o processo molecular da tumorigênese. *Arquivos brasileiros de endocrinologia e metabologia*, v. 46, n. 4, p. 351-360, 2002.

WU, G.; JI, H.; HANSEN, K.; THUNDAT, T.; DATAR, R.; COTE, R.; MAJUMDAR, A. Origin of nanomechanical cantilever motion generated from biomolecular interactions. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 98, n. 4, p. 1560-1564, 2001.

WÜNSCH FILHO, V.; GATTÁS, Gilka J. F. Biomarcadores moleculares em câncer: implicações para a pesquisa epidemiológica e a saúde pública Molecular biomarkers in cancer: implications for epidemiological research and public health. *Cadernos de Saúde Pública*, v. 17, n. 3, p. 467-480, 2001.

ZHOU, F.; WANG, M.; YUAN, L.; CHENG, Z.; WU, Z.; CHEN, H. .Sensitive sandwich ELISA based on a gold nanoparticle layer for cancer detection. *Analyst*, v. 137, n. 8, p. 1779-1784, 2012.

ZHU, C. Q.; DA CUNHA SANTOS, G.; DING, K.; SAKURADA, A.; CUTZ, J. C.; LIU, N.; TSAO, M. S. Role of KRAS and EGFR as biomarkers of response to erlotinib in National

Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group Study BR. 21. *Journal of Clinical Oncology*, v. 26, n. 26, p. 4268-4275, 2008.

Conclusões Gerais

O desenvolvimento de sensores particulados baseados em nanopartículas poliméricas fundamentou-se nos efeitos de bioconjugação entre as enzimas Chox ou lipase com VC, evidenciados por espectrofotometria UV-vis e por dicroísmo circular. A imobilização dessas biomoléculas sobre nanopartículas de PS/PEG/VC foram promissoras na manutenção da atividade catalítica, apresentando valores superiores aos das enzimas livres. Chox imobilizada sobre nanopartículas poliméricas apresentou resposta linear na dosagem de colesterol HDL sérico em amostras de sangue artificial, sendo interessante em aplicações rotineiras em laboratórios de análises clínicas devido à manutenção de sua atividade enzimática por mais de um mês quando estocada a 4°C. No caso da lipase, sua imobilização sobre nanopartículas de PS/PEG/VC apresentou-se promissora pelo fato de termos obtido parâmetros cinéticos comparáveis ao da lipase livre nas mesmas condições experimentais, e termos observado que ela pode ser reutilizada por até sete vezes consecutivas com atividade enzimática e estabilidade térmica considerável. Ainda que a lipase adsorva sobre as partículas de PS/PEG, e a afinidade entre a enzima e o substrato seja superior ao da enzima livre e imobilizada sobre as partículas de PS/PEG/VC, o impedimento estérico da camada de hidratação do grupo polietileno glicol dificulta o acesso do substrato ao sítio ativo da enzima. A versatilidade expressa pela molécula de corante utilizada abre inúmeras possibilidades de imobilização de moléculas com atividade biológicas na confecção de biosensores, biorreatores ou kits de diagnósticos rápidos, sensíveis, precisos e de baixo custo. Em outra direção, o comportamento das enzimas Chox e lipase em processo de adsorção em superfícies hidrofílicas e hidrofóbicas direcionou ao estudo de suas imobilizações nas folhas de grafeno e grafeno oxidado. A característica hidrofóbica do G favoreceu a formação de bioconjugados com lipase e Chox apenas por mistura física, beneficiando a exposição de sítios ativos da lipase e da Chox para

os substratos correspondentes, aumentando a sua eficiência catalítica. Entretanto, na presença de partículas de GO, o qual possui em seus planos basais grupos hidrofílicos, as enzimas apresentaram desativação expressas por medições espectroscópicas de DC e de FL. Assim, a combinação de espectroscopia de DC e FL foram fundamentais para a compreensão do comportamento catalítico dessas enzimas na presença dos adjuvantes G e GO. Para fins catalíticos, G provou ser um melhor adjuvante para lipase e Chox que GO.

No caso dos sensores nanomecânicos, o estágio no instituto de Microeletrônica de Madri foi fundamental na familiarização e desenvolvimento desses sensores baseados em MC. Durante o estágio investigou-se o comportamento de intumescimento de filmes finos de PHEMA por resposta nanomecânica, que foi complementado por elipsometria, no IQUSP. Enquanto a técnica de elipsometria foi capaz de detectar a absorção de água nos filmes finos de PHEMA somente após longos períodos de exposição das amostras a altos valores de UR, os dispositivos nanomecânicos apresentaram um grande potencial para quantificar rapidamente a quantidade de solvente absorvido pelos filmes finos poliméricos numa ampla faixa de UR. Estes estudos foram interessantes ao demonstrar que a resposta nanomecânica observada está relacionada não só com a massa molar do polímero, mas também com os fenômenos de interações polímero-interface de Si, polímero-polímero e aos efeitos da camada de água interfacial entre PHEMA e MC que podem desempenhar um papel crucial na transdução de sinal. Já no desenvolvimento do biosensor para detecção e dosagem de CEA presente em sangue, o ensaio sanduiche com nanopartículas de ouro foi importante por fornecer sensibilidade e robustez aos ensaios que mimetizam amostras reais, sendo capaz de quantificar CEA em concentrações ultrabaixas em amostras de soro.

Perspectivas

As enzimas Chox e lipase imobilizadas sobre as nanopartículas de PS/PEG/VC se mostraram promissoras por apresentarem atividades enzimáticas superiores as das enzimas livres. Chox e lipase, juntamente com enzimas gliceroquinase (GK) e glicerol 3-fosfato oxidase (GPO), possuem papel crucial em exames laboratoriais na dosagem de colesterol e triglicérides séricos. Apesar da habilidade da molécula de VC em formar complexos com α -proteínas, a imobilização das enzimas GK e GPO nas partículas de PS/PEG/VC causaram desativação enzimática, como visto em ensaios preliminares. Entretanto, a utilização de partículas de G ou GO como suporte no processo de adsorção de GK e GPO é um desafio interessante, o qual pode ser aplicado juntamente com a lipase no desenvolvimento de um sensor para dosar triglicérides presentes no sangue. As propriedades óticas, eletroquímicas e fluorescentes das partículas de G ou GO geram inúmeras possibilidades de aplicações, principalmente em bioconjugação com biomoléculas de interesse acadêmico e tecnológico. Propriedades eletroquímicas e morfológicas das partículas de G e GO podem ser utilizadas no desenvolvimento de um biosensor amperométrico com biomoléculas que geram peróxido de hidrogênio como subproduto, como por exemplo, no processo de oxidação da molécula de glicerol fosforilada catalisada pela GPO em biosensores de triglicérides.

Sensores nanomecânicos baseados em *microcantilevers* são interessantes como método de caracterização ou no desenvolvimento de biosensores, conforme trabalho desenvolvido nos capítulos I e II da Parte B desta tese. A modificação da superfície dos MCs para gerar sensores abre um amplo campo de aplicações. Entretanto, a escolha das moléculas para a modificação dos MCs deve ser tal que a especificidade para as moléculas de interesse seja a maior possível.

Súmula Curricular

Nome: Rubens Araujo da Silva

Local e data de Nascimento: São Paulo (SP) aos 13 de março de 1981.

Educação

1988-1995: Ensino Fundamental – Escola Municipal Professor Roberto Mange.

1996-1998: Ensino Médio – Escola Estadual Professor Almeida Junior.

2004-2009: Bacharelado em Química – Instituto de Química da Universidade de São Paulo (USP), São Paulo – SP.

Agosto de 2005 – julho de 2007 (Monitor Estação Ciência): Bolsista do Programa de Apoio à Permanência e Formação Estudantil (PAPFE).

Junho de 2006 - Julho de 2008 (Iniciação Científica, IC): Bolsista do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

Orientadora: Prof^a Dr^a Denise Freitas Siqueira Petri

Agosto/2008 – Dezembro/2009 **Clariant S/A**

Cargo: Estagiário

Funções desempenhadas: Análise de rotina de Química Analítica Instrumental e análises clássicas, desenvolvimento e otimização de metodologias analíticas com foco no cliente e em resultados, desenvolvimento de análises

cromatográficas (CG-MS e HPLC), controle de qualidade de matéria-prima e produto final e pesquisa e desenvolvimento de novos produtos e processos.

Artigos Completos Publicados em Periódicos Durante a Iniciação Científica

Silva, R. A.; Petri, D. F. S. ; Carmona-Ribeiro, A. M. Adsorption behavior and activity of horseradish peroxidase onto polysaccharide-decorated particles. *International journal of biological macromolecules*, v. 41, n. 4, p. 404-409, 2007.

Silva, R. A.; Úrzua, M. D.; Petri, D. F. S. Lysozyme binding to poly (4-vinyl-N-alkylpyridinium bromide). *Journal of colloid and interface science*, v. 330, n. 2, p. 310-316, 2009.

Silva, R. A.; Úrzua, M. D.; Petri, D. F. S.; Dubin, P. L. Protein adsorption onto polyelectrolyte layers: Effects of protein hydrophobicity and charge anisotropy. *Langmuir*, v. 26, n. 17, p. 14032-14038, 2010.

2010 – 2015: Doutorando Direto em Química (Físico Química), Universidade de São Paulo, USP, São Paulo – SP.

Título: Sensores Particulados e Sensores Nanomecânicos

Orientadora: Prof^ª Dr^ª Denise Freitas Siqueira Petri

Bolsista do Conselho de Desenvolvimento Científico

e Tecnológico (CNPq)

Agosto de 2012 – julho de 2013: Doutorado Sanduiche. Instituto de Microeletrônica de Madrid.

Título: Sensores Nanomecânicos Multifuncionais de Análises de Interesse Clínico-Analítico.

Orientadoras: Dr^a Montserrat Calleja e Prof^a Dr^a Denise Freitas Siqueira Petri.

Bolsista: agosto 2012 a julho de 2013 (processo: 209693/2012-6).

Artigos Completos Publicados em Periódicos Durante o Doutorado

Silva, R. A.; Petri, D. F. S.; Carmona-Ribeiro, A. M. Enzymatic activity of cholesterol oxidase immobilized onto polymer nanoparticles mediated by Congo red. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v. 110, p. 347-355, 2013.

Silva, R. A.; Petri, D. F. S.; Carmona-Ribeiro, A. M. Catalytic behavior of lipase immobilized onto Congo red and PEG-decorated particles. *Molecules*, v. 19, n. 6, p. 8610-8628, 2014.

del Rey, M.; Silva, R. A.; Meneses, D.; Petri, D. F. S.; Tamayo, J.; Calleja, M.; Kosaka, P. M. Monitoring swelling and deswelling of thin polymer films by microcantilever sensors. *Sensors and Actuators B: Chemical*, v. 204, p. 602-610, 2014.

Kosaka, P. M.; Pini, V.; Ruz, J. J.; Silva, R. A.; González, M. U.; Ramos, D.; Calleja, M.; Tamayo, J. Detection of cancer biomarkers in serum using a hybrid mechanical and optoplasmonic nanosensor. *Nature nanotechnology*, p. 1-7, 2014.

Silva, R. A.; Souza, M. L.; Bloisi, G. D.; Corio, P.; Petri, D. F. S. Bioconjugation of lipase and cholesterol oxidase with graphene or graphene oxide. *Journal of Nanoparticle Research*, v. 17, n. 4, p. 1-12, 2015.

Participações em Eventos Científicos

XXIII Semana da Química. Adsorção de Horseradish Peroxidase sobre Partículas Híbridas. 2006. (Participações em eventos/Simpósio).

14º Simpósio Internacional de Iniciação Científica da Universidade de São Paulo. Adsorção de Horseradish Peroxidase sobre Partículas Híbridas. 2006. (Participações em eventos/Simpósio)

15º Simpósio Internacional de Iniciação Científica da Universidade de São Paulo. Interação entre Polímeros e Lizosima. 2007. (Participações em eventos/Simpósio).

11º Congresso Brasileiro de Polímeros. Imobilização de Enzimas sobre Filmes de Blendas de Ésteres de Celulose. 2011. (Participações em eventos/Congresso).

Third International Conference on Multifunctional, Hybrid and Nanomaterials. Sorrento, Itália. Congo Red Decorated Polymer Nanoparticles as Support for Cholesterol Oxidase. 2013. (Participações em eventos/Congresso).

12º Congresso Brasileiro de Polímeros (12 CBPol). Intumescimento de filmes finos poliméricos monitorados por elipsometria e resposta nanomecânica. 2013. (Participações em eventos/Congresso).

Estágios em Ensino

Preparação pedagógica e auxiliar didático em laboratórios de Físico-Química Experimental no período de mar/2010 a jul/2010;

Estágio supervisionado em Docência na disciplina de Química Geral no período de ago/2010 a dez/2010;

Estágio supervisionado em Docência na disciplina de Físico-Química Experimental (QFL 4425) no período de mar/2011 a jul/2011;

Estágio supervisionado em Docência na disciplina de Físico-Química Experimental (QFL 0404) no período de ago/2013 a dez/2013;

Monitor da 2ª Escola de Verão em Coloides e Superfícies no período de 27 a 31 de jan/2014